

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DPTO. DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA



**IMPACTO DEL EJE ANGIOTENSINA-(1-7)/RECEPTOR
Mas EN LA INFLAMACIÓN Y SENESCENCIA
VASCULARES.**

Memoria que para optar al título de Doctor en Farmacología y
Fisiología
presenta

LAURA ALICIA VILLALOBOS RODRÍGUEZ

Director

Dra. Concepción Peiró Vallejo
Profesor Titular de la Universidad Autónoma de Madrid

Dr. Carlos Félix Sánchez Ferrer
Catedrático de la Universidad Autónoma de Madrid

MADRID, 2013

Este trabajo ha sido subvencionado con ayuda del Plan Nacional de I+D+I (SAF 2011-24648, SAF2008-01291 y SAF2011-28011), la Acción integrada hispano-alemana (HD2008-0056 y PRI-AIBDE-2011-0811) y la Fundación Eugenio Rodríguez Pascual. Laura Alicia Villalobos Rodríguez ha sido la beneficiaria de una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) desde 2008 hasta 2012.

RESUMEN

RESUMEN

La angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] es un heptapéptido del sistema renina angiotensina (SRA) generado a partir de la angiotensina (Ang) II y de la Ang I a través de diferentes rutas enzimáticas. La Ang-(1-7) se une al receptor metabotrópico Mas acoplado a proteína G y ha suscitado un creciente interés en los últimos años ya que se considera un antagonista fisiológico de la Ang II, pudiendo contrarrestar varias acciones deletéreas de esta última. En el presente trabajo de investigación, se determinó la capacidad de la Ang-(1-7) para disminuir en células vasculares humanas en cultivo las respuestas inflamatorias y senescentes, entendidas como procesos ligados al daño vascular.

En células de músculo liso de aorta humana (CMLAH) se utilizó como marcador de inflamación la inducción de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y la consiguiente liberación de NO, cuantificadas por Western blot y por el método de Griess, respectivamente. Se observó que la Ang-(1-7) redujo de manera dependiente de la concentración la inducción de iNOS estimulada tanto por Ang II (100 nM; 18 h) como por la citoquina proinflamatoria interleuquina IL-1 β (2,5 y 10 ng/ml; 18 h), entendida como una molécula inflamatoria independiente del SRA. El efecto inhibitorio de la Ang-(1-7) (100 nM) se abolió en presencia de los antagonistas del receptor Mas A779 (1 μ M) y D-Pro7-Ang-(1-7) (1 μ M). Utilizando los fármacos inhibidores apocinina (30 μ M) y tiocarbamato de pirrolidina (PDTC; 100 μ M), se observó también que el efecto de la Ang-(1-7) dependía de la inhibición de la actividad de la enzima NADPH oxidasa y del factor de transcripción NF- κ B estimuladas por Ang II y por IL-1 β .

En células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC), se utilizó como marcador de inflamación la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, que cumplen un papel importante en la adhesión de leucocitos ligada al desarrollo del proceso aterosclerótico. Mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia indirecta, se determinó que la activación del eje Ang-(1-7)/receptor Mas era capaz de reducir la expresión de estas moléculas de adhesión estimuladas por Ang II e IL-1 β , posiblemente por un mecanismo que implicaba a la enzima NADPH.

La senescencia vascular es una respuesta al estrés asociada con la aterosclerosis y el daño vascular. En HUVEC, la Ang II y la IL-1 β indujeron un aumento de células senescentes, determinadas por tinción positiva a β -galactosidasa (SA- β gal), y del daño telomérico celular, determinado por inmunofluorescencia, lo que fue revertido parcialmente por la Ang-(1-7) a través del receptor Mas. Se comparó el efecto de la Ang-(1-7) con el de la adipoquina Nampt/PBEF/visfatina, una adipoquina con actividad enzimática nicotinamida fosforribosil transferasa (Nampt) y cuyos niveles, contrariamente a los de Ang-(1-7), están aumentados en la obesidad. La Nampt/PBEF/visfatina (10-100 ng/ml; 24 h) incrementó la tinción de SA- β gal y el daño telomérico de manera dependiente de la concentración y del tiempo. Estos efectos de la Nampt/PBEF/visfatina (50 ng/ml; 24 h) se abolieron con el inhibidor de la Nampt APO866 (10 μ M) y con apocinina (30 μ M) indicando la participación de la NADPH oxidasa y de la Nampt en el efecto prosenescente de esta adipoquina.

Este trabajo indica que el eje Ang-(1-7)/receptor Mas posee propiedades antiinflamatorias y antisenescentes que pueden contrarrestar no sólo la acción de la Ang II sino de otras moléculas independientes del SRA y con un papel importante en el daño vascular. En este sentido, el eje Ang-(1-7)/receptor Mas podría constituir una nueva diana farmacológica para modular la inflamación y senescencia vascular.

SUMMARY

SUMMARY

Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)], an heptapeptide of the renin angiotensin system (RAS) is generated from angiotensin I and angiotensin II (Ang II) by different enzymatic pathways. Ang-(1-7) binds the G protein-coupled receptor Mas. ~~Actually~~ Nowadays, Ang-(1-7) is considered as a physiological antagonist of Ang II, since this peptide can counteract various deleterious actions of Ang II in the vascular wall. In the present study, we investigated the potential antiinflammatory and antisenescent actions of Ang-(1-7) in cultured human vascular cells.

In vascular smooth muscle cells (HASMC) we used the inducible nitric oxide synthase (iNOS) levels and NO release as inflammatory markers, which were determined by Western blotting and the Griess method, respectively. Pre-incubation with Ang-(1-7) (100 nM) markedly reduced in a concentration-dependent manner the iNOS induction and NO release stimulated by both Ang II (100 nM; 18 h) and the pro-inflammatory cytokine IL-1 β (2,5 y 10 ng/ml; 18 h), the latter taken as a RAS-independent inflammatory molecule. Furthermore, the Mas receptor antagonists A779 (1 μ M) and D-Pro7-Ang-(1-7) (1 μ M) totally blocked the anti-inflammatory effects of Ang-(1-7). By using the drugs apocynin (30 μ M) and PDTC (100 μ M), we determined that the anti-inflammatory effects of Ang-(1-7) relied on a sequential inhibition of the activation of both NADPH oxidase and nuclear factor NF- κ B stimulated by Ang II and IL-1 β .

In human umbilical endothelial cells (HUVEC), the expression of adhesion molecules, such as ICAM-1 and VCAM-1, was used as a marker of inflammation. These molecules play a crucial role in initiating the atherosclerotic process. Using flow cytometry and indirect immunofluorescence, we observed that the activation of Ang-(1-7)/Mas receptor axis markedly attenuated the expression of both adhesion molecules induced by both Ang II and IL-1 β through a mechanism involving NADPH oxidase inhibition.

Vascular senescence is a stress response associated with atherosclerosis and vascular damage. In HUVEC, Ang II and IL-1 β enhanced the number of senescent cells positive to β galactosidase (SA- β gal) staining and promoted DNA damage determined by indirect immunofluorescence. Pre-incubation with Ang-(1-7) markedly reduced senescence through a mechanism involving Mas receptors. We further compared the antisenescent effect of Ang-(1-7) with that of the adipokine Nampt/PBEF/visfatin, which exhibits nicotinamide phosphorribosil transferase enzymatic activity (Nampt). Contrary to Ang-(1-7), Nampt/PBEF/visfatin levels are enhanced in obesity. Nampt/PBEF/visfatin (10-100 ng/ml) increased SA- β gal staining and telomere-associated DNA damage in a concentration-dependent manner. The pro-senescent effect of Nampt/PBEF/visfatin (50 ng/ml) was abolished by both the Nampt inhibitor APO866 (10 μ M) and apocynin (30 μ M), indicating that Nampt/PBEF/visfatin induces human endothelial cells senescence through a mechanism relying on Nampt and NADPH oxidase activity.

This study shows that the Ang-(1-7)/Mas receptor axis exhibits anti-inflammatory and antisenescent properties not only against Ang II, but also against other pro-inflammatory molecules independent of the RAS. Therefore, the Ang-(1-7)/Mas receptor axis arises as a potential therapeutical target for modulating vascular inflammation and senescence.

Resumen.....	1
Summary.....	5
Abreviaturas.....	9
Introducción.....	15
1. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA.....	17
1.1 El sistema renina angiotensina.....	17
1.2 Síntesis y degradación de Ang II.....	18
1.3 Receptores de Ang II.....	20
1.3.1 Receptor AT ₁	21
1.3.2 Receptor AT ₂	21
1.4 El sistema renina angiotensina, en la inflamación y daño vascular.....	23
1.4.1 Ang II y permeabilidad vascular.....	23
1.4.2 Ang II e infiltración leucocitaria.....	23
1.4.3 Ang II y remodelado tisular.....	24
1.4.4 Ang II y estrés oxidativo.....	25
1.4.5 Ang II y la activación de NF-κB.....	26
2. EL EJE ANGIOTENSINA-(1-7)/RECEPTOR Mas.....	28
2.1 Síntesis y degradación de angiotensina-(1-7).....	28
2.2 Acciones biológicas de la Ang-(1-7).....	29
2.2.1 Acciones vasculares de la Ang-(1-7).....	31
2.3 La Ang-(1-7) como adipoquina.....	33
2.3.1 Obesidad, tejido adiposo y la secreción de adipoquinas.....	33
2.3.2 La Ang-(1-7) una adipoquina beneficiosa.....	38
2.4 Receptores de Ang-(1-7): el receptor Mas.....	39
2.5 Modulación farmacológica del Eje ECA 2/Ang-(1-7)/receptor Mas.....	40
3. MECANISMOS DE DAÑO VASCULAR.....	43
3.1 Endotelio y óxido nítrico.....	43
3.2 Disfunción endotelial, óxido nítrico y estrés oxidativo.....	45
3.2.1. NADPH oxidasa.....	46
3.3 Aterosclerosis.....	49
3.3.1 Inflamación crónica de bajo grado.....	51
3.3.2 Moléculas de adhesión: ICAM-1 y VCAM-1.....	52
3.3.3 Óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).....	52

3.4 Senescencia vascular.....	53
3.4.1 Antecedentes.....	53
3.4.2 Senescencia replicativa.....	54
3.4.3 Senescencia prematura inducida por estrés.....	58
3.4.4 Vías de señalización implicadas en el proceso de senescencia: la vía del p53 y del p16.....	60
3.4.5 Fenotipo senescente.....	63
3.4.6 Patologías relacionadas con el fenotipo senescente en las células endoteliales.....	66
Objetivos.....	69
Objetivo general.....	71
Objetivos específicos.....	72
Materiales y métodos.....	73
1. Declaración de ética.....	75
2. Obtención de células de músculo liso vascular humano.....	75
3. Obtención de células endoteliales de vena de cordón umbilical.....	76
4. Caracterización celular.....	78
5. Inmunofluorescencia indirecta.....	78
6. Microscopía confocal.....	81
7. Western blot.....	81
7.1 Extracción de muestras.....	81
7.2 Cuantificación de proteínas por el método de BCA.....	82
7.3 Electroforesis y transferencia de proteínas.....	82
7.4 Incubación de los anticuerpos.....	82
7.5 Revelado de la membrana.....	83
8. Cuantificación de nitritos en el sobrenadante celular.....	84
9. Determinación de la actividad de la NADPH oxidasa.....	85
10. Ensayo de retardo en gel (EMSA).....	87
11. Citometría de flujo.....	89
12. Determinación de la actividad SA-β-Galactosidasa (SA-β-Gal).....	91
13. Detección del daño telomérico.....	92
14. Materiales.....	95
15. Análisis estadístico.....	96

Resultados.....	97
I. RESULTADOS EN CMLAH.....	99
1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CMLAH.....	99
2. LA ANG-(1-7) ATENÚA LA INFLAMACIÓN INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II E IL-1 β EN CMLAH A TRAVÉS DEL RECEPTOR Mas.....	100
2.1 La Ang-(1-7) previene la inducción de iNOS estimulada por Ang II de una manera dependiente de la concentración.....	100
2.2 La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, previene la inducción de iNOS estimulada por Ang II.....	100
2.3 La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, previene la liberación de nitritos estimulada por Ang II.....	101
2.4 La Ang-(1-7) previene la inducción de iNOS estimulada por IL-1 β de una manera dependiente de la concentración.....	104
2.5 La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, previene la inducción de iNOS estimulada por IL-1 β	104
2.6 La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, previene la liberación de nitritos estimulada por IL-1 β	110
3. PARTICIPACIÓN DE LA ENZIMA NADPH OXIDASA EN LA ACCIÓN ANTIINFLAMATORIA DE LA ANG-(1-7) EN LAS CMLAH.....	111
3.1 La enzima NADPH oxidasa media la inducción de iNOS y la liberación de nitritos estimulada por Ang II e IL-1 β	111
3.2 La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, previene la inducción de la NADPH oxidasa estimulada por Ang II e IL-1 β	116
4. LA ANG-(1-7) DISMINUYE LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B EN CMLAH.....	119
4.1 La Ang II y la IL-1 β inducen la expresión de iNOS a través de NF- κ B...	119
4.2 La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, disminuye la activación de NF- κ B inducida por Ang II e IL-1 β	122
II. RESULTADOS EN HUVEC.....	126
1. CARACTERIZACIÓN DE LAS HUVEC.....	126

2. LA ANG-(1-7), A TRAVÉS DEL RECEPTOR Mas, ATENÚA LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN ICAM-1 Y VCAM-1 INDUCIDAS POR ANGIOTENSINA II E IL-1 β EN HUVEC.....	127
3. LA ENZIMA NADPH OXIDASA PODRÍA ESTAR IMPLICADA EN LA REDUCCIÓN DE LA EXPRESION DE ICAM-1 Y VCAM-1 MEDIADA POR ANG-(1-7) EN HUVEC.	133
3.1 La enzima NADPH oxidasa media la inducción de ICAM-1 y VCAM-1 estimulada por Ang II e IL-1 β	133
4. LA ANG-(1-7), A TRAVÉS DEL RECEPTOR Mas, ATENÚA LA SENESCENCIA EN HUVEC INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II E IL-1 β	136
4.1 La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, disminuye la senescencia endotelial inducida por Ang II e IL-1 β	136
4.2 La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, atenúa la inducción de daño en el ADN y disfunción telomérica provocada por Ang II e IL-1 β	139
5. LA VISFATINA INDUCE LA SENESCENCIA EN HUVEC A TRAVÉS DE SU ACTIVIDAD FOSFORRIBOSIL TRANSFERASA.....	144
5.1 La visfatina induce el número de células senescentes en cultivo de una manera dependiente de la concentración y del tiempo.....	144
5.2 La visfatina induce el daño en el ADN y disfunción telomérica de una manera dependiente de la concentración.....	147
5.3 La visfatina induce el número de células senescentes en cultivo a través de su actividad nicotinamida fosforribosil transferasa (Namp1).....	150
5.4 La visfatina induce el daño en el ADN y la disfunción telomérica a través de su actividad nicotinamida fosforribosil transferasa.....	150
5.5 La visfatina induce senescencia mediante la activación del enzima NADPH oxidasa.....	156
Discusión	157
Ang-(1-7), receptor Mas e inhibición de la inducción de iNOS por estímulos inflamatorios dependientes e independientes del SRA en el músculo liso vascular humano.....	160

La Ang-(1-7) previene la inducción de iNOS por estímulos inflamatorios dependientes e independientes del SRA en el músculo liso vascular humano al inhibir la activación de la NADPH oxidasa y NF- κ B.....	165
Ang-(1-7), receptor Mas e inhibición de la inducción de moléculas de adhesión celular por estímulos inflamatorios dependientes e independientes del SRA en el endotelio humano: papel de la NADPH oxidasa.....	170
La Ang-(1-7) disminuye el daño en los telómeros y atenúa la senescencia inducida por Ang II e IL-1 β a través del receptor Mas en HUVEC.....	175
La Nampt/PBEF/visfatina aumenta el daño telomérico y genera la inducción de senescencia a través de su actividad intrínseca Nampt e involucra la activación de la vía de p53 en HUVEC.....	180
Consideraciones finales.....	184
Conclusiones.....	185
Conclusions.....	189
Referencias bibliográficas.....	193

ABREVIATURAS

[γ-³²ATP]: adenosín trifosfato- γ ³²	BCA: ácido bicinconínico
A779: Asp1-Arg2-Val3-Tyr4-Ile5-His6-D-Ala7	BCR: receptor de células B
ACh: acetilcolina	BH₄: tetrahidrobiopterina
ADN: ácido desoxirribonucleico	BK: bradiquinina
AGEs: Productos de glicosilación avanzada	BSA: albúmina de suero bovino
Akt/PKB: proteína quinasa B	Ca²⁺: calcio
AMPc: adenosín monofosfato cíclico	[Ca²⁺]_i: calcio intracelular
Ang I: angiotensina I	CAMs: moléculas de adhesión
Ang II: angiotensina II	CCL2: quimioquina CC ligando 2
Ang III: angiotensina III	Cdc2: de la división del ciclo celular 2
Ang IV: angiotensina IV	CdC25: proteína de la división del ciclo celular 25 homóloga A
Ang-(1-7): Angiotensina-1-7	CDK: quinasa dependiente de ciclina
Ang-(1-9): Angiotensina-1-9	CDK2: quinasa dependiente de ciclina 2
Ang-(1-4): Angiotensina-1-4	CDK4: quinasa dependiente de ciclina 4
ANOVA: análisis de la varianza	CDK6: quinasa dependiente de ciclina 6
APO866: (E)-N-[4-(1-benzoilpiperidina-4-il)butil]-3-(piridin-3-il) acrilamida	Chk2: quinasa de punto de restricción 2
Apo E: apolipoproteína E	CMLAH: células de músculo liso de aorta humana
Apocinina: 4-hidroxi-3-metoxiacetofenona	CO₂: dióxido de carbono
ARA: antagonistas del receptor de angiotensina II	Colesterol-HDL: colesterol asociado a lipoproteínas de alta densidad
ARN: ácido desoxirribonucleico	COX-2: ciclooxigenasa -2
ARNm: ácido desoxirribonucleico mensajero	CPDL: nivel de duplicación de la población acumulado
AT₁: receptor tipo I de angiotensina	cpm: cuentas por millón
AT₂: receptor tipo II de angiotensina	CRP: proteína C reactiva
AT₄: receptor tipo IV de angiotensina	CTGF: factor de crecimiento del tejido conectivo
ATM/ATR: proteína ataxia telangiectasia mutada	CXCL1: quimioquina CXC ligando 1
ATP: Adenosín trifosfato	DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol 2 HCl
AVE 0991: (5-formil-4-metoxi-2-fenil-1-[[4-[2-etilaminocarbonilsulfonamido-5-isobutil-3-tienil]-fenil]-metil]-imidazole)	DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco
β-GAL: β -galactosidasa	D-Pro⁷-Ang-(1-7): Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-D-Pro, [D-Pro ⁷ -Ang-(1-7)]
SA-βGAI: Senescencia asociada a β -galactosidasa	DPI: Difeniliodonio
BAFFR: receptor de activación de células B	DTT: ditioneitol
Bcl-2: proteína codificada por el gen del linfoma de células B-2	E2F: factor de transcripción E2F

EAC: enfermedad arterial coronaria	hTR: ARN de la telomerasa humana
ECA: Enzima convertidora de angiotensina	HUVEC: células endoteliales de vena de cordón umbilical humano
ECA 2: Enzima convertidora de angiotensina-2	ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1
ECGS: suplemento de crecimiento de células endoteliales	IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina II
EDTA: ácido etilendiamino tetraacético	IFN-γ: interferón gamma
EGF: factor de crecimiento epidermal	IFN-α: interferón gamma
EGTA: ácido de etileno glicol tetraacético	IGF: factor de crecimiento análogo de la insulina
EMSA: ensayo de retardo en gel	IGFBP7: factor de crecimiento tipo insulina-7
EEM: error estándar de la media	IKK: quinasas de I κ B
ELKS: glutamic acid (E), leucine (L), lysine (K), and serine (S)	IKKα: quinasa de I κ B α
eNOS: sintasa de óxido nítrico endotelial	IKKβ: quinasa de I κ B β
EPC: células progenitoras endoteliales humanas	IKKγ: quinasa de I κ B γ
EPN: endopeptidasa neutra	IκB: proteína inhibidora de NF- κ B
ERK 1/2: quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2	IL-1: interleuquina-1
FAD: dinucleótido de flavina adenina	IL-1α: interleuquina-1 α
FCS: suero bovino fetal	IL-1β: interleuquina-1 β
FITC: isotiocianato de fluoresceína	IL-2: interleuquina-2
FMN: mononucleótido de flavina	IL-6: interleuquina-6
FRDE: factor de relajación derivado de endotelio	IL-8: interleuquina-8
GC: guanilato ciclasa	IL-10: interleuquina-10
GLUT-4: transportador de glucosa tipo 4	IL-12: interleuquina-12
GMPC: guanosín monofosfato cíclico	IL-1R: receptor de IL-1
H₂O₂: peróxido de hidrógeno	IL-RA: antagonista del receptor de IL-1
γH2AX: H2A.X fosforilada	IL-1RAcP: proteína accesoria del receptor IL-1
HAEC: células endoteliales de arteria coronaria humana	IMC: índice de masa corporal
HO-1: hemooxigenasa-1	iNOS: sintasa de óxido nítrico inducible
HEPES: ácido N-2-hidroxietilpiperacín-N'-2-etanosulfónico	JAK: quinasa de Jano
HPβCD: hidroxipropil β -ciclodextrina	JNK: quinasa N-terminal de c-Jun
HP1: proteínas de heterocromatina-1	K₃[Fe(CN)₆]: ferricianida de potasio
HRP: peroxidasa de rábano	K₄[Fe(CN)₆]•3H₂O: ferrocianida de potasio
hTERT: transcriptasa telomerasa reversa humana	KH₂PO₄: fosfato de potasio
	KCl: Cloruro de potasio
	LDL: lipoproteína de baja densidad

LOX-1: receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidadas	Nmnat: mononucleótido de nicotinamida adenilil transferasa
LTβR: receptor de linfotoxina-β	nNOS: sintasa de óxido nítrico neuronal
Lucigenina: N,N'-dimetil-9,9'-dinitrato de biacridinio	NO: óxido nítrico
M199: Medio de Earl 199	Nonidet P40: octilfenoxi-polietoxi-etanol
M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos	NOS: sintasa de óxido nítrico
MAPK: quinasas activadas por mitógeno	O₂: Oxígeno molecular
MAPK/p38: quinasas activadas por mitógeno p38	O₂⁻: anión superóxido
MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1	OH[•]: radical hidroxilo
MDC1: proteína 1 mediadora del punto de control de daño del ADN	OMS: Organización Mundial de la Salud
MDM2: murine double minute 2	ONOO[•]: peroxinitrito
MIF: factor de inhibición de la migración de macrófagos	P16: proteína supresora de tumores 16
MMPs: metaloproteinasas de matriz extracelular	P14/ARF: proteína supresora de tumores 14
MMP-3: metaloproteinasas de la matriz extracelular-3	P21: proteína supresora de tumores 21
MMS2: enzima sensible a metil metanosulfonato-2	P53: proteína supresora de tumores 53
NaCl: cloruro de sodio	PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1
NAD⁺: dinucleótido de nicotinamida adenina en su forma oxidada.	PBEF: factor incrementador de colonias de células pre-B
NADH: dinucleótido de nicotinamida adenina reducido	PBS: tampón fosfato salino
NADP⁺: dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato en su forma oxidada	PCNA: antígeno proliferante nuclear celular
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido	PCP: prolil-carboxipeptidasa
Na₂HPO₄: fosfato de sodio	PDT: tiempo de duplicación de la población
Nampt: nicotinamida fosforribosil transferasa	PDTC: ditiocarbamato de pirrolidina
NaNO₂: nitrito sódico	PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
NaOH: hidróxido de sodio	PEP: prolil-peptidasa
NEDA: N-(1-Naftil) etilendiamina	PFA: paraformaldehído
NF-κB: factor nuclear κB	PG: prostaglandina
NIK: quinasa inductora de NF-κB	PGI₂: prostaciclina I ₂
NMN: mononucleótido de nicotinamida	PGE₂: prostaciclina E ₂
	PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa
	PKC: proteína quinasa C
	PKG: proteína quinasa dependiente de GMPc
	PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
	PPi: pirofosfato inorgánico

PPP: 5-fosforibosil-1-pirofosfato

PPAR δ : receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas

pRb: proteína retinoblastoma

PTEN: fosfatasa y homóloga de tensina eliminada del cromosoma 10

RANK: receptor activador para el factor nuclear κ B

RAS: Renin angiotensin system

ROS: especies reactivas de oxígeno

SAHF: focos de heterocromatina asociados a senescencia

SASP: Senescencia asociada al fenotipo secretor

SDS: dodecilsulfato sódico

SHR: ratas espontáneamente hipertensas

SIRT1: sirtuína-1 deacetilasa dependiente de NAD

SMS: secretoma de mensajería de la senescencia

SNC: sistema nervioso central

SRA: Sistema renina angiotensina

STAT1: transductor de señal y activador de la transcripción 1

TBE: tampón de Tris, borato y EDTA

TBS-T: tampón salino de Tris y Tween 20

TCR: receptor de linfocitos T

TGF- β : el factor de crecimiento transformante beta

TIFs: Disfunción telomérica inducida

TLR: receptor tipo toll

TNF- α : factor de necrosis tumoral- α

TNF- β : factor de necrosis tumoral- β

TNFR: receptor del factor de necrosis tumoral

Tris: 2-amino-2-(hydroxymethyl) propane-1,3-diol hydrochloride

TRITC: isotiocianato de tetrametil-rodamina

TRF: fragmento de restricción terminal

TRF-1: factor 1 de unión a las repeticiones teloméricas

TRF-2: factor 2 de unión a las repeticiones teloméricas

Tween 20: agregado de polisorbato 20

URL: unidades relativas de luz

VCAM-1: molécula de adhesión vascular-1

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

XGAL:5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA.

1.1 El sistema renina angiotensina.

El sistema renina angiotensina (SRA) sistémico es un mecanismo coordinado de cascadas hormonales principalmente controlado por la producción y liberación de renina desde los riñones a la circulación (Fig. 1). El SRA tiene como principales acciones el control de la presión sanguínea y la homeostasis de electrolitos a través de sus acciones vasoconstrictoras y los efectos estimulantes de la secreción de aldosterona. El SRA tiene un papel muy relevante tanto en procesos fisiológicos como fisiopatológicos (Singh et al., 2006). El SRA actúa tanto de forma endocrina como paracrina o autocrina, ya que la presencia o no de sus componentes en el sitio de acción es lo que determina la respuesta específica de su activación (Santos et al., 2008a).

El SRA que actúa localmente está presente en varios órganos, incluyendo vasos sanguíneos, corazón, glándula adrenal, ojos, páncreas, sistema reproductivo, tejido adiposo, sistema linfático y cerebro (Bader et al., 2001; Castro et al., 2010). Este sistema local se caracteriza por la presencia a nivel tisular de componentes como el angiotensinógeno, enzima convertidora de angiotensina (ECA) y receptores específicos. Estos componentes son capaces de generar angiotensina II (Ang II) localmente y de llevar a cabo acciones paracrinas y autocrinas, como las involucradas con el crecimiento, proliferación y metabolismo celular. (Ribeiro-Oliveira et al., 2008).

En la pared vascular se producen todos los componentes del SRA excepto la renina, por lo que para la formación de Ang II localmente se requiere la renina circulante producida en el riñón. Niveles detectable elevados de ECA se localizan en la adventicia y se expresan en células de músculo liso y células endoteliales en cultivo. El angiotensinógeno se ha identificado en las células de músculo liso, el endotelio y en la grasa perivascular (Touyz y Schiffrin, 2000). Aunque la Ang II es el principal efector de este sistema, la familia del SRA incluye a otros péptidos biológicamente activos como son la angiotensina (Ang IV), la angiotensina III (Ang III) y la angiotensina-(1-7), siendo esta última el objeto de estudio de esta investigación (Santos et al., 2013).

1.2 Síntesis y degradación de Ang II.

El componente final y principal efector del SRA es la Ang II, que es producida a partir del angiotensinógeno por acción de la renina y la ECA. La renina, codificada por un solo gen localizado en el cromosoma 1, es producida y secretada por las células yuxttaglomerulares íntimamente asociadas a las arteriolas aferentes renales. En un inicio, es sintetizada como un péptido inactivo denominado pre-pro-renina y posteriormente sufre una ruptura en su secuencia y se convierte en pre-renina, que es almacenada en gránulos en donde proteasas como las convertasas y la catepsina B rompen un segmento NH₂-terminal del aminoácido. La renina se convierte así en un péptido activo, pasando de 43 a 40 aminoácidos, y es secretada mediante un mecanismo de exocitosis. La secreción de la renina se encuentra regulada por múltiples factores como las alteraciones en la presión de perfusión renal (señales hemodinámicas), alteraciones en el balance de sodio (señales humorales u hormonales) y la influencia del sistema nervioso simpático (señales neurogénicas). La señalización ocurre directamente por la influencia de estos estímulos o a través de catecolaminas circulantes (Bader y Ganten, 2008; Castro et al., 2010).

El angiotensinógeno es una glicoproteína de 14 aminoácidos producida en el hígado y otros tejidos tales como el corazón, los vasos sanguíneos, el riñón y el tejido adiposo (Ribeiro-Oliveira, 2008). El angiotensinógeno circula como un péptido biológicamente inactivo, el cual es hidrolizado por acción de la renina originando el péptido angiotensina I (Ang I) compuesto por 10 aminoácidos (Ribeiro-Oliveira, 2008). La síntesis del angiotensinógeno es estimulada por la inflamación, la insulina, los estrógenos y glucocorticoides, la hormona tiroidea y la Ang II. Las concentraciones circulantes de angiotensinógeno son iguales a la K_m de la renina para su sustrato (alrededor de 1 μM). Por lo tanto, la síntesis del angiotensinógeno puede modular los niveles circulantes de Ang II, de modo que niveles elevados de angiotensinógeno están relacionados con hipertensión (Jeunemaitre et al., 1992).

La ECA elimina dos aminoácidos amino- o carboxi-terminales de la Ang I originando el octapéptido Ang II, que es el principal componente biológicamente activo de SRA (Fig. 1). La ECA es una metaloproteinasa de zinc compuesta por 1277 aminoácidos que se encuentra distribuida en todo el organismo, incluyendo el sistema nervioso central. Está presente en las células endoteliales, siendo el endotelio pulmonar donde se localiza en una mayor proporción. Además de la Ang I otros sustratos de la ECA son la angiotensina-(1-9) [Ang-(1-9)] y la angiotensina-(1-7),

ambas son degradadas por la ECA ó la bradiquinina (BK), que es inactivada por la ECA (Shi, 2010).

Adicionalmente, existe otra vía por la cual se puede sintetizar Ang II sin involucrar a la ECA. Este mecanismo alternativo se ha detectado en el tejido vascular y, al ser independiente de la ECA, no se ve afectado por los inhibidores farmacológicos de esta enzima. En dicha vía, el angiotensinógeno puede ser convertido directamente en Ang II por efecto de la catepsina G y la tonina (Wolny et al., 1997) La Ang I puede ser convertida en Ang II por acción de la cimasa, la enzima generadora de angiotensina tipo 2 sensible a cimostatina, y la catepsina G. La cimasa puede desempeñar un papel importante para la conversión de Ang I en Ang II en el corazón y en los riñones. En los seres humanos se estima que el 40% de la Ang II circulante procede de vías que no involucran a ECA (Hollenberg et al., 1998).

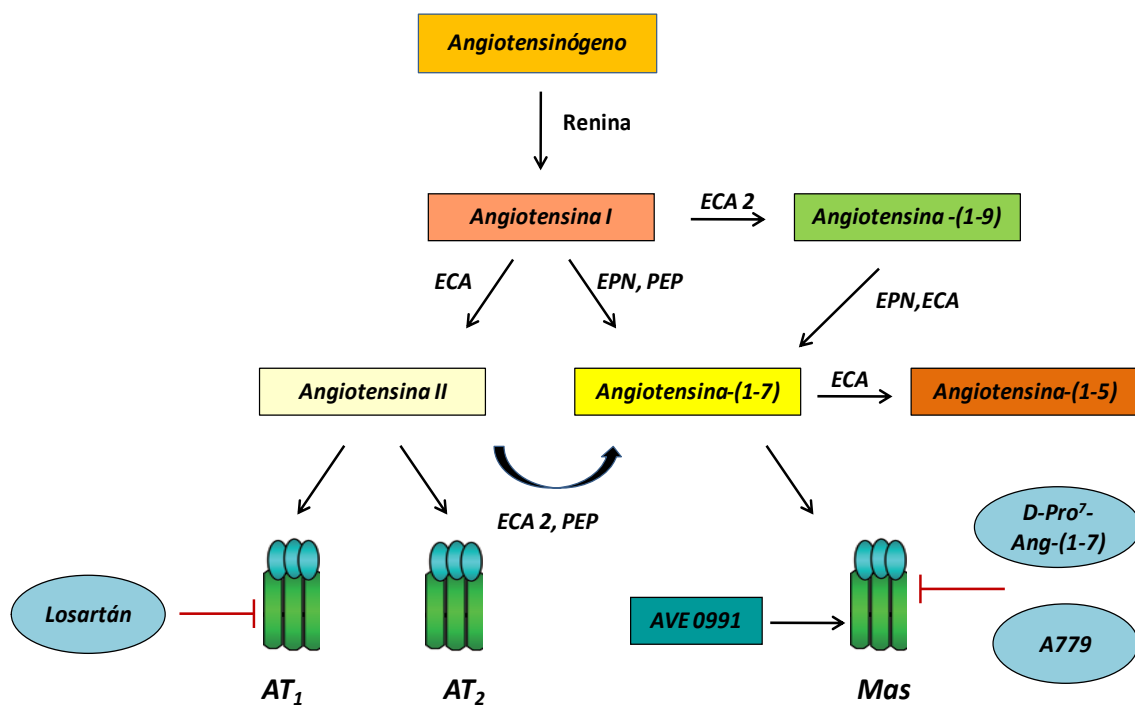


Fig. 1. Esquema del Sistema Renina Angiotensina. Abreviaturas, ECA2: enzima convertidora de angiotensina tipo 2, ECA: enzima convertidora de angiotensina, PEP: prolil-peptidasa, EPN: endopeptidasa neutra, AT₁: receptor de angiotensina tipo 1, AT₂: receptor de angiotensina tipo 2 (Modificado de Lavoie y Sigmund, 2003; Santos, 2005a).

La Ang II es degradada por la aminopeptidasa A en su extremo N-terminal dando por resultado la Ang III, que es un péptido biológicamente activo con efectos similares pero menos potentes que los de la Ang II, capaz de unirse al receptor AT₁ y

con mayor afinidad al AT₂. Asimismo, la Ang III es degradada por la aminopeptidasa N que remueve el aminoácido arginina de su extremo N-terminal originando la Ang IV. Este péptido también puede ser originado a partir de la Ang II por la aminopeptidasa D. Entre las acciones de la Ang IV se incluyen el incremento del óxido nítrico (NO) endotelial en células endoteliales de pulmón y la regulación del transportador de glucosa GLUT-4, lo cual está mediado por su unión al receptor AT₄. En adultos, este receptor se localiza en corazón, pulmón, riñón, cerebro e hígado (Lavoie y Sigmund, 2003; Ribeiro-Oliveira, 2008; Santos, 2005a). La Ang II también es degradada a Ang-(1-7) por la isoforma II de la ECA (ECA 2). La ECA 2 es homóloga en un 42 % a la ECA, pero presenta actividades biológicas distintas (Shi et al., 2010).

1.3 Receptores de Ang II.

1.3.1 Receptor AT₁.

La Ang II se une a dos tipos de receptores, AT₁ y AT₂, que son miembros de la familia de receptores transmembrana acoplados a proteína G. Poseen un 30% de homología en su secuencia, pero funcionalmente son distintos. La mayoría de los efectos de la Ang II, como la vasoconstricción, la estimulación del crecimiento y la fibrosis, están mediados por el receptor AT₁, el cual está constituido por 359 aminoácidos y posee un peso molecular de 40 kD. Este receptor tiene siete dominios transmembrana con un grupo carboxi-terminal localizado en el citoplasma, que traduce las señales y uno amino-terminal glucosilado extracelular que permite la unión al receptor (Miura et al., 2011).

El receptor AT₁ se localiza principalmente en la pared vascular, el pulmón, el hígado, el cerebro y el riñón. A nivel vascular, se encuentra en alta proporción en las células de músculo liso, en bajos niveles en la adventicia y es indetectable en el endotelio (Touyz y Schiffrin, 2000). El receptor AT₁ es regulado por internalización después de su unión a la Ang II, lo que reduce el número de receptores disponibles en la membrana celular provocando una desensibilización de la célula a la Ang II (Castro et al., 2010). Este receptor activa un gran número de vías de señalización que incluyen liberación de fosfolipasas de calcio, la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), la vía de las janus quinasas (JAK), serina/treonina proteína quinasas, pequeñas proteínas acopladas a proteína G, factores de transcripción y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Inagami, 1999; Berk, 1999).

La Ang II, a través de este receptor, también induce vasoconstricción, interviene en la modulación del tono vascular y la presión arterial, contribuye al mantenimiento de la regulación del sodio y la homeostasis del agua e interviene en mecanismos del sistema nervioso central. En la pared vascular, el efecto de la Ang II a largo plazo puede inducir crecimiento celular, migración y diferenciación, apoptosis, así como deposición de la matriz extracelular (Touyz y Schiffrin, 2000) (Tabla 1).

Los inhibidores de la ECA (IECAs) fueron los primeros agentes farmacológicos desarrollados para bloquear el SRA evitando la formación de Ang II. El mecanismo de acción por el cual actúan estos fármacos se basa en que inhiben la actividad de la ECA, lo que evita la conversión de Ang I en Ang II. Sin embargo, no son capaces de inhibir la formación de Ang II llevada a cabo por el mecanismo independiente de la ECA. Existe un gran número de IECAs entre los que se incluyen captopril, enalapril, ramipril y perindopril. Los IECAs disminuyen la presión sanguínea, induciendo una regresión de la hipertrofia ventricular izquierda y una mejora de la función endotelial; es por eso que son altamente efectivos en el tratamiento de la hipertensión y la insuficiencia cardiaca congestiva (Bernstein et al., 2013; Sevá Pessôa et al., 2013).

Los antagonistas del receptor de angiotensina II (ARA), en lugar de actuar reduciendo la formación de Ang II, antagonizan competitivamente los receptores AT₁, inhibiendo su activación por la Ang II. Como consecuencia de ello, la Ang II se une a los receptores AT₂ que no se encuentran bloqueados, lo cual contribuye a los efectos benéficos de estos fármacos. Esto produce un aumento en la liberación de NO, BK, prostaglandinas (PGs) e inhibición del crecimiento y proliferación de células musculares cardíacas, entre otros efectos. Los ARAs empleados en tratamientos antihipersivos son losartán, candesartán, valsartán e ibersartán (Bernstein et al., 2013; Sevá Pessôa et al., 2013).

1.3.2 Receptor AT₂

El receptor AT₂ está compuesto por 363 aminoácidos, posee un peso molecular de 41 kD, se expresa en altos niveles en tejidos fetales y decrece al nacer. En los adultos, se expresa en el páncreas, el corazón, los riñones, las glándulas adrenales, el cerebro y la pared vascular (Touyz y Schiffrin, 2000). A nivel vascular, predomina en la adventicia y es detectable en la media (Uemura et al., 2008). Este receptor puede antagonizar los efectos de la Ang II sobre el receptor AT₁, ya que el receptor AT₂ forma un heterodímero con el receptor AT₁ (Castro et al., 2010). El receptor AT₂ también actúa activando la fosfolipasa A₂, los canales de potasio, la producción de NO, el

guanosín monofosfato cíclico (GMPc) mientras que inhibe los canales de calcio y la guanilato ciclasa (GC) (Horiuchi et al., 1999) (Tabla 1).

En la siguiente tabla se recogen las principales acciones de la Ang II a través del receptor AT₁ y AT₂:

AT₁	AT₂
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Vasoconstricción coronaria, renal y cerebral. ▪ Aumento de la reabsorción de sodio y retención de agua en los túbulos renales. ▪ Estimulación de la liberación de aldosterona. ▪ Aumento de la secreción de vasopresina. ▪ Inhibición de la renina. ▪ Aumento de la formación de ROS ▪ Formación de matriz extracelular. ▪ Aumento de la secreción de endotelina. ▪ Aumento de la contractilidad cardíaca. ▪ Hipertrofia cardíaca. ▪ Proliferación e hipertrofia de las células de músculo liso vascular. ▪ Aumento de la fibrosis miocárdica y vascular. ▪ Aumento de la actividad del SNC y disminución de la actividad vagal. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Antiproliferación celular. ▪ Aumento de la formación de vasodilatadores: NO, prostanoïdes y BK ▪ Diferenciación celular. ▪ Reparación de tejidos. ▪ Efectos apoptóticos en células endoteliales y mensajiales. ▪ Regeneración de la matriz extracelular. ▪ Desarrollo de los riñones y el tracto urinario.

Tabla 1. Principales efectos de la Ang II mediados por los receptores AT₁ y AT₂ (Adaptado y modificado de Santos et al., 2005a, Castro et al., 2010; Crowley y Coffman, 2012).

1.4 El sistema renina angiotensina, en la inflamación y daño vascular.

La Ang II puede actuar como un agente proinflamatorio, capaz de modular la respuesta inmune y la de células inflamatorias como los monocitos. Asimismo, la Ang II está relacionada con la liberación de mediadores proinflamatorios como moléculas de adhesión, quimioquinas y citoquinas, así como con la estimulación de ROS a través del a expresión de factores de transcripción como NF-κB. La expresión de estas moléculas da como resultado la inducción de disfunción endotelial, que se describe más adelante, la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y la proliferación de células de músculo liso, lo que contribuye al desarrollo de enfermedades cardiovasculares, hipertensivas y renales (Sata y Fukuda, 2010). La respuesta

inflamatoria de Ang II se encuentra más relacionada con la Ang II producida localmente que con la Ang II circulante (Shimizu et al., 1998).

1.4.1 Ang II y permeabilidad vascular.

La Ang II incrementa la permeabilidad vascular asociada al daño endotelial por medio de la producción de PGs y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Así, la Ang II promueve la síntesis de PGs, entre las que se incluyen el leucotrieno C₄, protaciclina E₂ (PGE₂) y protaciclina I₂ (PGI₂). También estimula la síntesis y secreción de VEGF en células vasculares de músculo liso y en células endoteliales. Este factor actúa como regulador de la angiogénesis, de la permeabilidad vascular y de la inflamación, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Marchesi et al., 2008). La Ang II incrementa la permeabilidad vascular a través del receptor AT₁, en tanto que la estimulación de AT₂ ejerce el efecto contrario (Victorino et al., 2002).

1.4.2 Ang II e infiltración leucocitaria.

La migración leucocitaria desde la circulación al espacio perivascular es un factor importante para la respuesta inflamatoria. Tanto *in vitro* como *in vivo*, la Ang II induce la adhesión de monocitos y neutrófilos a las células endoteliales mediante la producción de mediadores inflamatorios por el endotelio y el músculo liso vascular, a través de los receptores AT₁ y AT₂. La Ang II induce la síntesis de selectinas, integrinas y miembros de la superfamilia de inmonoglobulinas como la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) (Giancchetti et al., 2005). En el caso de las selectinas, se ha determinado que la Ang II induce adhesión leucocitaria mediada por la E-selectina a través de la vía del receptor AT₁ en células endoteliales de arteria coronaria (Ruiz-Ortega et al., 2001).

La Ang II también contribuye al reclutamiento de células inflamatorias en la pared del vaso mediante la estimulación de citoquinas y quimiocinas presentes en las células vasculares y renales. La proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) puede inducirse en células endoteliales y musculares lisas, monocitos/macrófagos y cardiomiocitos en respuesta a la Ang II y se ha demostrado que actúa como un mediador en la inflamación vascular inducida por Ang II (Kitamoto et al., 2004; Chen et al., 1998). Tanto el uso de IECAs como de ARAs disminuyen la expresión de MCP-1 (Soejima et al., 1999; Martín et al., 2004). Asimismo, se ha descrito que la Ang II puede estimular la producción de MCP-1 a través de NF-κB y la posterior activación de la enzima NADPH oxidasa (Pan et al., 2009). Los niveles elevados de MCP-1 se

han relacionado con enfermedades coronarias, hipertensión, diabetes e hipercolesterolemia (Deo et al., 2004).

Por otra parte, el aumento de la expresión de IL-6 está ligado a un incremento de la activación de los macrófagos y la sobreexpresión de moléculas de adhesión en la pared vascular. La Ang II eleva los niveles de expresión IL-6 en células de músculo liso humano de una manera dependiente de la concentración. Dicha respuesta ocurre a través del receptor AT₁ y es mediada por la activación de NF-κB (Kranzhöfer et al., 1999).

La IL-8 también favorece la adhesión de monocitos al endotelio y su infiltración en la pared vascular, por lo cual está implicado en la aterogénesis. En células humanas de músculo liso, la Ang II induce la expresión de IL-8, lo que se reduce en presencia de estatinas (Ito et al., 2002). Además de los factores mencionados, la Ang II también induce la expresión de IL-1 y TNF-α, los cuales están involucrados en la infiltración leucocitaria (Wu et al., 2001).

1.4.3 Ang II y remodelado tisular.

Los vasos sanguíneos dañados experimentan procesos de reparación relacionados con el crecimiento celular y la fibrosis, lo que contribuye al remodelado vascular. Los procesos de crecimiento involucran hiperplasia y apoptosis en las células de músculo liso vascular (Santos et al., 2005b). Mientras, la fibrosis vascular se asocia a la acumulación de proteínas de la matriz extracelular como el colágeno y la fibronectina (Santos et al., 2005b).

La Ang II estimula la hiperplasia o hipertrofia de las células de músculo liso vascular, a través del receptor AT₁, por medio de la activación del factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), VEGF y el factor de crecimiento análogo a la insulina (IGF). Asimismo, en condiciones fisiopatológicas, induce apoptosis a través del receptor AT₂ en las células de músculo liso vascular (Ruiz-Ortega et al., 2001). En las células endoteliales, la inducción de la apoptosis presenta diferentes efectos sobre la unión de las plaquetas y las células inflamatorias, lo que sugiere un mecanismo promotor de la aterosclerosis (Ruiz-Ortega et al., 2001).

La Ang II ejerce su control sobre el proceso de fibrosis, a través de la transformación del principal factor promotor de la fibrosis, el factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) y actuando a través de las proteínas Smad involucradas

en los sistemas de señalización de dicho factor. También estimula la fibrosis a través del aumento del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), que es una citoquina profibrogénica que actúa como mediador de las actividades del TGF- β . Este factor se encuentra elevado en las lesiones ateroscleróticas humanas (Touyz y Schiffrin, 2000).

El VEGF es un factor importante en el proceso de angiogénesis por su implicación en numerosos mecanismos cuya sobre expresión es regulada por Ang II en células endoteliales cardíacas (Chua et al., 1998; Kim et al., 2009a). En las células de músculo liso de aorta de rata, la Ang II estimula el metabolismo del colágeno y por tanto de la matriz extracelular. Además, disminuye la actividad de las metaloproteinasas de la matriz intersticial (MMPs) y aumenta la generación del inhibidor de las metaloproteinasas. Este proceso de degradación origina un debilitamiento de la pared vascular (Marchesi et al., 2008; Giancchetti et al., 2005). Finalmente, la Ang II también estimula la producción del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), el cual contribuye al estado protrombótico y a la ruptura de la placa aterosclerótica (Savoia y Schiffrin, 2007).

1.4.4 Ang II y estrés oxidativo.

La Ang II es un fuerte modulador de la producción de ROS en la pared vascular, lo que da por resultado la inactivación del NO, eliminando su función vasodilatadora. La Ang II induce la producción de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a través de la activación de la NADPH oxidasa; esta generación de ROS se asocia con disfunción endotelial, proliferación de células de músculo liso vascular, expresión de genes proinflamatorios y reconstrucción de la matriz extracelular. El aumento de la generación de ROS por Ang II está mediado por el receptor AT_1 , a través de rutas intracelulares relacionadas con la proteína C quinasa (PKC), fosfolipasa A_2 y D (Brasier et al., 2002; Garrido y Griendling, 2009; Griendling et al., 1994). Actualmente, se cree que existe un sistema de retroalimentación por el cual la Ang II regula la generación de ROS a través de Nox y esta a su vez regula la expresión y activación del receptor AT_1 (Nishida et al., 2011).

En condiciones fisiopatológicas como la hipertensión, diabetes, aterosclerosis, la activación de NADPH oxidasa por Ang II se encuentra incrementada, generando estrés oxidativo (Polizio et al., 2007; Nguyen Dih et al., 2012). Todos los tipos celulares de la pared vascular, entre los que se encuentran las células endoteliales, las células de músculo liso y las células de la adventicia (fibroblastos y adipocitos) son capaces

de producir ROS a través de las distintas isoformas de la NADPH oxidasa. La Ang II media la producción de ROS en células de músculo liso vascular humano de arterias de conductancia mediante la activación de Nox1, en tanto que Nox2 lo hace en pequeñas arterias de resistencia en el mismo tipo celular (Lassègue et al., 2001 y Touyz et al., 2002). La activación de la NADPH oxidasa inducida por Ang II causa una disfunción mitocondrial en las células endoteliales que amplifica la generación de ROS (Doughan et al., 2008) Por otra parte, la activación de esta enzima por la Ang II está implicada en el deterioro de respuestas a nitrovasodilatadores tanto endógenos como exógenos (Heitzer et al., 1999).

1.4.5 Ang II y la activación de NF- κ B.

El NF- κ B fue descrito por primera vez en las células B (Gilmore y Temin, 1986) y pertenece a una familia de factores de transcripción relacionada con el control de un gran número de procesos, como la respuesta inflamatoria e inmunológica, daño y estrés celular, diferenciación y proliferación celular, apoptosis y cáncer (Gilmore, 2006). Por lo tanto, NF- κ B responde a estímulos entre los que se incluyen las toxinas bacterianas (lipopolisacárido, exotoxina B), productos virales, citoquinas proinflamatorias (como IL-1 β y TNF α) y factores dañinos como los radicales libres y las radiaciones gamma y UV (Ghosh y Karin, 2002). Este factor media la inducción de citoquinas proinflamatorias (IL-2, IL-1 (α y β), TNF- α), moléculas de adhesión (E-selectina, VCAM-1, ICAM-1), quimiocinas (MCP-1), enzimas proinflamatorias (iNOS) y factores de transcripción (p53), los cuales se encuentran involucrados en procesos de inflamación, disfunción endotelial y senescencia cardiovascular (Sun y Ley, 2008; Kempe et al., 2005). La familia de NF- κ B está compuesta por 5 proteínas: Re1A, Re1B, c-Rel, NFKB1 y NFKB2; las proteínas Re1A (p65), Re1B y c-Rel tienen un dominio de transactivación en su residuo C-terminal. En tanto que NFKB1 y NFKB2 son sintetizadas como los precursores p105 y p100, a partir de los cuales se generan las subunidades p50 y p52 respectivamente. El procesamiento de p105 y p100 está mediado por la vía de la ubiquitinación/protosoma y que se relaciona con la degradación del residuo C-terminal que contiene repeticiones de akirina (Hayden y Ghosh, 2008; Oeckinghaus et al., 2011). El NF- κ B reacciona rápidamente a los estímulos (vía canónica) y su respuesta está mediada por receptores en la superficie de la membrana (TNFR, TLR, BCR y TCR en la vía canónica y BAFFR, CD40, LT β R y RAN en la vía no canónica) que permiten su activación y cambio en la expresión de genes (Sun, 2011; Oeckinghaus et al., 2011).

El NF- κ B está controlado por una familia de inhibidores que comprenden a I κ B α , I κ B β y I κ B ϵ . Por lo tanto NF- κ B es inactivo cuando está asociado a las proteínas I κ Bs que contiene repeticiones de akirina, que favorecen que sea retenido en el citoplasma. Cuando es activado por los factores antes mencionados, las vías de señalización recaen en el complejo I κ B quinasa que consiste en dos subunidades catalíticas IKK1/ α e IKK2/ β y una subunidad reguladora IKK γ (NEMO) y ELKS (Karin y Ben-Neriah, 2000; Ducut Sigala et al., 2004). Existen dos vías de activación: la vía canónica o clásica y la vía no canónica o alternativa. En la vía canónica, las señales IKK β e IKK γ fosforilan las proteínas I κ B en el residuo serina del dominio N-terminal, que posteriormente son poliubiquitinizadas y degradadas por el proteosoma. El NF- κ B liberado se transloca al núcleo y se une a las secuencias de ADN de genes específicos regulando su transcripción (Fig. 2) (Pahl, 1999).

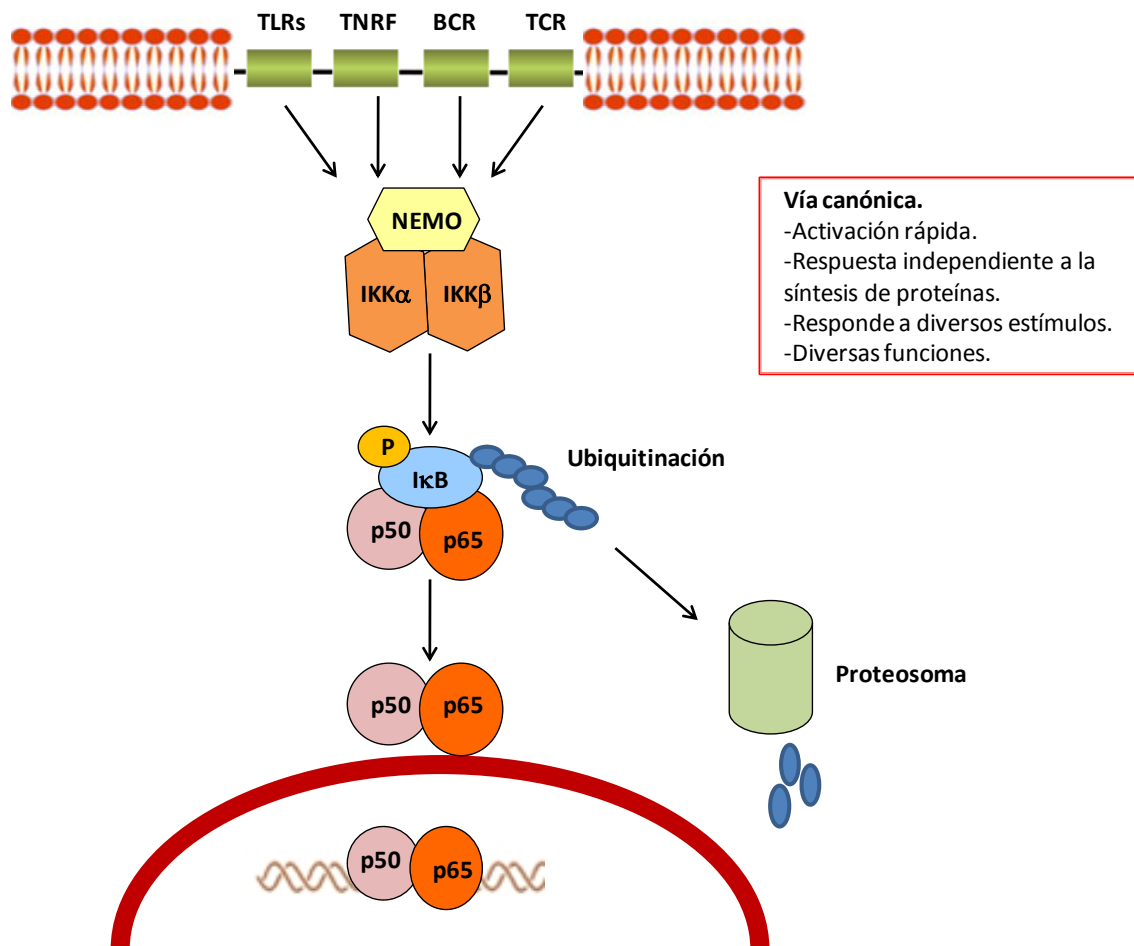


Fig. 2. Vía canónica de activación del NF- κ B. Esta vía es activada por numerosos estímulos, las señales IKK fosforilan las proteínas I κ B, que posteriormente son poliubiquitinizadas y degradadas por el proteosoma; permitiendo la translocación al núcleo del heterodímero de NF- κ B (p50 y p65) (Adaptado de Oeckinghaus et al., 2011; Sun, 2011).

Esta ruta es estimulada por una gran mayoría de estímulos fisiológicos, entre ellos los implicados en el proceso inflamatorio y la apoptosis (Oeckinghaus et al., 2011). En la vía no canónica, la activación NIK (quinasa inductora de NF- κ B) produce la fosforilación y procesamiento a través del proteosoma del precursor p100 en la subunidad p52, en lugar de I κ B α . Posteriormente, p52 se dimeriza con RelB para formar el complejo RelB/p52 que puede unirse al ADN y regular la expresión de distintos tipos de señales (Sun, 2011). Esta vía de señalización regula funciones biológicas como la organogénesis linfoide, la supervivencia y maduración de las células B, la activación de las células dendríticas y el metabolismo de los huesos (Dejardín, 2006).

La producción de ROS y la activación de factores de transcripción proinflamatorios como el NF- κ B también son elementos involucrados en la inducción del remodelado vascular y la inflamación producida por la Ang II. El NF- κ B es activado por Ang II a través de los receptores AT₁ y AT₂, por lo cual actúa como mediador de su respuesta inflamatoria en varios tipos celulares, incluidos las células de músculo liso y las endoteliales; *in vivo* se ha determinado en la pared vascular, el corazón y los riñones en modelos de rata (Muller et al., 2001). La activación de NF- κ B en respuesta a Ang II ha sido abolida con el uso de ARAs *in vivo* e *in vitro* (Ruiz-Ortega et al., 2000; Dandona et al., 2003; Cheng et al., 2005). El NF- κ B regula las moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1 en múltiples tipos celulares. Además, estimula la expresión del gen que codifica el angiotensinógeno, lo que da por resultado la amplificación de la respuesta inflamatoria mediada por Ang II (Li y Zhuo, 2008).

2. EL EJE ANGIOTENSINA-(1-7)/RECEPTOR Mas.

2.1 Síntesis y degradación de angiotensina-(1-7).

La angiotensina 1-7 o Ang-(1-7) es un heptapéptido derivado del SRA que tiene una vida media corta de 29-30 minutos en el ser humano. La principal enzima involucrada en la síntesis de la Ang-(1-7) es la ECA 2, que se localiza principalmente en el endotelio de las arterias coronarias e intrarenales y en epitelio renal tubular (Shi, 2010). La Ang-(1-7) es sintetizada directamente a partir de la Ang II por la ECA 2, que hidroliza el aminoácido fenilalanina del residuo C-terminal, pero también por la prolil-peptidasa (PEP) y la prolil-carboxipeptidasa (PCP) (Fig.1) (Castro-Chaves et al., 2010).

La Ang-(1-7) también puede ser producida directamente a partir de la Ang I a través de endopeptidasa neutra (EPN) y PEP. Asimismo, es posible la generación de este péptido a partir de la conversión de Ang I a Ang-(1-9) y posteriormente a Ang-(1-7), por la acción de la ECA y de EPN (Santos y Ferreira, 2006). Finalmente, la Ang-(1-7) es metabolizada por la ECA originando la Ang-(1-5) como metabolito inactivo. El tratamiento con IECAs aumentan (5-25 veces) el nivel circulante de Ang-(1-7) en varias especies, incluyendo la humana (Allred et al., 2000). Una vez sintetizada la Ang-(1-7) puede ser hidrolizada por aminopeptidasas generando Ang-(2-79 y Ang-(3-7) (Santos et al., 2000). En el riñón la EPN puede hidrolizar el enlace 4-tirosina, 5-isoleucina de la Ang-(1-7) para formar Ang(1-4) y el tripéptido Ile-His-Pro (Chappell et al., 2001). Además, la hidrólisis de la Ang-(1-7) por la ECA genera la formación de la Ang-(1-5) (Chappell et al., 1998).

2.2 Acciones biológicas de la Ang-(1-7).

La Ang-(1-7) fue descubierta como un producto del metabolismo de la Ang I en homogenizados de cerebro canino (Santos et al., 1988). Durante mucho tiempo este heptapéptido fue considerado como un producto biológicamente inactivo del SRA, hasta que Schiavone y colaboradores demostraron *in vitro* que la Ang-(1-7) liberaba, similarmente a la Ang II, vasopresina en explantes neurohipofisiales (Schiavone et al., 1988). Posteriormente se demostró que una microinyección de dosis bajas de Ang-(1-7) disminuían la presión arterial en el núcleo del tracto solitario del bulbo raquídeo (Campagnole-Santos et al., 1989). A partir de lo anterior, se han realizados numerosos estudios que han demostrado la actividad biológica de la Ang-(1-7) hasta ser considerada el derivado más pleiotrópico de la Ang II. Asimismo, se ha demostrado que la Ang-(1-7) exhibe efectos opuestos o modula las acciones de la Ang II, por lo que se ha considerado como un antagonista fisiológico y contrarregulador de la Ang II (Santos et al., 2000). La Ang-(1-7) puede afectar las respuestas de la Ang II mediadas por el receptor AT₁: compitiendo por la unión al receptor AT₁, modulando la señalización de este receptor y afectando la síntesis de los receptores AT₁ (Santos et al., 2005b).

La Ang-(1-7) ejerce sus principales acciones a nivel cardiovascular, del sistema nervioso y renal (Fig. 3). En humanos, la concentración de Ang-(1-7) en las venas renales es mucho mayor que en la circulación sistémica (Admiraal et al., 1990) por lo que en pacientes hipertensos se observó que la concentración de este heptapéptido en la orina se encuentra reducida (Ferrairo et al., 1998). La Ang-(1-7) ha sido descrita como un potente agente natriurético/diurético regulando el transporte de

sodio a través de los túbulos proximales (DelliPizzi et al., 1994). En contraste, también se ha determinado en ratas que la Ang-(1-7) produce antidiuresis en un mecanismo que involucra al receptor Mas, AT₁ y AT₂ y el receptor de vasopresina (Magaldi et al., 2003; Santos et al., 1996). Además, la Ang-(1-7) aumentó el flujo sanguíneo renal en ratas (Sampaio et al., 2003) y produjo relajación arterial aferente a través de la liberación de NO en riñones de conejo (Ren et al., 2002). En otros estudios este heptapéptido, a través del receptor Mas, inhibió la estimulación de las MAPK inducida por Ang II en las células del túbulo proximal (Su et al., 2006).

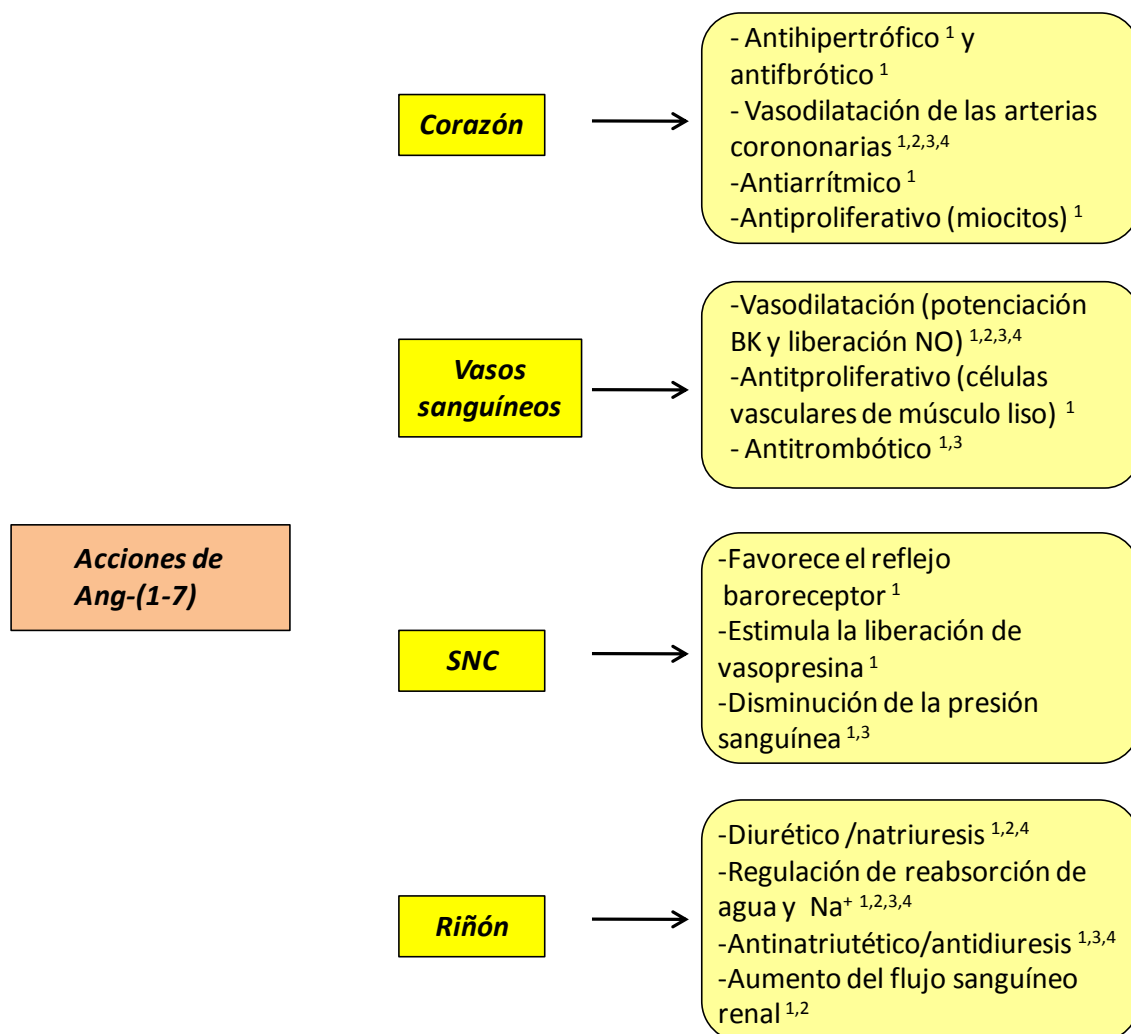


Fig 3. Acciones biológicas de la Ang-(1-7) (Modificado de Höcht et al., 2009; Santos et al., 2008a). De acuerdo a lo reportado en la literatura, en la siguiente figura se exponen los receptores que median las acciones de la Ang-(1-7). 1: vía el receptor Mas, 2: vía el receptor B₂ de BK, 3: vía AT₁, 4: AT₂.

En el cerebro, la Ang-(1-7) es generada en el área medular y el hipotálamo por lo que puede actuar como un importante neuromodulador del control del tono de la

presión arterial (Averill y Diz, 1999; Höcht et al., 2009). En ratas, una infusión intracerebroventricular de Ang-(1-7) produjo un mejor control del reflejo baroreceptor del control del ritmo cardiaco lo que fue abolido cuando se administró A779 (Campagnole-Santos et al., 1992). La administración intrahipotalámica de Ang-(1-7) bloqueó la respuesta causada por Ang II disminuyendo la presión arterial sanguínea (Höcht et al., 2008).

2.2.1 Acciones vasculares de la Ang-(1-7).

La Ang-(1-7) es parte de los componentes del SRA local presente en el corazón, tanto en humanos como en otras especies (Zisman et al., 2003). Además, se ha localizado en el tejido cardiaco el receptor Mas y la ECA 2, la enzima por la que se forma mayoritariamente la Ang-(1-7) a partir de Ang II (Santos et al., 2006; Harmer et al., 2002).

Dentro de las principales acciones de la Ang-(1-7) se encuentran su capacidad para regular la expresión de proteínas de la matriz extracelular y el remodelado cardiaco, actuando como un agente antifibrótico. Este heptapéptido se une a los fibroblastos cardiacos de rata influyendo en el remodelado cardiaco e inhibe el incremento de la síntesis de colágeno inducida por Ang II (Iwata et al., 2005). La delección del receptor Mas produce un deterioro de la función cardiaca asociada a un incremento de colágeno tipo I, III y fibronectina en el corazón (Gava et al., 2012). Por otra parte, la Ang-(1-7) ejerce un efecto protector contra la fibrosis pulmonar y la hipertensión pulmonar, reduciendo la fibrosis y el remodelado cardiaco en modelos de hipertensión estimulada por Ang II, lo cual claramente indica el efecto antifibrótico de la Ang-(1-7) (Shenoy et al., 2010; McCollum et al., 2008; Mercure et al., 2008).

El efecto antihipertrófico de la Ang-(1-7) en cardiomiocitos tratados con Ang II se previene por el bloqueo de la vía del NO/GMPc, lo que sugiere que la Ang-(1-7) ejerce su efecto antihipertrófico por la estimulación de la producción de NO y la activación de eNOS y Akt (Tallant et al., 2005; Días-Peixoto et al., 2008; Gomes et al., 2010).

La Ang-(1-7) también ejerce un efecto antriproliferativo, induciendo la producción de prostaciclina y activando la vía AMPc-dependiente de proteínas quinasas (Tallant y Clark, 2003). En un modelo de daño vascular mediante denudación de la arteria carótida izquierda de rata, la infusión de Ang-(1-7) atenúa la formación de neoíntima en la arteria dañada (Strawn et al., 1999). La Ang-(1-7) disminuye el crecimiento de cardiomiocitos después de un infarto al miocardio inhibiendo la vía de

MAPK; este efecto se bloquea por el antagonista A779, lo que sugiere que las propiedades antiproliferativas están mediadas por el receptor Mas (Tallant et al., 2005).

La Ang-(1-7) ha sido descrita como un agente vasodilatador en numerosos lechos vasculares como la aorta de rata, las arterias coronarias caninas y porcinas y el lecho vascular sistémico felina, entre otros (Schindler et al., 2007). Se ha descrito que este heptapéptido induce vasodilatación principalmente por una potenciación de la respuesta vasodilatadora de la BK, un incremento de la síntesis de prostanoides y un aumento en la liberación de NO de las células endoteliales, aunque el mecanismo depende del lecho vascular, el diámetro de los vasos y la especie estudiada (Schindler et al., 2007; Feterik et al., 2000; Santos et al., 2013). En ciertos lechos vasculares, como el lecho vascular mesentérico felino, se ha determinado que el efecto vasodilatador de la Ang-(1-7) es mediado por NO (Osei et al., 1993). En arterias del antebrazo de hombres sanos normotensos, la Ang-(1-7) potencia el efecto vasodilatador de BK a través de un mecanismo que involucra la liberación de NO en estas arterias, además de contrarrestar el efecto vasoconstrictor de la Ang II (Ueda et al., 2000 y 2001).

Los efectos de la Ang-(1-7) en las células endoteliales están mediados por cambios en el balance redox en la pared vascular vía receptor Mas. La Ang-(1-7) induce la liberación de NO mediante una fosforilación (residuo Ser¹⁷⁷⁷) /desfosforilación de eNOS (residuo Thr⁴⁹⁵) involucrando la activación de la enzima fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)-akt, en tanto que el antagonista del receptor Mas, A779, bloquea los efectos de Ang-(1-7) sobre eNOS (Pinheiro et al., 2004; Sampaio et al., 2007a). En estudios previos de nuestro grupo de investigación se ha observado que el receptor Mas está implicado en la correcta síntesis de NO endotelial y la respuesta vasodilatadora no solo a la Ang-(1-7) sino también a diferentes agonistas independientes del SRA, tales como BK y ACh (Peiró y et al., 2007). Paralelamente, la Ang-(1-7) inhibe la producción de ROS mediadas por Ang II en células endoteliales (Polizio et al., 2007). Por el contrario, en ratones con una deleción de Mas se observa un aumento de ROS y una disminución de NO, perjudicando la relajación dependiente de endotelio y causando un incremento de la presión arterial (Rabelo et al., 2008 y Xu et al., 2008). Los niveles plasmáticos de la Ang-(1-7) están incrementados durante el tratamiento con IECAs y ARAs, por lo que se ha sugerido que una parte de sus efectos podrían estar mediados por la Ang-(1-7) (Ferrario, 2006).

Por otra parte, el efecto terapéutico de la Ang-(1-7) se ha relacionado también con una variación en los niveles endógenos y actividad de este péptido y de la ECA 2 en condiciones patológicas. En el corazón, la ECA 2 está localizada principalmente en el endotelio vascular, el músculo liso vascular y los cardiomiocitos (Bader, 2013). En relación a esto, se ha demostrado que la actividad de la EPN y la ECA 2 están incrementadas en la insuficiencia cardíaca ventricular, lo que sugiere que el aumento de los niveles de Ang-(1-7) ejercen un efecto cardioprotector en esta enfermedad (Zisman y et al., 2003). La delección genética de ECA 2 incrementa significativamente la formación de placa en modelos de ratones con arterosclerosis o deficientes en el receptor LDL; por el contrario, en modelos que sobre-expresan ECA 2 se observa una disminución en la formación de la placa (Thomas et al., 2010; Zhang et al., 2010; Lovren et al., 2008).

2.3 La Ang-(1-7) como adipoquina.

2.3.1 Obesidad, tejido adiposo y la secreción de adipoquinas.

La obesidad es considerada por la organización mundial de la salud (OMS) como uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial (Fig. 4). El sobrepeso y la obesidad son la quinta causa de defunciones en el mundo. (OMS, 2012). La obesidad puede ser un factor desencadenante de diferentes tipos de padecimientos como la diabetes mellitus tipo-2, hipertensión, hiperlipidemia, enfermedad arterial coronaria, apnea del sueño, osteoartritis, enfermedad crónica del riñón, ciertos tipos de cáncer y llevar a una disminución de la expectativa de vida. (Whitlock et al., 2009).

El grado de obesidad y sobrepeso de una persona se determina mediante el índice de masa corporal (IMC), que es un indicador de la relación entre el peso y la talla. Se obtiene mediante una fórmula aritmética dividiendo el peso de una persona (kilos) por el cuadrado de su talla (kg/m^2) (OMS, 2012). De acuerdo a la OMS los valores de IMC indican lo siguiente: Un $\text{IMC} \leq 25$ determina sobrepeso y un $\text{IMC} \leq 30$ determina obesidad.

El tejido adiposo está distribuido en todo el organismo y se divide en dos tipos: tejido adiposo blanco y tejido adiposo pardo, que a su vez se diferencian en su composición celular. El tejido adiposo pardo es abundante en los neonatos y tiene una función termogénica debido a que los adipocitos pardos queman grasa produciendo calor, regulando la temperatura corporal. Este tejido se compone de células cargadas de lípidos con una alta densidad de mitocondrias, a lo que debe su color oscuro (Cannon et al., 2004).

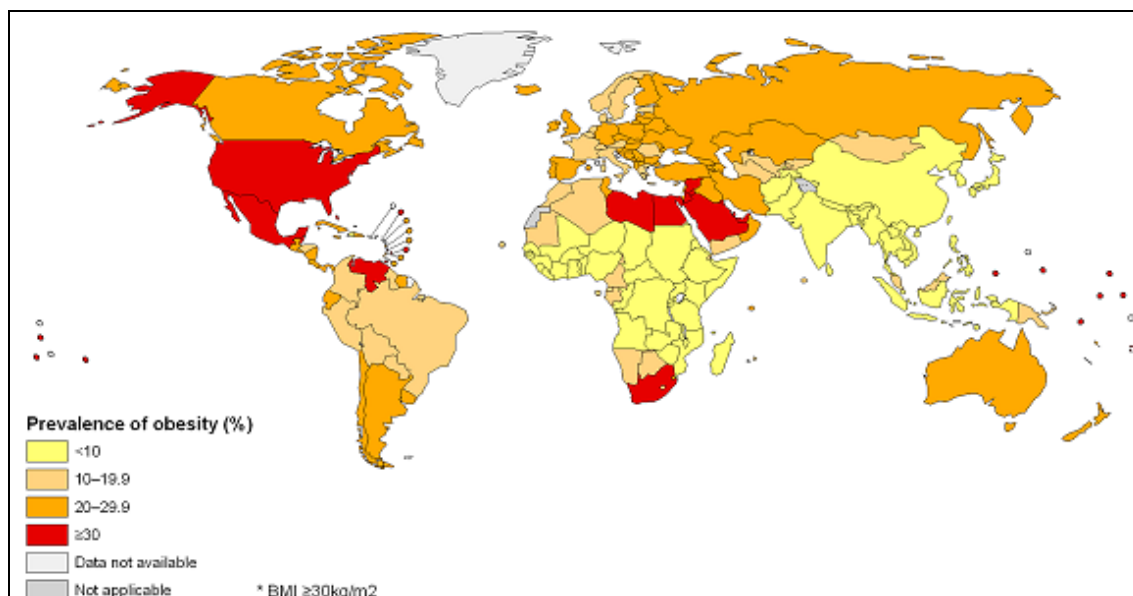


Fig. 4. Mapa mundial de la prevalencia de la obesidad (porcentaje de adultos de ambos sexos con un IMC>30) (OMS, 2011).

El tejido adiposo blanco se encuentra en mayor proporción, representa del 20% al 25% del peso corporal y sus funciones están relacionadas con el almacenamiento y movilización de energía. Este contiene una fracción vascular estromal, que incluye adipocitos, preadipocitos, células endoteliales, células musculares lisas, fibroblastos, leucocitos y macrófagos, además de estructuras tisulares como vasos sanguíneos y nervios (Brake et al., 2008; Mariman y Wang, 2013). El tejido adiposo blanco se distribuye en dos tipos de localizaciones: tejido adiposo visceral y subcutáneo, que a su vez difieren en su función endocrina, su actividad lipolítica, su composición celular y su respuesta a la insulina (Ibrahim, 2010). El tejido adiposo visceral se encuentra localizado a nivel mesentérico, perigonadal, perirrenal y retroperitoneal, con una gran capacidad de expansión, por lo cual un exceso de acumulación de ácidos grasos conduce a la obesidad. El tejido adiposo subcutáneo está localizado debajo de la piel y principalmente contribuye a la conservación del calor corporal (Wajchenberg, 2000).

Otra función del tejido adiposo blanco es funcionar como un órgano endocrino fuente de sustancias biológicamente activas llamadas adipoquinas. Las adipoquinas a su vez pueden ejercer su acción a nivel endocrino, paracrino y autocrino (Leal y Mafra, 2013). El concepto del tejido adiposo como órgano secretor se originó con el descubrimiento de la leptina en 1994 (Zhang et al., 1994). En el término adipoquinas se incluyen un amplio número de hormonas, citoquinas inflamatorias, quimiocinas, factores de crecimiento y proteínas como la leptina, visfatina, adiponectina, resistina, TNF- α , MCP-1, factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF), IL-8, IL-6, IL-

1, VEGF, PAI-1, entre otros. Estos compuestos tienen funciones sobre el control del balance de energía, el apetito, la inmunidad, la presión sanguínea, la angiogénesis, la homeostasis y el metabolismo de la glucosa y los lípidos. Cuando existe un gran almacenamiento de tejido adiposo blanco (principalmente visceral) se puede producir un desbalance de la secreción de un gran número de adipoquinas, lo que conduce al desarrollo de patologías relacionadas con la obesidad, como la disfunción endotelial, inflamación, aterosclerosis, diabetes mellitus y enfermedad crónica renal (Ronti et al., 2006). El tejido adiposo blanco visceral presenta una mayor actividad endocrina que el subcutáneo (Maeda et al., 1997) y se caracteriza por sintetizar en mayor medida VEGF, PAI-1 e IL-6 (Fain et al., 2004), en tanto que el tejido blanco subcutáneo sintetiza preferentemente leptina y adiponectina (Van Harmelen et al., 1998; Fisher et al., 2002). Las adipoquinas se sintetizan en distintos sitios; la leptina y la adiponectina se sintetizan en los adipocitos, en tanto que otras adipoquinas por células localizadas en el tejido de la matriz y otras por los macrófagos (Galic et al., 2010).

Es conocido que la disfunción endotelial también puede estar ligada a la obesidad, que a su vez está asociada con un incremento en la mortalidad por ser un factor de riesgo en el desarrollo de la arterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares. Los mecanismos por los que la obesidad puede inducir disfunción endotelial son muy variados debido a que el tejido adiposo puede inducir cambios metabólicos, entre los que se encuentran dislipidemia, elevación de la presión arterial, aumento de la inflamación por la secreción de citoquinas proinflamatorias, estrés oxidativo y cambios en el metabolismo de la glucosa (Williams et al., 2002; Avogaro y Kreutzenberg, 2005).

Un buen número de adipoquinas secretadas por el tejido adiposo blanco están asociadas a la inflamación. Esto se correlaciona con lo observado en pacientes obesos que presentan un nivel elevado de marcadores inflamatorios y desarrollan características asociadas a la inflamación crónica. La obesidad se asocia a niveles elevados de proteína C reactiva (CRP), resistina, PAI-1, TNF- α e IL-6 y moléculas de adhesión y niveles bajos de adiponectina, lo cual perjudica la homeostasis de la glucemia (induce resistencia a la insulina), la función endotelial y la coagulación, todo lo cual favorece la aterosclerosis. El crecimiento y expansión de los depósitos de adipocitos durante el proceso de obesidad está relacionada con la inflamación, debido al aumento de la filtración de monocitos y su activación dentro del tejido adiposo. Posteriormente, los adipocitos se convierten en una fuente de factores inflamatorios, en tanto que el tejido adiposo en general mantiene un ambiente adecuado para que se desencadene una respuesta inmune que propague el estado inflamatorio (Trayhurn

y Wood, 2005; Juge-Aubre et al., 2005; Ntaios et al., 2013). La obesidad también está asociada con un aumento de la apoptosis y necrosis de adipocitos en el tejido adiposo blanco y pardo, lo que induce las señales de señalización para el reclutamiento de monocitos (Cinti et al., 2005). Los macrófagos promueven la secreción de TNF- α e IL-6 y el almacenamiento ectópico de los lípidos dentro del hígado y los tejidos musculares (Heilbronn y Campbell, 2008).

También se ha correlacionado el estrés oxidativo con la obesidad; así, en pacientes obesos se ha observado un aumento de ROS que alteran los lípidos, proteínas y aminoácidos (Dandona et al., 2001). Asimismo, la peroxidación de lípidos está incrementada en obesos y puede contribuir a la inflamación crónica de bajo grado asociada a esta patología (Daví et al., 2002). Por otra parte, los ácidos grasos libres también se encuentran elevados en la obesidad, lo que induce lipotoxicidad y estrés oxidativo, conduciendo al proceso inflamatorio (Boden, 2008). Además, tanto los agentes inflamatorios como la acumulación de lípidos pueden afectar al retículo endoplasmático, provocando su estrés y aumentando la inflamación (Tsiotra y Tsigos, 2006).

Entre las adipoquinas identificadas, mencionaremos a la visfatina la cual está involucrada en el presente estudio de investigación. La visfatina es una de las adipoquinas secretadas por el tejido adiposo, que se identificó como una tal en 2005, producida principalmente por el tejido blanco adiposo visceral (Fukuhara et al., 2005). Tiene un peso molecular de 52 kD y está constituida por 491 aminoácidos (Sommer et al., 2008). Originalmente fue descrita como un mimético no competitivo de la insulina, al observarse que la administración de visfatina reducía los niveles de glucosa en plasma de ratones resistentes y/o deficientes en insulina (Fukuhara et al., 2005). Sin embargo, poco tiempo después los autores de este artículo tuvieron que retractarse debido a la falta de reproducibilidad de sus resultados (Fukuhara et al., 2007).

La visfatina presenta una estructura idéntica al factor incrementador de colonias de células B (PBEF), una citoquina de 52 kD que promueve la maduración de las células B en el sistema inmune (Samal et al. 1994), así como de la enzima nicotinamida fosforribosil transferasa (Nampt), que cataliza el paso limitante en la producción del dinucleótido de nicotina-adenina (NAD⁺) (Revollo et al., 2007). A consecuencia de esto, en la literatura se refieren a esta adipoquina como visfatina/PBEF/Nampt. Por su parte, PBEF es expresado de manera ubicua en múltiples células y tejidos y está involucrada en una gran cantidad de acciones biológicas (Stephens et al., 2006).

La Nampt es una enzima que cataliza el paso limitante en la ruta de la síntesis de NAD^+ , que es un cofactor importante en las reacciones redox que ocurren en las células. En el primer paso de la reacción, Nampt sintetiza el mononucleótido de nicotinamida (NMN) y pirofosfato inorgánico (PPi), a partir de nicotinamida 5-pirofosforibosil-1-pirofosfato (PPP). A continuación, el NMN es transformado en NAD^+ por la acción de la enzima mononucleótido de nicotinamida adenil transferasa (Nmnat) (Fig. 5) (Revollo et al., 2004). Esta vía de síntesis de NAD^+ es activada cuando la célula requiere un aporte mayor de NAD^+ , como en el proceso de reparación del ADN llevado a cabo por poli-ADP-ribosilación y para el correcto funcionamiento de las proteín-desacetilasas dependientes de NAD^+ (Van der Veer et al., 2005; Kirkland, 2010).

Se han descrito 2 formas de Nampt en mamíferos: la Nampt intracelular, que ayuda a mantener la actividad de las enzimas cuya actividad depende de NAD^+ y por lo tanto tiene una gran importancia en el mantenimiento del metabolismo (Revollo et al., 2004), y la Nampt extracelular, que es secretada por diferentes tipos celulares al espacio extracelular. De acuerdo a esta clasificación, la actividad de la visfatina es extracelular (Van der Veer et al., 2005).

Estudios recientes en humanos han relacionado los niveles aumentados de visfatina en plasma con la obesidad, la diabetes tipo 2, el síndrome metabólico y las enfermedades cardiovasculares (Zahorska et al., 2007; Zhong et al., 2008; Chang et al., 2011). La visfatina está implicada en la regulación de procesos inflamatorios, ya que se ha determinado que activa leucocitos humanos e induce la producción de citoquinas (Moschen et al., 2007). En monocitos CD4^+ , la visfatina induce la producción de $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$ e IL-6 y aumenta la superficie de expresión de las moléculas co-estimuladoras CD50 , CD40 y CD80 (Moschen et al., 2007). Además, esta adipocina media la estimulación de monocitos, aumentando la inducción de respuestas alo-proliferativas en linfocitos, mientras que, *in vivo*, la visfatina aumenta las concentraciones de IL-6 en ratones (Li et al., 2008). En células endoteliales, la visfatina induce la expresión de MCP-1 e IL-6 mediante la activación de las vías de señalización p38, MAPK, PI3K y ERK 1/2 (Liu et al., 2009).

Asimismo, se ha demostrado que la visfatina puede ejercer un efecto inflamatorio en el músculo liso vascular humano, a través de la inducción de iNOS mediada por la activación del eje $\text{ERK1/2} - \text{NF-}\kappa\text{B}$, mediada por su actividad Nampt (Romacho et al., 2009). En el tejido adiposo blanco perivascular, los niveles elevados de visfatina estimulan la producción de mononucleótido de nicotinamida, el cual

desencadena el crecimiento de las células musculares lisas a través de la activación de ERK 1/2 y MAPKs quinasas (Wang et al., 2009).

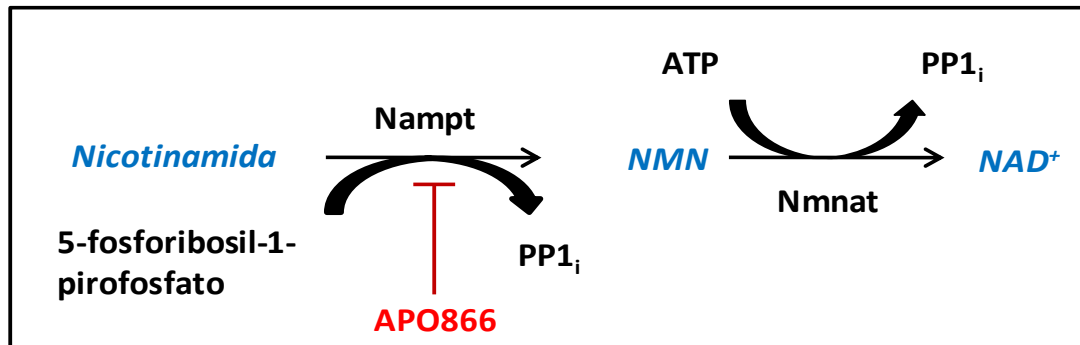


Fig. 5. Diagrama que representa la actividad Nampt. La actividad nicotinamida fosforribosil transferasa (Nampt) conduce a la síntesis de dinucleótido de nicotina-adenina (NAD⁺) (Peiró et al., 2010).

En células endoteliales, por su parte, la visfatina incrementa considerablemente los valores de ICAM-1 y VCAM-1 y, como consecuencia, induce la adhesión leucocitaria. El aumento de la expresión de las moléculas de adhesión involucra la activación NF- κ B por la visfatina, lo que relaciona a la citoquina como causante de disfunción endotelial (Kim et al., 2008). En estudios en placas ateroscleróticas de carótida humana, niveles elevados de visfatina se han localizado en macrófagos de lesiones inestables, lo que sugiere que contribuye a la desestabilización de la placa y pone de manifiesto su papel aterogénico (Dahl et al., 2007).

Estudios recientes en células endoteliales humanas de cordón umbilical han determinado que la visfatina, a través de su actividad Nampt, puede inducir estrés oxidativo mediante la activación de la enzima NADPH oxidasa (Vallejo y Romacho et al., 2011). Paralelamente, se ha demostrado que esta adipoquina deteriora la relajación dependiente de endotelio en microvasos mesentéricos, tanto humanos como de rata, a través de la estimulación de la NADPH oxidasa, y asimismo mediante su actividad Nampt (Vallejo y Romacho et al., 2011).

2.3.2 La Ang-(1-7) una adipoquina beneficiosa.

En el tejido adiposo humano se han detectado todos los componentes del SRA, como Ang II, Ang-(1-7), angiotensinógeno, renina, ECA y los receptores AT₁ y AT₂ (Schiling et al., 1999). El SRA del tejido adiposo presenta funciones autocrinas y paracrinas relacionadas con la modulación de la lipogénesis, lipólisis, adipogénesis y la inflamación, tanto a nivel local como sistémico (Kalupahana y Moustaid-Moussa, 2012; Cassis et al., 2008). También puede participar en la patogénesis de la

hipertensión arterial asociada a la obesidad, puesto que alteraciones en la actividad de RAS están relacionadas con variaciones en el peso y la masa del tejido adiposo (Dorresteijn et al., 2012; Engeli et al., 2005). Asimismo, se ha determinado que la Ang II incrementa a nivel intracelular los niveles de ácidos grasos libres, lo que puede contribuir al aumento de su liberación asociado a la obesidad (Jones et al., 1997). Las acciones de Ang II están relacionadas con la inducción de un proceso inflamatorio, a través de la producción de ROS y la inactivación de NO que previamente ha sido detallado.

La Ang-(1-7) junto con la adiponectina y la leptina son consideradas como adipocinas cuyas acciones son beneficiosas y protectoras. En el tejido adiposo blanco perivascular se ha detectado la secreción y liberación de Ang II y Ang-(1-7); esta última es parcialmente responsable de los efectos anticontráctiles en este tejido (Gálvez-Prieto et al., 2008). La inhibición del receptor Mas bloquea parcialmente la acción vasodilatadora de Ang-(1-7), tanto en aorta (Lee et al., 2009) como en vena cava de rata (Lu et al., 2011). Este mismo efecto se ha observado en ratones knockout para el receptor Mas (Lee et al., 2011).

El metabolismo de los lípidos también es regulado por la Ang-(1-7); en ratones knockout para el receptor Mas, se observa un deterioro en el metabolismo de los lípidos, lo que produce dislipidemia, baja tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, disminución de la secreción de adiponectina y aumento de la grasa abdominal (Santos et al., 2008b). Adicionalmente, se ha descrito, en un modelo de rata transgénica que expresa niveles elevados en plasma de Ang-(1-7), una disminución de tejido adiposo y de los niveles de triglicéridos, colesterol y angiotensinógeno y un aumento de los niveles de adiponectina (Santos et al., 2010).

2.4 Receptores de Ang-(1-7): el receptor Mas.

La Ang-(1-7) ejerce la mayor parte de sus acciones a través del receptor Mas, que está acoplado a proteínas G y posee acciones contrarias a la Ang II. Este receptor está codificado por el protooncogen Mas y en un inicio fue identificado *in vivo* por sus propiedades tumorales; posteriormente, se caracterizó como un protooncogen que codifica una proteína con 7 dominios transmembrana hidrofóbicos, que constituye el receptor Mas. La presencia de este receptor ha sido detectada en corazón, aparato reproductor, riñones, cerebro y vasos sanguíneos (Zohn et al., 1998; Santos et al., 2003). Las acciones de la Ang-(1-7) a través del receptor Mas son bloqueadas por

antagonistas específicos del receptor Mas, como la D-Ala⁷-Ang-(1-7) (A779) y el D-Pro⁷-Ang-(1-7) (Santos y Ferrerira, 2006).

Algunos estudios han reportado que la Ang-(1-7) tiene baja afinidad por el receptor AT₁ pero a altas concentraciones puede competir por la unión a este receptor y generar efectos similares a la Ang II (Gironacci et al., 1999; Oudot et al., 2005). A concentraciones fisiológicas la Ang-(1-7) antagonizó la activación de la PKC y ERK1/2 inducida por Ang II, actuando como un modulador endógeno de las respuestas de Ang II mediadas por AT₁ (Zhu et al., 2002). En ratones con delección del receptor Mas se determinó que la acción de la Ang II mediada por el receptor AT₁ estaba alterada, provocando una disminución de la amplitud de los potenciales de campo respecto a las condiciones basales (VonBohlen und Halbach et al., 2000). Además, la exposición previa a Ang-(1-7) o Ang II causa una disminución en el número de receptores AT₁ en el riñón (Clark et al., 2003). En otro estudio se demostró que el receptor puede hetero-oligomerizar con el receptor AT₁ causando la inhibición de las acciones de la Ang II (Kostenis et al., 2005).

La Ang-(1-7) tiene baja afinidad por el receptor AT₂ sin embargo, en ratas hipertensas tratadas con candesartán, la Ang-(1-7) causó una reducción de la presión sanguínea que no fue modificada por A779 pero si fue bloqueada por PD123319 (Walters et al., 2005). En corazones de rata tratados con PD123319, la Ang-(1-7) produjo un incremento de la presión de perfusión que no fue atribuida al receptor Mas o AT₁ (Castro et al., 2005).

Por otra parte, el mecanismo de la potenciación de BK por Ang-(1-7) se relaciona con la inhibición de ECA, la liberación de NO y/o PGs o la interacción con el receptor B₂ de BK (Schmaier, 2003). En algunos estudios en ratas la inhibición de la ECA facilitó la potenciación de la actividad de BK mediada por Ang-(1-7) a través del receptor Mas (Lima et al., 1997). Mientras que en ratas la indometacina previno la actividad de BK inducida por Ang-(1-7) (Paula et al., 1995).

2.5 Modulación farmacológica del Eje ECA 2/Ang-(1-7)/receptor Mas.

El uso terapéutico de la Ang-(1-7) está limitado porque es degradado rápidamente por enzimas proteolíticas plasmáticas o la ECA por lo que su vida media es de 10-15 (Yamada et al., 1998). Para evitar estos inconvenientes se han desarrollado estrategias farmacológicas que mejoran la administración y la farmacocinética de este heptapéptido. El primer compuesto análogo de la Ang-(1-7) producido químicamente fue el AVE 0991, un agonista no peptídico del receptor Mas y

oralmente activo, que mimetiza los efectos de la Ang-(1-7) (Wiemer et al., 2002). Este péptido sintético estimula la producción de NO cinco veces más que la Ang-(1-7), mejorando la función endotelial (Wiemer et al., 2002). La liberación de NO mediada por AVE 0991 fue abolida por A779 pero no por antagonistas del receptor AT₁ y ÁT₂, lo que demostró su especificidad por el receptor Mas (Pinheiro et al., 2004). La acción del AVE 0991 se ha determinado en varios órganos, incluyendo la pared vascular, el riñón y el corazón. La administración de AVE 0991, a través del receptor Mas, mejora la función cardíaca en corazones de rata afectados por infarto al miocardio y disminuye el área de infarto (Ferreira et al., 2007a). Este agonista sintético también mejora la función cardíaca y atenúa el desarrollo de fibrosis e hipertrofia en corazón de rata espontáneamente hipertensa, previniendo el daño cardíaco a largo plazo (Ferreira et al., 2007b; Benter et al., 2006). Recientemente se ha propuesto que el AVE 0991 es capaz de disminuir la expresión de mediadores inflamatorios (MCP-1, IL-6 e IL-12) en modelos de arterosclerosis en ratones (Jawien et al., 2012). Dado que a concentraciones altas la Ang-(1-7) puede unirse a los receptores AT₁ reduciendo los efectos benéficos del receptor Mas debe buscarse la dosis adecuada para la administración del AVE 0991.

Adicionalmente se han desarrollado dos compuestos agonistas sintéticos del receptor Mas, el CGEN-856S y CGEN-857S, cuya estructura química no se relaciona con la de la Ang-(1-7), pero exhiben una alta afinidad de unión al receptor Mas (Shemesh et al., 2008). El CGEN-856S ejerce efectos antiarrítmicos en rata hipertensa y disminuye la presión arterial de manera dependiente de la concentración, lo que pone de manifiesto el papel benéfico del receptor Mas en patologías cardiovasculares (Savergnini et al., 2010).

Actualmente se ha sintetizado una formulación en la cual se inserta Ang-(1-7) en una cavidad formada por el oligosacárido hidroxipropil β-ciclodextrina (HPβCD), que permite su administración oral porque protege al péptido durante su recorrido por el tracto gastrointestinal. La administración crónica de HPβCD/Ang-(1-7) atenuó el deterioro de la función cardíaca y el remodelado cardíaco inducido por isoproterenol y el infarto de miocardio en ratas (Marques et al., 2011). La administración aguda de este compuesto aumentó los niveles plasmáticos de Ang-(1-7) causando efectos antitrombóticos dependientes de su unión al receptor Mas (Fraga-Silva et al., 2011).

Análogamente se ha generado un compuesto basado en la ciclación de la Ang-(1-7) que le confiere protección contra las rupturas proteolíticas. La Ang-(1-7) ciclada indujo, a través de su unión al receptor Mas, una vasorelajación dos veces mayor que

la Ang-(1-7) no ciclada en anillos de aorta de rata (Kluszens et al., 2009). La administración subcutánea de este compuesto disminuyó la presión arterial y mejoró la función endotelial en modelos de rata de infarto de miocardio (Durik et al., 2012). También se ha desarrollado un sistema de liposoma para Ang-(1-7) cuya microinyección en la región ventrolateral medular del cerebro de ratas mejoró la presión arterial y el ritmo cardíaco (Silva-Barcellos et al., 2001).

Actualmente se ha propuesto una herramienta farmacológica centrada en el eje ECA 2/Ang-(1-7)/receptor Mas. Existen compuestos, como el XNT, que pueden interactuar en sitios específicos de la ECA 2 causando un cambio conformacional en su estructura que provoca un aumento de su actividad enzimática. El XNT provocó una reducción en la presión arterial, un mejoramiento de la función cardíaca y una reversión de la fibrosis cardíaca y renal en modelos de ratas hipertensas así como un aumento de la expresión de Ang-(1-7) y disminución de la activación de ERK1/2 (Hernández-Prada et al., 2008). Este compuesto también mejoró la hipertensión en un modelo de hipertensión pulmonar en rata que fue abolido por el A779 (Ferreira et al., 2009). Estos datos sugieren que la activación de ECA 2 aumenta la producción de Ang-(1-7) mediante la degradación de Ang II. Sin embargo, la ECA 2 también se encuentra relacionada con la degradación de apelina-13, neurotensina (neuromodulador), quinestensina, dinorfina (regulación del dolor) y fragmentos de BK por lo que la degradación de dichos compuestos pueden generar efectos adversos a nivel metabólico y neurológico (Höcht et al., 2009).

La Ang-(1-7) circula en el plasma a concentraciones similares a las de la Ang II, después de la inhibición de la ECA, por lo cual se ha sugerido que dicha enzima puede constituir un importante punto de inactivación de la Ang-(1-7) circulante y en los tejidos (Yamada et al., 1998). En tanto que el uso de IECAs y ARAs pueden incrementar la actividad de la ECA 2 y/o en 25 veces los niveles de Ang-(1-7) (Allred et al., 2000), en varios estudios se ha determinado que el incremento de los niveles endógenos de Ang-(1-7) se relacionan con los efectos benéficos de dichos fármacos como la disminución de la presión sanguínea (Fernandes et al., 2005), el mejoramiento del baroreflejo (Heringer-Walther et al., 2001) y el efecto antitrombótico (Kucharewicz et al., 2002). Los efectos de los IECAs están mediados por un incremento de la BK, PGI₂ y aumento de la disponibilidad de NO que, a su vez, están relacionados con las acciones de la Ang-(1-7) (Höcht et al., 2009).

3. MECANISMOS DE DAÑO VASCULAR.

3.1 Endotelio y óxido nítrico.

El endotelio está constituido por una monocapa de células endoteliales que reviste el interior de los vasos sanguíneos, formando una interfase entre la sangre circulante en el lumen y la pared del vaso. Inicialmente el endotelio se consideró una capa inactiva pero con el paso de los años se le han atribuido numerosas funciones como la traducción de señales y la liberación de sustancias que contribuyen a la homeostasis vascular. El endotelio controla la migración y proliferación de las células de músculo liso de manera directa, mediante la producción de promotores o inhibidores del crecimiento, o indirecta, a través de la inhibición de la activación de las plaquetas las cuales son ricas en factores de crecimiento para las células musculares lisas. El endotelio también desempeña un papel importante en la regulación de respuestas inflamatorias vasculares. Adicionalmente, modula la fluidez del flujo y coagulación del flujo sanguíneo manteniendo el balance entre la liberación de mediadores trombogénicos y antitrombogénicos. Finalmente, regula el tono vascular conservando el balance entre dilatación y constricción (Cines et al., 1998; Landmesser et al., 2004; Lerman y Zeiher, 2005). El endotelio modula el tono vascular mediante el mantenimiento del balance en la secreción de agentes vasodilatadores como el NO, PGI₂, el factor hiperpolarizante derivado de endotelio y el péptido natriurético tipo C; y agentes vasoconstrictores como la Ang II, la endotelina-1, el tromboxano A₂ y ROS (Verma y Anderson, 2002). Dentro de los factores vasodilatadores el más descrito es el NO (Deanfield et al., 2007). En 1980 Furchgott y Zawadzki describieron que las relajaciones inducidas por acetilcolina (Ach) en aorta de conejo estaban mediadas por una sustancia relajante producida en el endotelio a la que llamaron factor de relajación derivada de endotelio (Furchgott y Zawadzki, 1980); años más tarde se determinó que se trataba del NO (Ignarro et al., 1987).

El NO es un radical libre gaseoso sintetizado a partir del aminoácido L-arginina y el oxígeno molecular (O₂), en una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS) dando como resultado la L-citrulina y el NO. La enzima NOS actúa como un heterodímero que está formado por un dominio reductasa y otro oxidasa. El dominio reductasa contiene sitios de unión para el mononucleótido de flavina (FMN), el fosfato dinucleótido nicotinamina adenina (NADPH) y calmodulina. En tanto que el dominio oxigenasa contiene un grupo hemo y es responsable de la unión de la L-arginina y el cofactor tetrahidrobiopterina (BH₄). A través de la oxidación de NADPH en el dominio reductasa, los electrones puede ser transportados del dominio reductasa por FMN y el

dinucleótido de adenina flavina (FAD), al grupo hemo del dominio oxidasa. Posteriormente, los electrones fluyen del grupo hemo al O₂ y cataliza la formación de NO (Ghosh et al., 1996; Chen et al., 2002a). Existen tres isoformas de NOS: la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS o NOS-3), la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS o NOS-1) y la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS o NOS-2). Cabe mencionar que tanto eNOS como nNOS son constitutivas, en tanto que iNOS es inducible. Para llevar a cabo la reacción, los tres tipos de NOS emplean una serie de cofactores entre los que se incluyen NADPH, FMN, FAD, BH₄ y el grupo hemo. En la tabla 2 se resumen las características más importantes de las isoformas de NOS (Forstermann et al., 1995; Alderton et al., 2001; Huang, 2009).

<i>Isoforma</i>	<i>Localización</i>	<i>Expresión</i>	<i>Cofactor</i>	<i>Liberación NO</i>	<i>Regulación</i>	<i>Funciones biológicas</i>
nNOS NOS-1 (160 kD)	Soluble, citosol	Constitutiva	BH ₄ NADPH FAD FMN	Moderada (nM- μM)	Regulable Dependiente de Ca ⁺	Neurotransmisión Funciones autonómicas Aprendizaje
iNOS NOS-2 (130 kD)	citosol	No constitutiva	BH ₄ NADPH FAD FMN	Alta (μM)	Transcripcional No dependiente de Ca ⁺	Inflamación Respuesta inmunológica
eNOS NOS-3 (135 kD)	Membrana	Constitutiva	BH ₄ NADPH FAD FMN	Baja (pM- nM)	Regulable Dependiente de Ca ⁺ Fosforilación	Vasodilatación Adhesión leucocitaria Proliferación celular

Tabla 2. Características principales de las isoformas de la enzima NOS. Abreviaturas, nNOS: sintasa de óxido nítrico neuronal, iNOS: sintasa de óxido nítrico inducible, eNOS: sintasa de óxido nítrico endotelial, NADPH: dinucleótido de nicotinamina adenina fosfato, FAD: dinucleótido de adenina favina, FMN: mononucleótido de favina, BH₄: tetrahidrobiopterina.

En las células endoteliales esta reacción se lleva a cabo por la isoforma eNOS y depende de la interacción con Ca²⁺/Calmodulina para transferir los electrones al grupo hemo (Craig et al., 2002). Diversas sustancias vasoactivas como ACh, serotonina, BK, trombina, histamina, vasopresina, noradrenalina y la sustancia P; conducen a un aumento de la concentración de calcio intracelular que produce la activación de eNOS (Schiffrin, 2001). La actividad de eNOS también puede ser mediada por PI3K que a su vez activa a la proteína quinasa B (PKB) o a la Akt, que fosforilan a eNOS en el residuo serina 117 permitiendo su funcionamiento (Huang, 2009). Factores como la insulina, VEGF, estrógenos, leptina y el estrés mecánico emplean la vía de Akt/PKB para activar eNOS (Dimmeler et al, 1999). Una vez

producido el NO difunde a las células de músculo liso y activa a la GC, que cataliza la desfosforilación del guanosín trifosfato a GMPc, que a su vez activa a las proteínas quinasas dependientes de GMPc (PKGs). Este tipo de quinasas regulan funciones celulares muy importantes como la relajación del músculo liso. La PKGs fosforilan proteínas que disminuyen las concentraciones de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), que son necesarias para la activación de las cadenas ligeras reguladoras de miosina, mediadoras de fosforilaciones/desfosforilaciones que generan la contracción; por lo tanto, una disminución de ($[Ca^{2+}]_i$) provoca la respuesta vasodilatadora en el músculo liso (Fig.6) (Rybalkin et al., 2003, Schlossmann et al., 2000; Sholossmann et al., 2003; Aksoy et al., 1983).

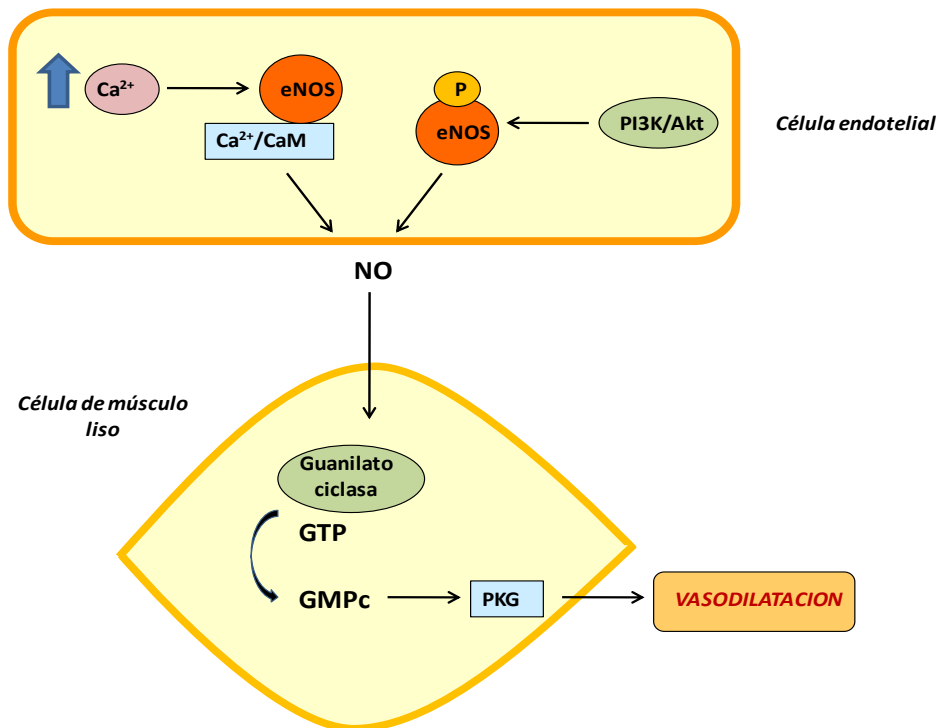


Fig. 6. Regulación de la actividad de eNOS. La activación de eNOS puede regularse por dos mecanismos: (a) un aumento de ($[Ca^{2+}]_i$) y (b) una fosforilación de eNOS vía el mecanismo $PI3K/Akt/PKB$ (Adaptado de Huang, 2009).

3.2 Disfunción endotelial, óxido nítrico y estrés oxidativo.

La disfunción endotelial se ha relacionado con el desequilibrio de la producción de mediadores vasoactivos en el endotelio, lo que genera un empeoramiento de la respuesta vasodilatadora a estímulos como BK o ACh (Endemann y Schiffrin, 2004). La disfunción endotelial fue descrita por primera vez en el lecho vascular del antebrazo humano (Panza et al., 1990) y se ha descrito posteriormente en diferentes vasos, incluyendo pequeñas arterias de resistencia (Park et al., 2001). Una inapropiada

respuesta vasodilatadora produce una alteración y empeoramiento del tono vascular, favorece la formación de trombos, y se asocia con un aumento de la inflamación vascular así como de la proliferación y crecimiento de las células de músculo liso (Drexler y Hornig, 1999).

Existen diferentes causas que pueden disminuir la producción de NO, entre las que se encuentra una decremento de la actividad de eNOS, una reducción en los niveles ARNm de eNOS, una disminución de la disponibilidad del sustrato L-arginina y los cofactores para eNOS, así como una acelerada degradación de NO por un aumento de la producción de ROS (Gao et al., 2007). La carencia del factor BH₄ produce un desacoplamiento de eNOs en la reducción de oxígeno y la oxidación de la arginina, lo que lleva a la generación de O₂⁻, que al ponerse en contacto con el NO, reaccionan rápidamente para dar lugar al radical peroxinitrito (ONOO⁻) una molécula altamente reactiva (Vásquez-Vivar, 2009). El ONOO⁻ es un agente citotóxico oxidante que produce la nitración de proteínas mediante su unión a los residuos de tirosina transformándolos en nitrotirosina, actúa como mediador de la oxidación de LDL y reduce la biodisponibilidad de BH₄ en el endotelio y el músculo liso (Koppenol et al., 1992). Todas estas acciones ponen de manifiesto su papel en la disfunción endotelial y en la aterosclerosis, en donde se han encontrado niveles elevados de este radical (Sucu et al., 2003)

La generación de ROS juega un papel central en la disfunción endotelial porque, como se ha mencionado anteriormente, favorece la inactivación de NO. Los principales ROS son el O₂⁻, el H₂O₂ y el radical (OH[•]); estos últimos pueden ser generados por una serie de interacciones moleculares a partir de O₂⁻ (Valko et al., 2007). A nivel cardiovascular, las especies que revisten más importancia son O₂⁻ y H₂O₂ (Ardanaz y Pagano, 2006). Bajo condiciones fisiológicas normales, la interacción entre agentes oxidantes y antioxidantes se encuentra balanceada. Por lo tanto, el estrés oxidativo surge cuando aumenta la producción de ROS o cuando el sistema antioxidante se encuentra disminuido y es incapaz de reducirlo (Scandalios, 2005; Valko et al., 2007). El exceso de ROS puede causar daño en proteínas, membranas celulares y ADN, causando un importante daño que puede llevar a la muerte celular (Takeya y Sumimoto, 2006).

3.2.1 NADPH oxidasa.

La principal fuente de producción de estrés oxidativo en las células endoteliales y de músculo liso vascular es la NADPH oxidasa, cuya activación está relacionada con

factores clínicos de riesgo y disfunción endotelial (Griendling, 2000). Otras fuentes de generación de ROS son la xantina oxidasa, la sobreproducción mitocondrial de O_2^- y, como ya se ha indicado, la eNOS desacoplada (Landmesser et al., 2002; Endemann y Schiffrin, 2004). En esta sección se describen las principales características de la enzima NADPH oxidasa, que es parte del objeto de estudio de esta investigación.

La NADPH oxidasa es una enzima que se encuentra asociada a la membrana que cataliza la reducción de O_2^- , empleando el NADPH o NADH como donadores de electrones (Fig. 7). El prototipo de esta enzima ha sido bien caracterizado en los fagocitos, en los cuales se ha determinado que está constituida por una subunidad catalítica compuesta por gp91phox (Nox2) y p22phox, que conforman el citocromo b558 y un componente citosólico compuesto por 3 subunidades p47phox, p67phox y proteínas G de bajo peso molecular, pertenecientes a la familia Rac. La subunidad p47phox favorece la unión de p67phox, mientras que Rac favorece el ensamblaje y la actividad del complejo de la NADPH oxidasa. La subunidad p22phox está implicada en la producción de O_2^- (Soccio et al., 2005). Las células endoteliales tienen las mismas subunidades que la NADPH de los fagocitos, en tanto que en el músculo liso vascular la gp91phox está formada por otra proteína denominada Mox (Nox1) (Garrido y Griendling, 2009). Una vez que se estimula la enzima, las 3 unidades citosólicas se translocan al complejo del citocromo, produciendo un aumento de la actividad de la NADPH oxidasa, lo cual se ha observado especialmente en células endoteliales y en fibroblastos de la adventicia; también puede activarse mediante su ensamblaje, lo que está ligado a la actividad constitutiva de esta enzima (Lasségue y Clempus, 2003).

Existen 7 isoformas de Nox expresadas en distintos tipos de tejidos: Nox1, Nox2, Nox4 y Nox5 se encuentran en el tejido vascular y son las responsables de la mayor generación de ROS en el sistema cardiovascular. La Nox4 es activa de manera constitutiva pero, en las células endoteliales y células musculares lisas, es regulada por distintos factores (Bedard y Krause, 2007; Brandes y Schröder, 2008). La isoforma Nox 1 se expresa en las células endoteliales y musculares lisas, mientras que la Nox 2 se expresa en el endotelio, en las células adventicias de los grandes vasos y en las musculares lisas de los vasos pequeños (Gorlach et al., 2000). En el tejido vascular se ha determinado que las Nox se ubican mayormente en el espacio intracelular en tanto que en neutrófilos se localizan cerca o en la membrana plasmática (Lasségue y Clempus, 2003).

La activación de la NADPH oxidasa puede ser inducida por hormonas vasoactivas (Ang II, endotelina-1, aldosterona), factores de crecimiento (factor de

crecimiento derivado de plaquetas), citoquinas, fuerzas mecánicas y factores de riesgo cardiovascular (presión arterial elevada, lípidos oxidados, tabaquismo). Por otra parte, los ROS producidos por esta enzima influyen en el proceso de constricción/vasodilatación, el crecimiento de las células de músculo liso, apoptosis, senescencia, respuestas inflamatorias, fibrosis, migración y calcificación (Brandes et al., 2005; Briones y Touyz, 2010; Garrido y Griendling, 2009).

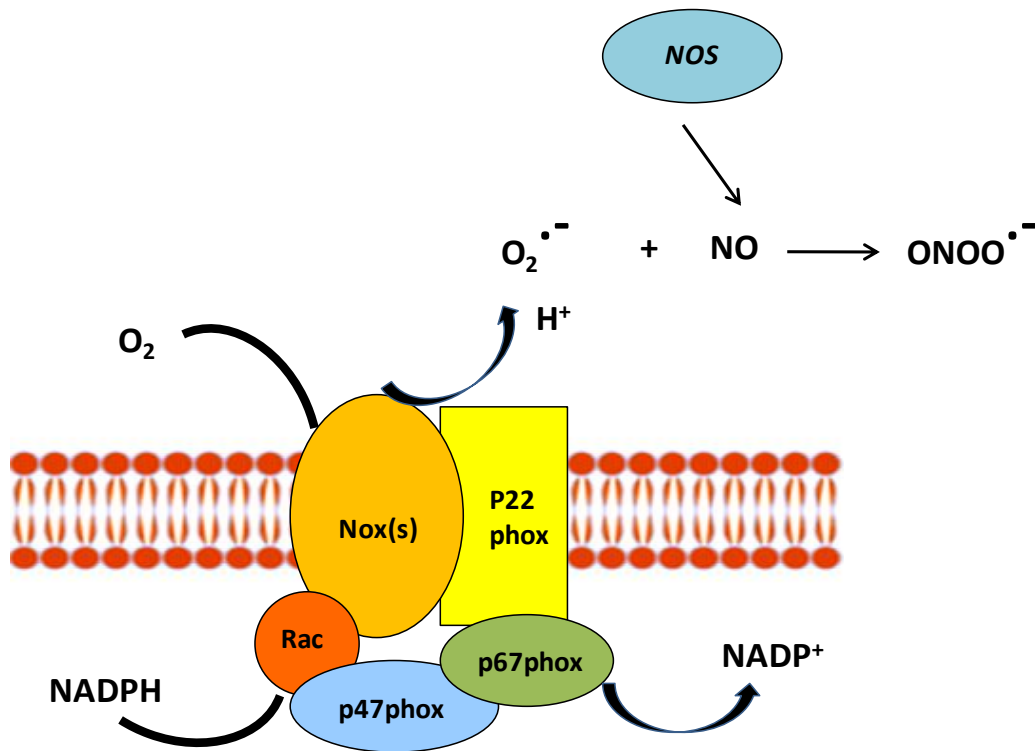


Fig. 7. Estructura de la NADPH oxidasa. La enzima NADPH oxidasa está compuesta por una subunidad catalítica (gp91phox (Nox) y p22phox9) y una subunidad citosólica (p47phox, p67phox y Rac). Su actividad lleva a la generación de superóxido (O₂^{•-}), que reacciona con NO, para formar el radical peroxinitrito (ONOO^{•-}) (Adaptado de Briones y Touyz, 2010; Garrido y Griendling, 2009).

La enzima NADPH oxidasa está involucrada en el desarrollo de la arterosclerosis, en la hipertensión inducida por Ang II y en la vasculopatía diabética (Briones y Touyz, 2010). En células de músculo liso vascular, la Ang II vía receptor AT₁ incrementa la actividad de la NADPH oxidasa por un aumento de la expresión de la subunidad p22phox, involucrando a la proteína quinasa C, fosfolipasa D, c-Src y receptores de tirosina quinasa (Rajagopalan et al., 1996; Touyz et al., 2002; Touyz y Schiffrin, 2001). La relación entre la Ang II, ROS y disfunción endotelial se ha determinado en modelos de animales hipertensos. De acuerdo a esto, se ha observado en vasos de ratas con hipertensión inducida por Ang II un aumento de la

actividad de la NADPH oxidasa, y por lo tanto en la producción de O_2^- , que se manifestó por un deterioro de la relajación dependiente de endotelio (Ushio-Fukai et al., 1996). También se ha determinado que el O_2^- derivado de gp91 (Nox 2) está involucrado en el desarrollo de la hipertensión, porque induce la inactivación de NO y el remodelado vascular en el músculo liso vascular (Rey et al., 2002).

Por otra parte, se ha establecido que un aumento de las subunidades p47phox, p22phox, gp91phox, Nox1 ARNm y Nox4 ARNm contribuyen al desarrollo de las lesiones ateroscleróticas (Lassègue y Clempus, 2003). En relación a esto, en ratones con delección de Nox1 disminuye la inducción del gen de la apolipoproteína E (ApoE), lo que se traduce en una reducción de la formación de lesiones (Sheenan et al., 2011). La NADPH oxidasa también parece estar sobre-expresada en una gran variedad de tejidos durante la obesidad. En modelos de ratas obesas se ha determinado que la isoforma Nox4 está sobre-expresada en la aorta, en tanto que los niveles de p22phox y p47phox están incrementados en el tejido adiposo (Jiang et al., 2011). Niveles aumentados de la Nox 5 se han detectado también en pacientes con enfermedad cardíaca coronaria (Guzik et al., 2008).

3.3 Aterosclerosis.

La disfunción endotelial se considera un evento temprano en el desarrollo de la aterosclerosis e incluso se ha llegado a definir como un biomarcador de esta patología progresiva que se caracteriza por una acumulación de lípidos y elementos fibrosos en las arterias. Hoy en día se considera que esta enfermedad se asocia a un componente inflamatorio que está involucrado en la generación de la lesión, su evolución y la potencial ruptura de la placa (Lusis, 2000). El paso que inicia el proceso de arterosclerosis es la acumulación de LDL en la matriz subendotelial, lo que se favorece porque la disfunción endotelial facilita su permeabilidad a esta capa. Esta acumulación es grande cuando los niveles circulantes de LDL son elevados, lo que ayuda a la formación de lesiones. Las proteínas LDL difunden pasivamente a través de las uniones de las células endoteliales y su retención en la pared del vaso depende de interacciones entre la apolipoproteína B (constituyente de LDL) y los proteoglicanos de la matriz. Una vez interiorizadas, las LDL son modificadas en la pared del vaso, lo que incluye procesos de oxidación, lipólisis, proteólisis y agregación que contribuyen al proceso inflamatorio. La acumulación de LDLs oxidados estimula a las células endoteliales a producir moléculas proinflamatorias entre las que se incluyen moléculas de adhesión y factores de crecimiento, como el factor estimulante de colonias de

macrófagos (M-CSF), además de producir la inhibición de NO (Libby et al., 2011; Inoue et al., 2011).

En el proceso de arterosclerosis existe un reclutamiento de monocitos y linfocitos T. Después del contacto con las LDLs, comienza la fase de reclutamiento de monocitos por las células endoteliales. Las integrinas E-selectina y P-selectina controlan la primera adhesión entre los leucocitos y el endotelio, se unen a los carbohidratos de la superficie de los leucocitos estimulando su migración del torrente sanguíneo y su rodando hacia la superficie endotelial a la que se unen. Durante esta etapa muchos leucocitos no se activan y se despegan volviendo al torrente sanguíneo (Giancchetti et al., 2005). La segunda etapa de la adhesión, donde los leucocitos se unen mas firmemente, está controlada por la molécula de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, expresadas en el endotelio y que facilitan la migración de la pared endotelial al tejido subyacente (Collins et al., 2000; Frank y Lisante, 2008). Cuando los monocitos se encuentran en la íntima se convierten en macrófagos activados que, al fagocitar los LDLs, se transforman en macrófagos espumosos que constituyen la estría grasa. Tanto los macrófagos activados como los espumosos liberan citoquinas (TNF- α e IL-1 β), factores de crecimiento (factor de crecimiento derivado de plaquetas y de fibroblastos), M-CSF, MCP-1 y enzimas proteolíticas (MMPs). Estos factores inducen el reclutamiento de monocitos y la migración de células de músculo liso de la media hacia la íntima vascular, favoreciendo su proliferación, la liberación de mediadores de inflamación y la síntesis de tejido conectivo, provocando el engrosamiento de la capa íntima y formando una placa fibrosa (Fig. 8) (Glass y Witztum, 2001).

Los linfocitos T también se encuentran en la lesión y son activados por los macrófagos, a partir de ello secretan citoquinas como el interferón- γ (IFN γ), TNF- α y TNF- β , lo que amplifica la respuesta inflamatoria. El IFN γ inhibe la proliferación del músculo liso vascular y la producción de componentes de la matriz celular como el colágeno intersticial (Libby, 2002). Esto, junto con otros factores como la apoptosis de macrófagos que favorece la necrosis de la placa o la activación de las MMPs a partir de una disminución de NO y un exceso de estrés oxidativo, genera que la placa se debilite y se rompa. La rotura de placa favorece la formación de trombos obstruyendo el flujo sanguíneo y generando un proceso isquémico (Tabas, 2010; Eberhardt et al, 2000).

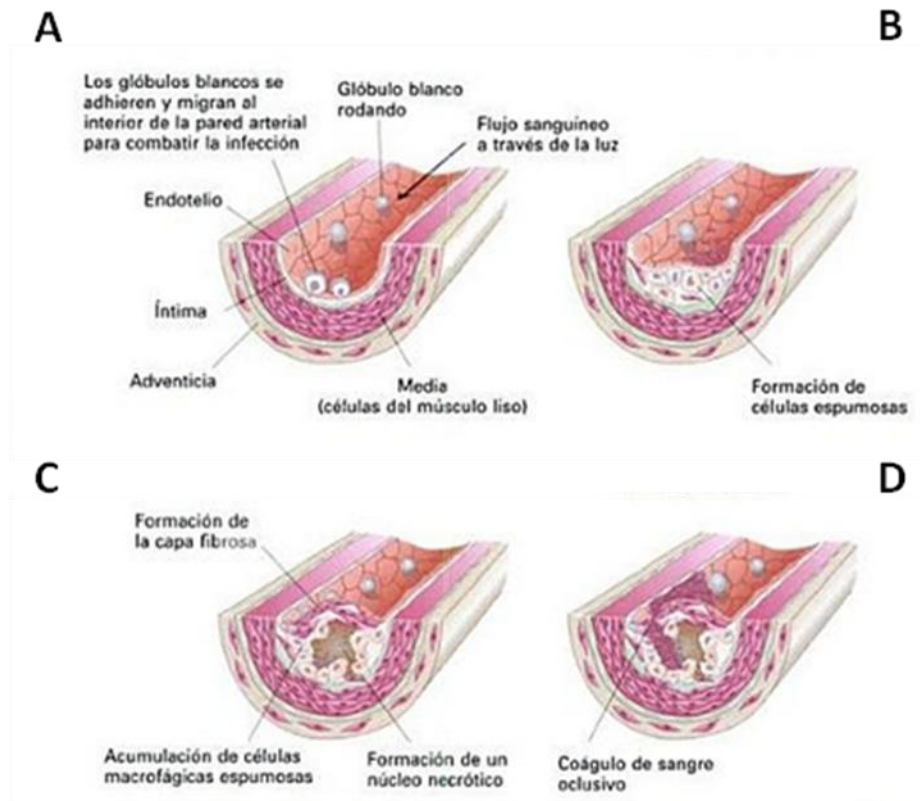


Fig. 8. Etapas principales del comienzo y progresión de la aterosclerosis en la pared arterial. A: pared arterial normal, B: etapa del depósito de grasa, C: Etapa de la placa aterosclerótica, D: rotura del endotelio y formación de coágulo oclusivo (Modificado de Ross, 1999).

3.3.1 Inflamación crónica de bajo grado.

La inflamación crónica de bajo grado en la pared vascular es un factor importante en el desarrollo de la fisiopatología de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, aterosclerosis y enfermedad coronaria (Savoia y Schiffrin, 2007). Este ambiente inflamatorio se caracteriza por un aumento en la pared vascular de la expresión de moléculas de adhesión y ligandos (CD11A/CD18, CD11B/CD18 y VLA-4), extravasación de leucocitos, aumento de estrés oxidativo, producción de citoquinas, activación de células del sistema inmune y de vías de señalización proinflamatorias, así como una inducción de remodelado vascular que se asocia con un incremento del crecimiento y proliferación de células de músculo liso vascular (Savoia et al., 2011). Adicionalmente, tanto la diabetes mellitus tipo 2 como la obesidad se consideran como enfermedades inflamatorias crónicas de bajo grado, lo que conlleva un aumento de citoquinas, adipoquinas inflamatorias, quimiocinas y marcadores de inflamación (Kolb y Mandrup-Poulsen, 2005; Pickup 2004; Gregor y Hotamisligil, 2011).

3.3.2 Moléculas de adhesión: ICAM-1 y VCAM-1.

Dada la relevancia en este trabajo de los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en células endoteliales, es importante hacer una mención especial de estas moléculas de adhesión. Las células poseen muchas maneras para interactuar unas con otras. Una de ellas es mediante moléculas de adhesión que permiten la migración de células desde el torrente sanguíneo hasta el sitio de unión específico, además de jugar un papel importante en la inducción de las respuestas inmunes de los linfocitos T. Ambas moléculas pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas y sus ligandos sobre los leucocitos son CD11A/CD18 y CD11B/CD18. ICAM-1 permite que las células endoteliales se unan a monocitos, neutrófilos y células T, en tanto que VCAM-1 permite la unión entre el endotelio y los linfocitos o monocitos. El ligando de VCAM-1 sobre el leucocito es VLA-4 (Galnik y Ley, 2007).

Tanto ICAM-1 como V-CAM son muy importantes en el desarrollo de la aterosclerosis, ya que se ha determinado que los niveles de ICAM-1 y VCAM-1 están aumentados en las regiones propensas a la aparición de lesiones ateroscleróticas (Nakashima et al., 1998). La expresión de ambas moléculas se incrementa por la acción del TNF- α mediada por NF- κ B (Collins et al., 1995), que en el caso de ICAM-1 es a través de la vía PKC ζ (Javaid et al., 2003) también son estimuladas por IFN γ (Harvey y Ramji, 2005). En las células endoteliales, los niveles de VCAM-1 aumentan cuando disminuye la disponibilidad de NO por la inducción de NF- κ B (Khan et al., 1996), lo que sugiere una relación directa con la disfunción endotelial. El aumento de la expresión de VCAM-1 también es regulada por factores aterogénicos como LDLs oxidados (Khan et al., 1995; Kawakami et al., 2006). En estudios en placas ateroscleróticas humanas, se demostró que existen niveles elevados de ICAM-1 en respuesta a IL-1 β (Couffinhal et al., 1994).

3.3.3 Oxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

La iNOS es una isoforma de la NOS que no es constitutiva y se induce en las células en respuesta a estímulos como las citoquinas proinflamatorias, moléculas bacterianas, factores de transcripción (como NF- κ B), lipopolisacáridos y estrés oxidativo, por lo cual se asocia a procesos inflamatorios o infecciosos. También se relaciona su inducción a nivel cardiovascular con AMPc, Ang II, vasopresina y adrenomedulina (Sha, 2000; Kröncke et al., 1998). Esta enzima produce grandes cantidades de NO en comparación con las otras isoformas constitutivas (100 veces mayor la producción de NO respecto a eNOS) y es regulada a nivel transcripcional

(Andrew y Mayer, 1999; Knowles y Moncada, 1994). La iNOS puede ser encontrada en diferentes tejidos, entre ellos el vascular, donde se expresa predominantemente en las células de músculo liso y en los fibroblastos (Busse y Mülsch, 1990; Matthys y Bult, 1997). Cuando en los vasos existe un ambiente pro-oxidante, el NO puede convertirse, como hemos explicado anteriormente, en el radical ONOO⁻ favoreciendo sus acciones deletéreas como la nitración de proteínas. La inhibición de iNOS o de NF-κB empleando el ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC) se traduce en una mejora de la vasodilatación dependiente de endotelio (Cau et al., 2011).

La inducción de iNOS a nivel cardiovascular está involucrada en el desarrollo de múltiples enfermedades. La expresión elevada de iNOS se ha determinado en lesiones ateroscleróticas humanas con la consecuente formación de peroxinitrito, lo que puede contribuir a la oxidación de lípidos y daño vascular (Buttery et al., 1996; Depre et al., 1999). Por otra parte, factores que están relacionados con el desarrollo de la arterosclerosis como LDLs oxidados, LDLs, IL-1, IL-6, IFN-γ favorecen el aumento de la expresión de iNOS en las células de músculo liso vascular, macrófagos y células espumosas (Matthys et al., 1997; Kröncke et al., 1998). También se ha observado una inducción de la expresión de iNOS en las células de músculo liso de vasos intramiocárdicos de pacientes con isquemia cardíaca (Habib et al., 1996). Por su parte, una dieta baja en ácidos grasos en ratas se correlaciona con una disminución de los niveles de ARNm de iNOS (Russell et al., 1995). Adicionalmente, se han determinado niveles elevados de iNOS en tejido subcutáneo de obesos humanos y adipocitos aislados (Elizalde et al., 2000). Asimismo, se ha relacionado la inducción de iNOS con resistencia a la insulina en el músculo, se observó que la disminución de los niveles de esta enzima redujo la resistencia insulina, en modelos de obesidad de ratones con delección de iNOS (Perrault y Marette, 2001).

3.4 Senescencia vascular.

3.4.1 Antecedentes.

El término senescencia fue descrito formalmente en 1961, cuando Hayflick y Moorhead demostraron que las células humanas diploides perdían la habilidad de dividirse después de un cierto número de duplicaciones. De acuerdo a sus investigaciones, los fibroblastos de piel humanos en cultivo experimentan una extensa división celular. Sin embargo, después de varios pases, gradualmente la proliferación celular disminuye. Durante este experimento, las células se dividían alrededor de 50 veces. En un experimento paralelo se dejó que las células se dividieran 25 veces y se

congelaron; pasado un tiempo se descongelaron y las células se dividieron hasta el límite de 50 veces, ya que posteriormente dejaban de dividirse. Las células que no se dividían permanecían viables por varias semanas, pero no lograron crecer a pesar de tener las condiciones óptimas para ello en el cultivo. De esto se concluyó que el número de divisiones remanentes no dependía del tiempo transcurrido sino de las duplicaciones efectuadas anteriormente (Hayflick y Moorhead, 1961). En 1965, se postuló el “Límite de Hayflick” como el número máximo de veces que las células humanas podrían dividirse (Hayflick, 1965).

A partir de estos hallazgos, otros grupos de investigación experimentaron con diferentes tipos celulares de distintas especies animales y se estableció que cada tipo celular tenía su propio límite, lo cual era independiente del medio o las condiciones presentes en el mismo. En las células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC) se determinó en 1981, por el grupo de Maciag, el número de Hayflick para este tipo celular. Para ello, emplearon diferentes parámetros: el nivel de duplicación de la población acumulado (CPDL) y el tiempo de duplicación de la población (PDT). Para estas células se estableció que a mayor CPDL había una menor densidad de cultivo cuando CPDL tenía un valor de 3,4, concluyéndose que 15 era el número de pases máximo para este tipo celular (Maciag et al., 1981).

En 1995 se demostró la presencia de células senescentes *in vivo* en cultivos de queratinocitos, fibroblastos y células epiteliales provenientes de biopsias de piel de donantes humanos. En estos experimentos, se utilizó el ensayo citoquímico de β -galactosidasa como un marcador para detectar células senescentes de manera selectiva si la reacción se llevaba a cabo a pH 6. Esta técnica basada en la actividad de esta enzima a pH 6 fue denominada como senescencia asociada a β -galactosidasa (Dimri et al., 1995).

3.4.2 Senescencia replicativa.

Existen dos mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo el proceso senescente: la senescencia replicativa y la senescencia prematura inducida por estrés. La senescencia replicativa implica una detención irreversible de la proliferación celular y una alteración de la función celular, en lo cual se encuentran involucrados múltiples genes y es dependiente del número de divisiones celulares pero no del tiempo transcurrido. Por lo tanto, las células que experimentan senescencia tienen una tasa de replicación finita (Campisi, 1996).

El primer mecanismo molecular reconocido como causante del proceso de senescencia está relacionado con una disfunción y acortamiento progresivo de los telómeros. Los telómeros, en las células de mamíferos, son estructuras altamente especializadas compuestas por una secuencia repetitiva de ADN (5'TTAGGG3') y están ensambladas por proteínas de unión especializadas, que se localizan cubriendo los extremos de los cromosomas. La función de los telómeros es proteger los cromosomas de la degradación llevada a cabo por las nucleasas como resultado de procesos de duplicación y reparación del ADN (McEachern et al., 2000). De esta manera, se evita la pérdida de información genética y la estabilidad cromosómica que podría ocasionar mutaciones o la muerte celular.

En las células humanas, el ADN telomérico está formado por una doble cadena formada de 5-15 kb de la repetición (5'TTAGGG3'), formando de 100-200 nucleótidos. Es conocido que el extremo 3' de la doble cadena de ADN telomérico no puede ser replicado por completo, dando lugar a que los telómeros se acorten progresivamente en cada ciclo celular. Este suceso fue denominado "el problema de la replicación final" refiriéndose a la incapacidad de la ADN polimerasa para completar la síntesis de ADN (Olovnikov, 1996). Esto se explica porque el ADN de los telómeros tiene una región de doble hebra y un sitio en el extremo 3' que no tiene una hebra complementaria. La ADN polimerasa es una enzima unidireccional y requiere de un espacio en el molde para inducir un cebador, por lo cual, en cada ronda de replicación ocurre lo que se ha mencionado anteriormente con el extremo 3' (Blackburn, 2001; Campisi, 1997). De acuerdo a un estudio llevado a cabo en fibroblastos, el problema de la replicación causa que se pierdan de 50-200 pares de bases de cada extremo 3' en la fase S de cada ciclo celular por cada división de la célula, lo cual conduce progresivamente al acortamiento de los telómeros (Levy et al., 1992).

En las células de mamíferos se han descrito proteínas de unión estructural al ADN telomérico de doble cadena, entre las que podemos citar TRF-1 y TRF-2. En el caso de TRF-1 se ha demostrado que actúa como un regulador negativo del tamaño del telómero. La sobre-expresión de esta proteína en células tumorales humanas HT1080 provoca una disminución en el tamaño de los telómeros. Mientras, el empleo de un alelo dominante negativo a TRF-1 inhibe la unión del TRF-1 endógeno a los telómeros y causa una elongación del tamaño del mismo (Van Steensel y De Lange, 1997). Por otra parte, se ha demostrado *in vivo* que la proteína TRF-2 protege el extremo telomérico, a través de un arreglo estructural denominado "T-loop". Esta estructura protege los extremos 3' protuberantes del telómero, o G-strands, de la degradación, así como de acciones de reparación y de recombinación. Los "loops" se

forman cuando la G-strand invade la parte de la doble banda del telómero. La estabilidad de los “loops” está mantenida por TRF-2, por lo cual una pérdida de su función provoca la pérdida de la G-strand y por tanto, la imposibilidad para formar los “T-loops” con una consecuente disfunción del telómero (Griffith et al., 1999). Se ha determinado que esta proteína podía actuar como un segundo regulador negativo del tamaño de los telómeros (Smogorzewska et al., 2000).

Los telómeros son sintetizados por la telomerasa, que es una enzima que agrega repeticiones de 6 nucleótidos al extremo 3' de los telómeros. Las telomerasas son ribonucleoproteínas con un complejo formado por una polimerasa de ADN llamada transcriptasa telomerasa inversas (hTERT) y el ARN de la telomerasa (hTR). La proteína hTERT pertenece a la familia de las transcriptasas inversas, por lo cual, para llevar a cabo su acción requiere de un “primer”, que en este caso es el extremo 3' del telómero y un molde de ARN, que es el componente de ARN, lo que le permite añadir dexosiribonucleótidos a los extremos de los cromosomas. El sitio catalítico activo de hTERT contiene 3 grupos aspartato esenciales, por lo que cualquier alteración en estos grupos funcionales puede repercutir en la actividad de esta enzima. La telomerasa se une al extremo 3' por medio de puentes de hidrógeno entre el ARN y los últimos nucleótidos de la hebra. A diferencia de otras transcriptasas inversas, las telomerasas están restringidas a copiar el pequeño fragmento de ADN que forma el telómero, con lo cual se soluciona el problema del fin de la replicación (McEachern et al., 2000; Linger et al., 1997; Erusalimsky y Kurz, 2006). Sin embargo, la telomerasa no puede prevenir la senescencia que no está relacionada por el acortamiento de los telómeros sino que deriva de otros factores como el estrés oxidativo (Chen et al., 2001).

El ARN de la telomerasa contiene una pequeña secuencia de ADN que actúa como molde a partir del cual las repeticiones de ADN telomérico son copiadas. Además, este ARN define el punto de parada para la reacción de la transcripción inversa por medio de una región llamada TBE (Template Boundary). Por otra parte, la molécula de ARN también permite la unión de otras proteínas accesorias indispensables para la estabilidad de la telomerasa (Tzfati et al., 2000).

La telomerasa no se encuentra expresada de modo importante en la mayoría de las células somáticas humanas adultas, debido a que la mayor parte de los tipos celulares no expresan la subunidad hTERT o la expresan en bajo grado; por ello, los telómeros no permanecen intactos y se acortan en cada ciclo celular (Masutomi et al., 2003). Esto se confirmó en 1997 empleando un modelo de ratón knockout al

componente de ARN de la telomerasa, comprobándose que la telomerasa es la responsable del mantenimiento del tamaño de los telómeros (Blasco et al., 1997). Existen tres tipos celulares que no parecen experimentar el fenómeno de senescencia replicativa y que expresan niveles altos de hTERT, tales como las células germinales, las células de tumores y las líneas celulares derivadas de las células madre (Wright et al., 1996; Landsdorp, 1995). Además de estos tejidos, se ha reportado la expresión de telomerasa, aunque en bajos niveles, en las células de epidermis y el intestino (Forsyth et al., 2002). En las células endoteliales, también se expresa la telomerasa aunque su acción es 40 veces menor que la medida en células cancerosas y esta actividad disminuye en función de la edad de replicación (Vasa et al., 2000, Kurz et al., 2004).

El tamaño del telómero se determina desde el fragmento de restricción terminal (TRF), el cual contiene la repetición TTAGGG y las secuencias no teloméricas. Los telómeros humanos tienen alrededor de 8 a 12 kb al nacer (Allshire et al., 1989; Levy et al., 1992). Durante el proceso de senescencia, el valor de TRF disminuye 6 kb independientemente del tamaño inicial de los telómeros. Sin embargo, a pesar de que la telomerasa es importante para la proliferación celular, no es completamente necesaria para mantener un ciclo celular ilimitado (Campisi et al., 1997).

Un estado disfuncional en los telómeros desencadena el proceso de senescencia porque induce una respuesta de daño en el ADN. La respuesta senescente es activada cuando se alcanza un punto de daño considerable independientemente del factor que la ha causado. Esta disfunción telomérica no está determinada principalmente por el acortamiento del tamaño del telómero, sino por una pérdida o alteración de la estructura del mismo. La respuesta de daño en el ADN incluye una compleja cascada de reacciones que involucra factores de reparación de ADN y reguladores del ciclo celular, que concluyen con la activación del gen supresor de tumores, p53, el cual detiene la proliferación celular de manera permanente o transitoria en función del nivel de daño (D'Adda di Fagagna et al. 2003). Entre las proteínas que participan en esta respuesta se incluyen protein-quinasa como la proteína ataxia/telangiectasia mutada (ATM/ATR) y la quinasa de punto de restricción 2 (CHK2), proteínas adaptadoras como la proteína 1 mediadora del punto de control de daño del ADN (MDC1) y modificadores de la cromatina. Estas proteínas se localizan en el sitio de daño en el ADN y por lo tanto puede ser detectadas en las células senescentes (Campisi y Di Fagagna, 2007).

3.4.3 Senescencia prematura inducida por estrés.

La senescencia celular puede ser inducida en un corto periodo de tiempo, además de por daño telomérico (acortamiento de los telómeros), por otros factores; a este proceso se le conoce como senescencia prematura inducida por estrés (Toussaint et al., 2000). Entre los principales estímulos causantes del fenotipo senescente en células de pases bajos se encuentran: el daño directo al ADN como el inducido por radiaciones, el estrés oxidativo, el estrés oncogénico (aumento de la actividad oncogénica), el estrés bioenergético y el daño en la estructura de la cromatina. Estos factores pueden no ser independientes unos de otros; por ejemplo, el estrés oxidativo conlleva un daño del ADN, que a su vez se puede relacionar con un aumento del acortamiento de los telómeros (Ben-Porath y Weinberg, 2004).

Entre los factores que pueden influir en el proceso senescente de las células endoteliales se encuentran los mitógenos, moléculas inflamatorias, NO, glucosa alta y los productos de glicosilación avanzada (AGEs). Estos estímulos influyen en la senescencia celular a través de dos vías: alterando los niveles intracelulares de estrés oxidativo o modulando la actividad de la telomerasa (Erusalimsky, 2008).

El estrés oxidativo es uno de los estímulos que inducen en mayor medida el proceso de senescencia. La teoría de los radicales libres del envejecimiento señala que las ROS producidas durante el metabolismo aeróbico pueden causar un daño en las biomoléculas lo que produce una disminución de las funciones de los tejidos y finalmente conduce a el envejecimiento (Harman, 1994). Niveles elevados de ROS están relacionados con la inducción tanto de senescencia replicativa como de senescencia inducida por estrés (Lu y Finkel, 2008). En las células endoteliales, ROS puede inducir la senescencia a través de un daño en los telómeros o inhibiendo a la telomerasa. También por un mecanismo independiente de los telómeros, el cual está relacionado con el daño directo en el ADN, el daño en la mitocondria, la activación de quinasas de respuesta a estrés en el citosol u otras proteínas de las rutas de señalización redox, además ROS puede actuar como mediador de estrés oncogénico y causar estrés citosólico que finalmente favorece el estado senescente (Erusalimsky, 2008).

Existen una amplia variedad de estímulos que pueden incrementar los niveles de ROS y por lo tanto causar estrés oxidativo intracelular. En relación a estos factores, se determinó que la estimulación aguda de fibroblastos humanos con interferón- β produce una detención reversible del ciclo celular, sin embargo, una estimulación crónica aumenta los radicales de oxígeno y provoca una respuesta de daño celular

dependiente de p53 desencadenando el proceso de senescencia (Moiseeva et al., 2006). Mientras que en HUVECs la estimulación continua con IFN- α provocó un aumento de la senescencia replicativa mientras que el IFN- γ activó este proceso mediante la vía del p53 (Pammer et al., 2006; Kim et al., 2009b). Por otra parte agentes inductores de estrés oxidativo como el TNF α y LDL oxidado reducen la actividad de la telomerasa en las células endoteliales vía Akt (Breitschopf et al., 2001).

En la mitocondria ROS puede causar daño en el ADN mitocondrial y otros componentes de los organelos generando un deterioro de su función. Un estudio realizado en células endoteliales demostró que el silenciamiento de prohibitina-1, una proteína constituyente de la membrana de la mitocondria e importante para mantener su integridad, incrementó la generación de ROS via Akt favoreciendo el proceso de senescencia (Schleicher et al., 2008). En fibroblastos incubados en una atmósfera de 20% de oxígeno se observó una inducción más temprana de senescencia en comparación con aquellos incubados con 2-3% de oxígeno (Chen et al., 1995).

Por otra parte el tratamiento con un agente antioxidante análogo al ácido ascórbico en células endoteliales, disminuyó el acortamiento de los telómeros, lo cual provocó un aumento de la vida celular y una disminución del tamaño de las células, ambos signos característicos del estado senescente, lo cual puso de manifiesto la importancia del estrés oxidativo en este proceso (Furumoto et al., 1998).

La senescencia inducida por estrés oncogénico es un mecanismo de protección para evitar la formación de tumores. La sobre-expresión de oncogenes Ras puede ocasionar en las células sanas la inducción de senescencia. Los oncogenes Ras desencadenan la proliferación celular seguida de una parada irreversible del ciclo y un aumento de p53 y p16, lo que previene la transformación de los tumores (Serrano et al., 1997). En las células endoteliales la sobre-expresión de las formas activas de Akt, Ras o Rac1 conducen al estado senescente (Erusalimsky y Kurz, 2006). La inducción de la senescencia mediada por Akt produce un aumento de ROS que deriva en un incremento de la actividad de p53 y la expresión de p21 (Miyachi et al., 2004).

El estrés bionérgico se produce cuando hay un desbalance energético en la célula. Las causas que originan este tipo de estrés se relacionan con un aumento en la demanda de energía, restricción de nutrientes, factores de crecimiento o de oxígeno y una disfunción de la mitocondria (Erusalimsky y Kurz, 2006). La inducción prematura de la parada del ciclo celular ha sido demostrada en fibroblastos humanos cultivados en un medio con 0,25% de suero (Ramírez et al., 2001). El inadecuado contacto entre

las células, o entre las células y la matriz celular, pueden promover la parada del ciclo celular en condiciones *in vitro* (Ben-Porath y Weinberg, 2004). En queratinocitos humanos, cultivados con un inapropiado contacto celular sin una capa alimentadora, se observa una inducción del proceso senescente y una disminución de la expresión de p16 (Ramírez et al., 2001). La activación de p16 está implicada en la respuesta a este tipo de estrés, cuando la inducción de la senescencia prematura es independiente del desgaste de los telómeros (Rheinwald et al., 2002).

3.4.4 Vías de señalización implicadas en el proceso de senescencia: La vía del p53 y del p16.

Existen tres vías de señalización importantes en el proceso de senescencia: la que involucra al gen supresor de tumores p53, la de p16 y la de la proteína retinoblastoma (pRb). Estos mecanismos pueden interactuar o alterar independientemente el ciclo celular, además de que responden a distintos estímulos.

El p53 es un supresor de tumores y también se conoce como “el guardián del genoma”, porque es fundamental para el mantenimiento de la integridad del genoma de las células (Lane, 1992). Fue descrito por primera vez en 1979 por su interacción con la proteína viral SV40 e inicialmente fue considerado un oncogén para posteriormente ser identificado como un supresor de tumores (Linzer y Levine, 1979). El gen Tp53 se localiza en el cromosoma 17 y codifica una proteína con un peso molecular de 53 kDa compuesta por 333 aminoácidos y 11 exones (Soussi y May, 1996). Esta proteína forma parte del funcionamiento normal de la célula; se ha demostrado que en las células tumorales se encuentra inactivada por una mutación en el gen de Tp53, lo cual remarca su importancia en el mantenimiento del ciclo celular. La vía de p53 responde principalmente al daño en el ADN aunque también responde a estrés genotóxico mediante la inducción de la expresión de p21, en tanto que la vía de p16 y pRb son activadas por estrés genotóxico que detiene el ciclo celular mediante la represión de genes promotores del crecimiento (Meek, 2004; Ohtani et al., 2004). El p53 responde al daño principalmente a través de las siguientes acciones: detención transitoria del crecimiento, detención del crecimiento por senescencia y apoptosis inducida por daño en el ADN. La pérdida de la función de p53 o una alteración de su actividad no sólo está relacionada con la presencia de tumores sino también con enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, infecciosas, metabólicas y con el proceso de envejecimiento (Itahana et al., 2001).

En condiciones normales, p53 se expresa en forma constitutiva y se encuentra en bajos niveles a causa de la rápida inactivación llevada a cabo por la ubiquitina ligasa, MDM2, que ubiquitina a p53 en el residuo N-terminal para ser degradado rápidamente por el proteosoma. En respuesta al daño en el ADN, la quinasa ATM/ATR fosforila rápidamente p53 en Ser15, mientras la serina/treonina quinasa Chk2 actúa como desregulador de ATM fosforilando a p53 en Ser20 (Itahana et al., 2001). Este sitio fosforilado en la región N-terminal de p53 está cercano al sitio de unión de MDM2, lo cual genera la estabilización de p53, evitando la degradación llevada a cabo por el proteosoma. Este hecho causa la acumulación de p53, que es el primer paso de la respuesta al daño en el ADN (Yoshida y Miki, 2010). Otra vía de señalización por la cual está controlada la respuesta mediada por p53 involucra a p14/ARF, un supresor de tumores codificado en el locus INK4a, que es el mismo de p16, pero expresado por un promotor distinto (Wadhwa et al., 2004). La actividad de p53 es estimulada por p14, que secuestra a MDM2 en el núcleo, evitando la degradación de p53, mecanismo inducido por estrés celular y que no parece implicado con la senescencia replicativa (Wadhwa et al., 2004).

La parada del ciclo celular en respuesta al daño celular mediada por p53 se lleva a cabo en la fase G1 del ciclo celular, lo que permite que sea reparado antes de la fase S. El p53 activado promueve la expresión de p21, que a su vez provoca la inhibición de la actividad de los complejos ciclina E-CDK2, cuya función es fosforilar a pRb, el cual es activo en su forma hipofosforilada e inactivo en su forma hipofosforilada (Classon y Harlow, 2002). La pRb es una proteína cuya función es restringir la proliferación celular y que, una vez hipofosforilada, secuestra al factor de transcripción E2F, lo cual provoca la inhibición de la expresión de genes de E2F necesarios para la transición a la fase S del ciclo celular (Ben-Porath y Weinberg, 2005). El Rb fosforilado inactiva a E2F de dos maneras: la primera es mediante la unión directa de un residuo de 18 aminoácidos de su estructura, con el dominio de transactivación de E2F, por lo cual pRb bloquea directamente la capacidad de E2F para formar un complejo de transcripción activo (Campisi y D'Adda di Fagagna, 2007). La segunda ocurre cuando pRb recluta un complejo de histonas desacetilasas o transferasas en la región promotora para reprimir la transcripción de E2F (Fig. 9) (Campisi y D'Adda di Fagagna, 2007).

Otra parada del ciclo celular puede ocurrir en la transición G2/M mediante la activación de la expresión de los genes diana de p53: 14-3-3 σ , GADD45 y p21. Esta vía implica la inhibición de la ciclina B1/Cdc2, que inhiben los complejos CDK. La proteína 14-3-3 σ se une y secuestra en el citosol a la fosfatasa Cdc25, evitando que

el complejo B1/Cdc2 sea activado mediante su de-fosforilación, lo que produce la inhibición de la actividad de este complejo ciclina que es necesario para la transición del ciclo G2/M (Innocente et al.,1999; Taylor et al.,1999).

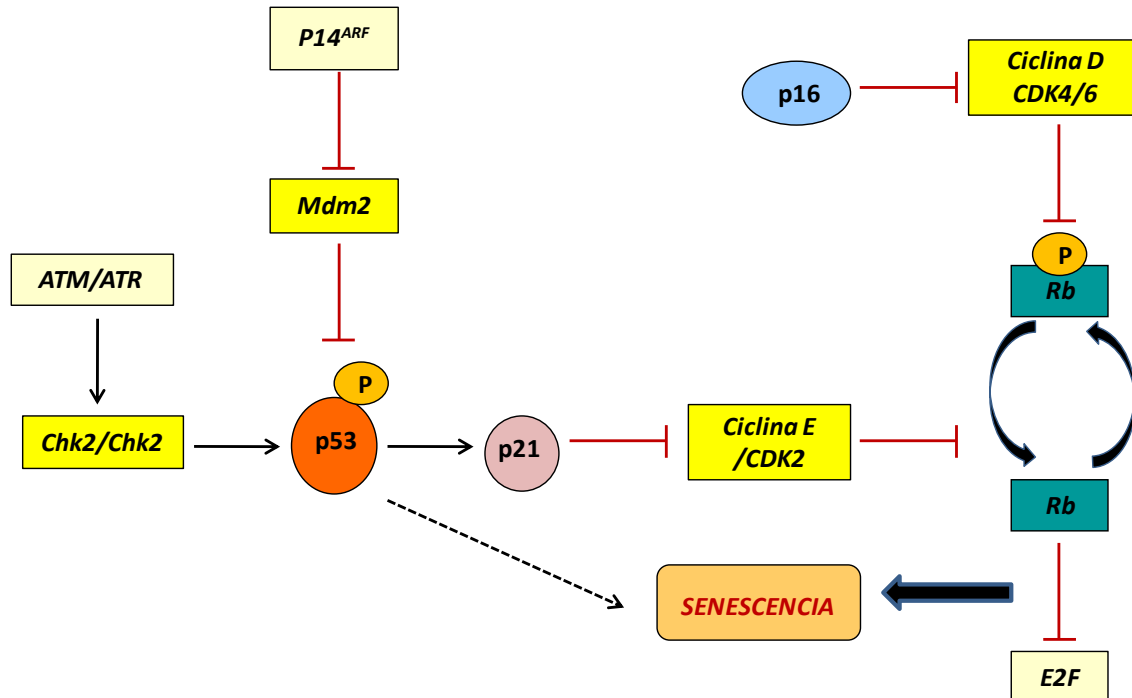


Fig. 9. Mecanismos de activación de p53, p16 y la entrada en senescencia. El p53 activado promueve la expresión de p21, que provoca la inactivación de los complejos ciclina E-CDK2 que inhibe la fosforilación de pRb. En tanto que p16 inhibe la actividad de las ciclinas CDK4 y CDK6 evitando la fosforilación de pRb. La pRb hipofosforilada secuestra al factor de transcripción E2F, lo cual provoca la entrada en senescencia de la célula. Existe una vía alternativa en la que la actividad de p53 es estimulada por p14 que secuestra a MDM2 en el núcleo.

La vía de p16 induce la senescencia por la inhibición de la actividad de la ciclinas CDK4 y CDK6, que de otra manera fosforilarían e inactivarían a pRb (Erusalimsky y Kurz, 2006) (Fig. 9). Por lo tanto, las dos rutas de señalización conducen a la inactivación de Rb. En las células endoteliales tanto la vía del p53/p21 como la p16 están involucradas en la respuesta senescente inducida por la pérdida de la integridad de los telómeros (Erusalimsky y Kurz, 2006). En procesos de senescencia replicativa, se ha determinado un aumento en la expresión de p53 en células endoteliales de la córnea bovina y de p16 y p21 en las HUVECs (Whikehart et al., 2000 y Wagner et al., 2001).

3.4.5 Fenotipo Senescente.

Las células senescentes presentan cambios característicos en la expresión de genes, morfología y función. Dichas transformaciones definen el fenotipo senescente cuyas características principales son (Campisi, 2001):

- Parada irreversible de la proliferación celular.
- En algunos tipos celulares, resistencia de las señales que causan la muerte celular por apoptosis.
- Cambios en las funciones celulares.

La parada del ciclo celular es una de las características más importantes de la senescencia, que se lleva a cabo por la represión de genes esenciales para la continuidad del ciclo celular y la supresión de genes que inhiben el crecimiento tal como se ha explicado anteriormente. La parada del ciclo en senescencia es permanente, porque las células senescentes no pueden ser estimuladas a proliferar por estímulos fisiológicos, lo cual las diferencia ampliamente de las células quiescentes (Campisi y D'Adda di Fagagna, 2007).

La apoptosis implica la destrucción controlada de las células potencialmente malignas o disfuncionales como una respuesta al daño, estrés o señales fisiológicas, por lo cual es un importante mecanismo supresor de tumores (Green y Evan, 2002). Ciertos tipos celulares, como los fibroblastos humanos, las células T y las células epiteliales, se convierten en resistentes a señales que desencadenan la apoptosis cuando experimentan senescencia celular. La resistencia a la apoptosis puede explicar porqué las células senescentes persisten *in vivo* y se acumulan con la edad (Sabin y Anderson, 2011). En algunas células, esta resistencia puede ser causa por el cambio de la expresión en proteínas que inhiben o promueven la muerte celular por apoptosis (Marcotte et al., 2004; Murata et al., 2006). En ciertos casos, p53 puede transactivar los genes que causan la detención de la proliferación en lugar los que inducen la apoptosis (Jackson y Pereira-Smith, 2006).

La senescencia celular va relacionada con alteraciones en las funciones diferenciadas que comúnmente se presentan en la mayoría de los tipos celulares, entre los principales cambios se encuentran los siguientes:

Hayflick y Moorhead describieron en 1961 el alargamiento y la forma plana de la estructura celular como parámetros característicos que diferenciaban a las células senescentes (Hayflick y Moorhead, 1961). A nivel del núcleo pueden ocurrir cambios

en las estructuras, tales como la lámina nuclear, el nucléolo, la matriz nuclear, los cuerpos nucleares y morfología nuclear lobulada. Asimismo, se han reportado alteraciones específicas en el genoma de las células senescentes que incluyen modificaciones en la cromatina, aneuploidía, cambios en la posición de los cromosomas, recolocación de heterocromatina y cambios en los telómeros (Mehta et al., 2007). En relación a lo antes mencionado, se ha demostrado en fibroblastos humanos que los cromosomas 13 y 18 (pobres en genes) pueden alterar su posición nuclear, trasladarse cerca de la periferia del núcleo y recolocarse en el interior del núcleo cuando se induce senescencia (Bridger et al., 2000). La organización de la interfase de ciertos territorios de cromosomas puede cambiar en las células senescentes y eso se correlaciona con el tamaño del cromosoma más que con la densidad (Meabun et al., 2007).

La enzima β -galactosidasa es una hidrolasa localizada en el lisosoma, encargada de romper el enlace β -D-galactosil de un amplio número de sustratos naturales, entre los que se encuentran los gangliósidos, glicoproteínas y glicosaminoglicanos, así como sustratos artificiales. Esta enzima está constituida en su forma madura por un polipéptido de 64 kD y es producida a partir de un precursor de 85 kD, lo cual ha sido descrito en fibroblastos humanos (D'Azzo et al., 1982). También es activa cuando se encuentra en forma de un agregado con un peso molecular de 700 kD, formado por el polipéptido antes descrito (Norden et al., 1975; Hoeksema et al., 1979). Este complejo se forma y se estabiliza a través de interacciones con una proteína protectora de 32 kD, lo cual evita que la β -galactosidasa sea sensible a una degradación proteolítica intralisosomal (Hoogeveen et al., 1983).

El pH óptimo de la actividad de esta enzima se sitúa entre 4.0-4.5, por lo cual puede ser detectada en las células mamíferas empleando el ensayo citoquímico de SA- β -Gal. Para llevarlo a cabo se emplea el sustrato sintético X-Gal; como se ha mencionado anteriormente, Dimri y colaboradores establecieron que a pH 6 la actividad SA- β -Gal es solamente expresada por las células senescentes y no se observa en las células pre-senescentes, quiescentes o terminalmente diferenciadas. Asimismo, se determinó que al pH óptimo de 4, todas las células exhibían una tinción fuerte, independientemente de la edad replicativa (Dimri et al., 1995).

Una vez establecido que la SA- β -Gal podría considerarse un marcador de la presencia de células senescentes, se ha empleado tanto *en vivo* como *in vitro*. En 1998, se demostró la presencia de SA- β -Gal en células HUVEC y en células de músculo liso vascular de conejo cultivadas. En dichos cultivos se presentó una mayor

actividad SA- β -Gal en los cultivos que presentaban más alta densidad celular, un mayor estado de confluencia o un pase más alto (Van der Loo et al., 1998). Posteriormente, se demostró en HUVECs que el aumento de la actividad β -Gal a pH 6 detectado en las células senescentes era debido a un aumento en el nivel de esta enzima lisosomal, lo cual a su vez estaba relacionado con un incremento de la masa lisosomal en estas células (Kurz et al., 2000).

Como se ha mencionado anteriormente, otra característica de las células senescentes es la alteración en la expresión de p53, p16, p21 y p14. Las células senescentes también reprimen genes que codifican proteínas que estimulan o permiten la continuidad del ciclo celular, tales como las histonas dependientes de la replicación, c-Fos, ciclina A, ciclina B y el antígeno proliferante nuclear celular (PCNA) (Stein et al., 1991; Seshadri y Campisi, 1990; Pang y Chen, 1994). Estos genes se expresan cuando E2F, que es el factor de transcripción que los induce, es inactivado por Rb (Narita et al., 2003). En algunas células senescentes estos genes son silenciados por una reorganización de cromatina dependiente de Rb, lo cual se conoce como focos de heterocromatina asociados a senescencia (SAHF); esto ocurre cuando pRb se une a proteínas de heterocromatina-1 (HP1), para promover la unión de HP1 a histonas H3 trimetiladas formando dichos agregados impidiendo la transcripción de los genes que promueven la proliferación (Narita et al., 2003).

Las células senescentes pueden aumentar la secreción de más de 40 factores involucrados en procesos de señalización intracelular, como interleuquinas, quimiocinas, factores de crecimiento y proteasas, lo que produce una serie de efectos sobre el tejido local; a esta característica se la conoce como senescencia asociada al fenotipo secretor (Coppe et al., 2010). Este fenotipo se ha observado tanto *in vivo* como *in vitro* en varios tipos celulares humanos, como fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales y astrocitos, entre otros (Freund et al., 2010; Salminen et al., 2011). Estos factores se pueden dividir en: factores de señalización solubles (interleuquinas, quimiocinas y factores de crecimiento), proteasas secretadas y componentes insolubles secretados (Davalos et al., 2010).

La principal función de SASP es mediar la detención de la proliferación celular causada por la senescencia, a través de la acción autocrina de las citoquinas proinflamatorias (como la IL-6 e IL-8), el factor de crecimiento tipo insulina-7 (IGFBP7), factores de crecimiento epitelial (como el VEGF), metaloproteinasas de la matriz (como la MMP-3) y PAI-1. Las proteasas secretadas llevan a cabo las siguientes funciones: la degradación o procesamiento de la matriz extracelular, la degradación de

moléculas de señalización y la conversión de proteínas asociadas de membrana a receptores de membrana solubles (Acosta et al., 2008; Wajapeyee et al., 2008; Kortlever et al., 2006; Kuilman et al., 2008).

El término secretoma de mensajería de la senescencia (SMS) fue establecido para señalar que los factores del fenotipo secretorio no solamente son esenciales para activar el estado senescente, sino también para el mantenimiento y comunicación de este estado al espacio circundante (Sabin y Anderson, 2011). Por lo tanto, SASP puede influir en la proliferación de las células adyacentes y en el tejido en conjunto. Es por ello que estos factores, en especial las citoquinas inflamatorias, pueden estimular una inflamación de bajo grado asociada enfermedades cardiovasculares y al proceso de envejecimiento (Lin y Karin, 2007). La citoquinas proinflamatorias que se liberan en mayor medida son la IL-6 e IL-8, mientras que la IL-1 α y IL-1 β son secretadas en niveles bajos (Lin y Karin, 2007). La secreción de IL-6 e IL-8 se ha demostrado que aumenta notablemente en respuesta a un daño persistente en el ADN provocada por lesiones irreparables y a la senescencia inducida por estés oncogénico en queratinocitos, melanocitos, monocitos, fibroblastos y células epiteliales humanas (Rodier et al., 2009; Kuilman et al., 2008).

3.4.6 Patologías relacionadas con el fenotipo senescente en las células endoteliales.

En este trabajo se estudiará el proceso senescente empleando células HUVEC, es por ello que a continuación se describirá la implicación del fenotipo senescente de las células endoteliales en patologías cardiovasculares (Fig. 10).

En las células progenitoras de endotelio (EPC), la Ang II acelera la senescencia a través del incremento del estrés oxidativo, lo cual se relaciona con una inactivación de la telomerasa y lleva a un deterioro de la proliferación celular (Imanishi et al., 2005). En las células endoteliales senescentes, se han detectado cambios en la expresión de genes que codifican proteínas asociadas con la funciones del citoesqueleto y la estructura celular, lo que afecta la motilidad de las células que junto con la pérdida de proliferación conduce a una reducción de la capacidad angiogénica (Erusalimsky, 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, durante el procesos senescente las células endoteliales sobre-expresan proteínas que caracterizan el fenotipo proinflamatorio y protrombótico de la aterosclerosis, entre las que se incluyen la IL-

1 α , ICAM-1 y PAI-1 (Erusalimsky, 2008). Se ha demostrado que la expresión de PAI-1 se incrementa en la senescencia replicativa y la inducida por estrés (Comi et al., 1995). Por otra parte, en muestras de arteria coronaria se ha demostrado, mediante la tinción de SA- β -Gal, un aumento de células senescentes que coincide con las regiones ateroscleróticas del tejido procedentes de pacientes con enfermedad cardíaca isquémica; en este mismo estudio, se determinó que en las células endoteliales de arteria coronaria (HAEC), la expresión de ICAM-1 se incrementa durante la senescencia inducida por disfunción telomérica, lo que finalmente favorece el progreso de las lesiones ateroscleróticas (Minamino et al., 2002).

Las células endoteliales senescentes experimentan cambios en la expresión de proteínas asociadas al remodelado de la matriz extracelular, lo que produce una menor degradación de lipoproteínas y una reducción de la metabolización de lípidos aterogénicos (Kamino et al., 2003; Vasile et al., 2001). La presencia de células endoteliales senescentes en una monocapa de células no senescentes altera la morfología de las uniones de las células jóvenes a su alrededor, incrementando la permeabilidad de la monocapa, lo que se asocia a un cambio en la distribución de las proteínas de unión relacionado con desórdenes patológicos (Krouwer et al., 2012).

En células EPCs obtenidas de pacientes con enfermedad arterial coronaria (EAC), se ha demostrado un acortamiento de los telómeros y un aumento del daño en el ADN en comparación con aquellos que no padecían esta enfermedad (Sato et al., 2008). En contraste, las estatinas pueden retardar la senescencia prematura en EPCs a través de la estimulación de la inducción de TRF-2, generando un efecto protector en los telómeros (Spyridopoulos et al., 2004). En otro estudio, se ha demostrado en EPCs de pacientes con EAC que la combinación de un tratamiento con atorvastatina y una dieta baja en lípidos atenúa el daño en los telómeros (Sato et al., 2009).

Existen muchos factores que pueden contribuir al deterioro de las funciones endoteliales. El deterioro de la producción de NO y la inactivación de NO por el anión superóxido puede conducir a este estado. En relación a esto, se ha observado que las células endoteliales senescentes existe una baja actividad de eNOS y por lo tanto una disminución el producción de NO (Minamino et al., 2002; Collins y Tzima, 2011). En contraste, en HAECs inmortalizadas por la introducción de hTERT, se ha observado que aumenta la expresión de eNOS y de NO (Matsushita et al., 2001). Los niveles de prostaciclina, otro importante vasodilatador, se encuentran reducidos en cultivos de células endoteliales senescentes (Nakajima et al., 1997). Por otra parte, HUVECs sembradas en colágeno glicado expresan señales de senescencia prematura, tales

como un incremento de la actividad SA-β-Gal y un aumento de las proteínas p53 y p14, lo que se previene mediante el tratamiento con un agente antioxidante (Chen et al., 2002b).

En el tejido adiposo se ha detectado un incremento de la actividad SA-β-Gal y de los niveles de expresión de p53 en función del incremento del IMC, así como en el tejido adiposo de pacientes diabéticos, lo que también se acompaña de una elevación de los niveles de p21, TNF-α y MCP-1 (Minamino et al., 2009). Asimismo, en preadipocitos de humanos obesos se ha encontrado un incremento de la tinción SA-β-Ga de al menos 30 veces más que en sujetos no obesos (Tchkonina et al., 2010). La sobre-expresión de p53 en adipocitos y macrófagos de tejido adiposo de ratones induce senescencia, aumento de la resistencia a insulina y liberación de citoquinas proinflamatorias, en tanto que una delección de p53 previene estos efectos, lo que sugiere que p53 y el fenotipo secretor de las células senescente se pueden asociar a los efectos perjudiciales asociados a la obesidad y el síndrome metabólico (Minamino et al., 2009). Asimismo, en adipocitos expuestos a H₂O₂ se observa un aumento de los niveles de expresión de p53, TNF-α y MCP-1, lo que asocia el efecto del estrés oxidativo sobre la inducción de senescencia descrita en la obesidad (Minamino et al., 2009).

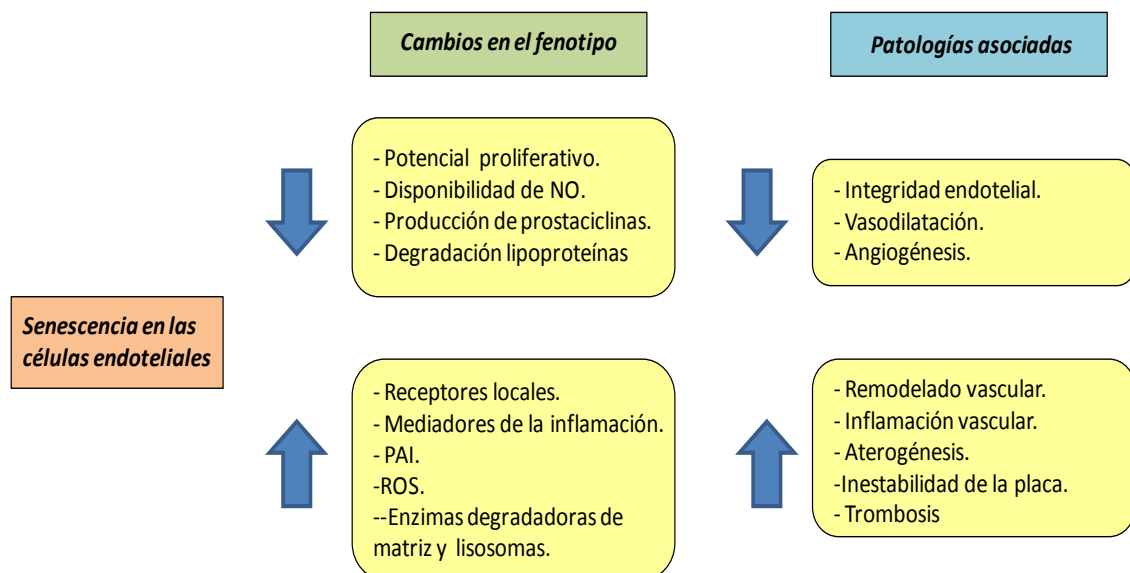


Fig. 10. El fenotipo senescente en las células endoteliales y su implicación patofisiológica (Adaptado de Erusalimsky 2008).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo General

El SRA, compuesto por una serie de péptidos y enzimas, se identificó inicialmente como un regulador crucial de la presión arterial y el equilibrio hidroelectrolítico. Posteriormente, se hizo patente el papel central de la Ang II, principal efector del SRA, como regulador de la función vascular a través de otras acciones como la proliferación celular, la inflamación o la reparación de tejidos, entre otras.

Además, la sobreactivación del SRA se ha asociado con el daño vascular en procesos ligados a la disfunción endotelial como pueden ser la aterosclerosis, la obesidad y la senescencia de las células vasculares. Se sabe también que, además de la propia Ang II, la actividad de otras moléculas inflamatorias como puede ser la citoquina IL-1 β , está también elevada en diversas situaciones fisiopatológicas asociadas al daño vascular.

Por otra parte, en los últimos años, el papel del heptapéptido Ang-(1-7), generado en gran medida a partir de la propia Ang II, ha ido tomando una relevancia progresiva en cuanto es capaz de antagonizar diversas acciones vasculares y extravasculares de la Ang II.

En este contexto, el objetivo general del presente trabajo es determinar la capacidad antiinflamatoria y antisenescente de la Ang-(1-7) en células vasculares humanas, estimuladas tanto con Ang II como con otros estímulos independientes del SRA tales como la citoquina inflamatoria IL-1 β , así como la participación del receptor Mas en las acciones de la Ang-(1-7). En último término, se trata de valorar las perspectivas que el eje Ang-(1-7)/receptor Mas puede presentar como diana terapéutica de nuevos fármacos que puedan ayudar a prevenir o atenuar el daño vascular.

Objetivos Específicos

Los objetivos desarrollados en este trabajo han sido:

- 1.- Determinar en células cultivadas de músculo liso de aorta humana (CMLAH) la acción de la Ang-(1-7) sobre los niveles y actividad de la enzima iNOS inducidos tanto por Ang II como por IL-1 β .
- 2.- Identificar rutas de señalización intracelular por medio de las cuales la Ang-(1-7) podría ejercer su acción antiinflamatoria. De manera concreta, se estudiará la activación de la enzima NADPH oxidasa y del factor de transcripción NF- κ B.
- 3.- Explorar, mediante el uso de antagonistas farmacológicos, el papel del receptor Mas como mediador de las acciones antiinflamatorias de la Ang-(1-7) en las CMLAH.
- 4.- Determinar la capacidad antiinflamatoria del eje Ang-(1-7)/receptor Mas en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC), utilizando como marcador de activación endotelial la expresión de moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1.
- 5.- Estudiar la capacidad de la Ang II y la IL-1 β para inducir senescencia y daño telomérico en HUVEC y determinar el potencial antisenescente de la Ang-(1-7), comparando su efecto sobre la senescencia endotelial con el de otras adipocinas con impacto vascular como puede ser la Nampt/PBEF/visfatina.

***MATERIALES Y
MÉTODOS***

MATERIALES Y METODOS

1. Declaración de ética.

La investigación se ajusta a los principios establecidos en la declaración de Helsinki y las disposiciones legales españolas. Los experimentos con células musculares lisas de aorta humana (CMLAH) y de células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) fueron revisados y aprobados por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario de Getafe y de la Universidad Autónoma de Madrid. En el caso de la obtención de las CMLAH se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los familiares del donante y en las HUVEC de las madres donantes (Lafuente et al., 2008; Azcutia et al., 2010).

2. Obtención de células de músculo liso vascular humano.

Los cultivos de CMLAH se obtuvieron por disociación enzimática a partir de fragmentos de aorta de cinco donantes de órganos con una media de edad de ± 35 años ($35 \pm 5,6$ años), sin antecedentes de obesidad, diabetes, hipertensión arterial ni evidencia clínica de enfermedad cardiovascular.

Antes de la extracción de las células, los fragmentos de aorta humana se limpiaron con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril para eliminar los restos de grasa y coágulos. También se eliminó la capa adventicia empleando unas tijeras y el endotelio realizando un raspado suave de la luz del vaso. Los fragmentos aórticos se cortaron minuciosamente con unas tijeras y se sometieron a una suave digestión enzimática mediante la incubación con colagenasa tipo II (2mg/ml) en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado con 0,1% de seroalbúmina bovina (BSA), 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina 100 μ g/ml de sulfato de estreptomicina y 2,5 μ g/ml de anfotericina B (medio DMEM-0,1% BSA). Esta incubación se llevó a cabo a 37°C durante un tiempo de 90 min y en una estufa húmeda con una atmósfera que contenía 95% de O₂ y 5% de CO₂. La suspensión de células se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. El precipitado obtenido por centrifugación, se resuspendió y se lavó dos veces en DMEM-0,1% BSA. Después de la última centrifugación, el precipitado se resuspendió en DMEM suplementado con 10% de FCS (DMEM-10% FCS) y los antibióticos previamente mencionados. Las células se sembraron en frascos de cultivo

de 25 cm² de superficie en medio de DMEM-10% FCS, y se conservaron en una estufa de cultivos a 37 °C y con una atmósfera compuesta con un 5% de CO₂.

El medio DMEM-10% FCS del cultivo se renovó cada 48 h y al alcanzar la confluencia, las células se despegaron mediante tripsinización, empleando una solución de 0,02% de ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA)-0,05% tripsina y se realizaron subcultivos en un ratio 1:2 (pases). En los experimentos llevados a cabo en este trabajo, se emplearon células que fueron privadas de suero (ayunadas) utilizando el medio DMEM-0,1% BSA durante 24 h antes de los diferentes tratamientos. Tras lo cual, se aplicaron los tratamientos indicados para cada experimento en medio DMEM-0,1% BSA renovado. Se utilizaron cultivos de CMLAH comprendidos entre los pases 7 y 18.

3. Obtención de células endoteliales de vena de cordón umbilical.

Para cada cultivo de HUVEC se utilizaron 3 cordones umbilicales humanos procedentes del Hospital Universitario de Getafe. Así mismo, fueron excluidos para la realización de este estudio, los cordones de madres donantes con diabetes, obesidad, hipertensión o cualquier otro tipo de enfermedad cardiovascular.

Después de ser obtenidos los cordones, estos se mantuvieron hasta su recepción en un frasco estéril con medio DMEM-0,1% BSA, 0,005% de heparina sódica, 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2,5 µg/ml de anfotericina B. Una vez en el laboratorio, los cordones se introdujeron en frascos de plástico estériles de 50 ml que contenían PBS estéril, para eliminar los restos de sangre. La limpieza prosiguió con un lavado empleando una jeringuilla para introducir PBS en uno de los extremos de la vena del cordón umbilical. Este procedimiento se repitió hasta que no hubo salida de coágulos o sangre por el otro extremo de la vena. Posteriormente, se colocó una pinza cauterizante estéril en un extremo del cordón que quedó cerrado y se introdujo por el otro extremo de la vena, empleando una jeringuilla, una solución estéril de colagenasa tipo II (2mg/ml) disuelta en PBS. Esta solución fue empleada con el fin de favorecer el desprendimiento de las células endoteliales adheridas en la vena del cordón. Se pinzó el extremo libre del cordón y se dejó incubar con la solución antes descrita durante 18-20 min a temperatura ambiente (Fig. 11).

Tras la incubación, se cortó uno de los extremos del cordón por encima de la pinza y se recogió en una placa la solución de colagenasa que contenía células

endoteliales y hematíes. Entonces, se procedió a cortar el otro extremo del cordón y a localizar de nuevo la luz de la vena del cordón e introducir por ella una jeringuilla para hacer pasar PBS a través de ella y recoger los restos de células que pudieran quedar en el cordón. La solución producto de esta limpieza se recolectó en la misma placa empleada anteriormente. Después de un par de lavados con PBS, el contenido de la placa se trasladó a un tubo estéril de 50 ml en el que previamente se habían colocado 20 ml de DEMEM-10% FCS para neutralizar la acción de la colagenasa. El tubo se centrifugó durante 10 min a 1,000 r.p.m. Después se descartó el sobrenadante, y el precipitado se resuspendió de nuevo en DEMEM-10% FCS y se centrifugó de nuevo. Esta acción se repitió hasta al alcanzar un número de 3 centrifugaciones en total. Finalmente el precipitado se resuspendió en medio M199 con 20% de FCS, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de suplemento de crecimiento de células endoteliales (Endothelial Cell Growth Supplement, ECGS), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de heparina y las concentraciones de antibióticos y glutamina anteriormente mencionadas (medio M199-20% FCS). Las células se sembraron en un frasco de 75 cm^2 de superficie, recubierto con una película de colágeno tipo I en una solución estéril de ácido acético 0,1 M al 0,03% (p/v) y permaneció en la estufa húmeda a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO_2 .

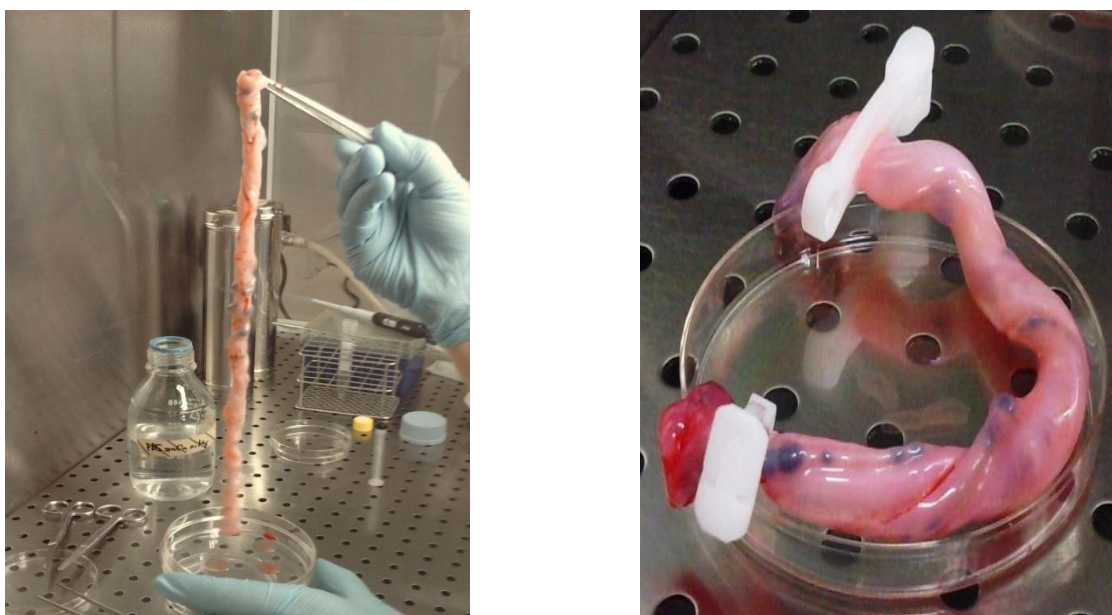


Fig. 11. Extracción de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano. Imágenes de cordones umbilicales humanos durante los procedimientos de limpieza con PBS e incubación con colagenasa introducida en la vena umbilical llevados a cabo en el proceso de extracción de células endoteliales.

El medio del cultivo se renovó cada 48 h con M199-20% FCS. Al alcanzar la confluencia, las células se despegaron por tripsinización empleando la solución de

tripsina al 0,05% y se sembraron en placas para la realización de los experimentos. Una vez confluentes los cultivos, el medio M199-20% FCS fue sustituido por el medio M199-10% FCS con el fin de reducir la cantidad de suero del mismo. Las células fueron tratadas de acuerdo a los experimentos planeados y durante el tipo indicado para cada uno de ellos. Para la realización de estos experimentos se utilizaron los pases del 1 al 4.

4. Caracterización celular.

Después de obtener los cultivos, se caracterizaron las CMLAH y las HUVEC por su aspecto morfológico y por técnicas de inmunofluorescencia indirecta (Dubey et al., 1992). En el caso de las CMLAH se utilizó un anticuerpo contra α -actina de músculo liso y para las HUVEC se empleó un anticuerpo contra Factor Von Willebrand o Factor VIII. A continuación se detalla la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

5. Inmunofluorescencia indirecta.

Las CMLAH y HUVEC se cultivaron en cubreobjetos esterilizados de 12 mm de diámetro en placas de 24 pocillos (2,0 cm²). La caracterización celular mediante la observación de α -actina e iNOS en CMLAH y la visualización del Factor VIII, la ICAM-1 y la VCAM-1 en HUVEC se realizaron de acuerdo a lo descrito anteriormente (Peiró et al., 2003; Romacho et al., 2009; Azcutia et al., 2010), para lo cual fue empleada la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Fig. 12).

Una vez concluido el tiempo de tratamiento, se eliminaron los restos de medio en las células lavando suavemente con PBS. Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 10 min a temperatura ambiente y después se lavaron 3 veces con PBS. Para evitar los sitios de unión inespecífica del anticuerpo, las células se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación, con una solución de PBS que contenía 1% de BSA y 0,1% de Triton X-100 (solución de bloqueo); después se eliminó el bloqueo sin efectuar lavados con PBS.

A continuación, las células se incubaron en la solución de bloqueo con los anticuerpos primarios correspondientes en las condiciones detalladas en la tabla 3: anticuerpo primario policlonal frente a iNOS, anticuerpos primarios monoclonales frente a α -actina Factor VIII, ICAM-1 (clon 6.5B5) y VCAM-1 (clon 1.G11B1).

Así mismo, se realizó un control negativo de la técnica para lo cual se reservó un pocillo de la placa en condiciones basales, en el que se renovó la solución de bloqueo en lugar de añadir el anticuerpo primario. Esto nos permitió determinar que la fluorescencia observada correspondía a la tinción específica provocada por el anticuerpo y no al fondo inespecífico derivado del fluorocromo acoplado al anticuerpo secundario.

Pasado el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar los restos de anticuerpo no adherido. Las células fueron incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente (IgG) en la solución de bloqueo, en agitación suave y oscuridad siguiendo las condiciones especificadas en la tabla 4. El anticuerpo secundario se une a la fracción constante del anticuerpo primario y se encuentra acoplado a un fluorocromo que emite fluorescencia a una longitud de onda determinada. Para la α -actina se empleó un anticuerpo secundario unido al fluorocromo isocianato de fluoresceína (FITC) y para la iNOS, un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 546. En el caso del Factor VII se utilizó un anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo isotiocianato de tetrametil-rodamina (TRITC) que emite fluorescencia a una longitud de onda de 570 nm y tanto para ICAM-1 como para VCAM-1 se utilizó el anticuerpo secundario unido al fluoróforo Alexa Fluor 488. A continuación se realizaron 2 lavados con PBS y un último lavado con agua para eliminar las sales del PBS.

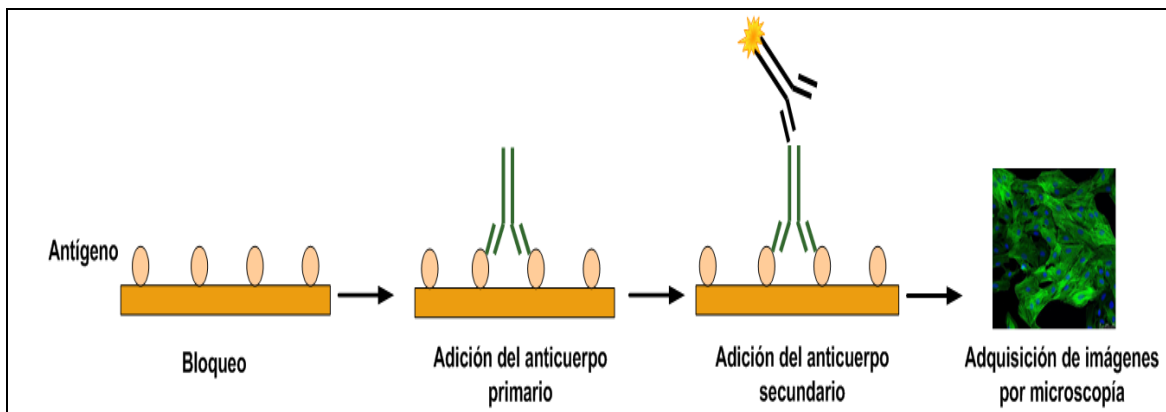


Fig. 12. Esquema del fundamento de la técnica de inmunofluorescencia indirecta. El anticuerpo primario se une al antígeno de interés, mientras que el secundario se encuentra marcado con un fluoróforo que reconoce al primario y se une a él.

Para visualizar los núcleos celulares, las preparaciones se incubaron con una solución de PBS que incluía 0,5 μ M de 4,6-diamidino-2-fenilindol 2 HCl (DAPI), un

colorante que tiene afinidad por el ADN y emite fluorescencia a una longitud de onda de 570 nm. Finalmente las preparaciones se montaron sobre un portaobjetos empleando el reactivo ProLong, un medio montaje acuoso rico en glicerol.

Las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia Eclipse TE300 (Nikon, Tokio, Japón) y las imágenes se captaron con una cámara SPOT 13.0 acoplada al microscopio, empleando un objetivo de 40x y un ocular de 10x. Para la captación y análisis de las imágenes se utilizó el programa informático Adobe Photoshop 5.0.2. Para cada tratamiento, las imágenes se captaron en las mismas condiciones de ganancia y tiempo de exposición.

<i>Anticuerpos primarios</i>	<i>Dilución</i>	<i>Especie</i>	<i>Tiempo</i>	<i>T (°C)</i>	<i>Casa comercial</i>
α -actina	1:50	Ratón	12 h 1 h	4°C 23 °C	Chemicon (Temecula, CA, Estados Unidos)
Factor VIII	1:100	Conejo	12 h 1 h	4°C 23 °C	DAKO (Glostrup, Dinamarca)
iNOS	1: 250	Conejo	12 h 1 h	4°C 23 °C	BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, CA, Estados Unidos)
ICAM-1	1:100	Ratón	12 h 1 h	4°C 23 °C	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, Estados Unidos)
VCAM-1	1:100	Ratón	12 h 1 h	4°C 23 °C	Millipore Corporation (Bedford, MA, Estados Unidos)

Tabla 3. Características de los anticuerpos primarios empleados y sus condiciones de incubación correspondientes.

<i>Anticuerpos secundarios-fluorocromo</i>	<i>Dilución</i>	<i>Especie</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Casa comercial</i>
Anti Ig-G de raton-FITC	1:200	Cabra	1 h	Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos)
Anti Ig-G de conejo-Alexa Flour 546	1:250	Cabra	1 h	Molecular Probes-Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos)
Anti Ig-G de conejo-TRITC	1:200	Cabra	1 h	Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos)
Anti Ig-G de ratón-Alexa Flour 488	1:250	Cabra	1 h	Molecular Probes-Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos)

Tabla 4. Características de los anticuerpos secundarios empleados y sus condiciones de incubación correspondientes. Todos los anticuerpos fueron incubados a temperatura ambiente.

6. Microscopía confocal.

La microscopía confocal es una técnica por medio de la cual, a partir de muestras con marcaje fluorescente se obtienen secciones ópticas muy finas éstas, empleando láseres, un conjunto de diafragmas especiales (pinhole) y un sistema electrónico de captación de imagen. Utilizando este sistema es posible reconocer estructuras en las que la luz emitida o reflejada por una muestra se concentra en un solo plano focal y se superpone a toda la luz que no procede de dicho plano, con lo cual, se consigue un enfoque en un único plano (confocal). Por lo tanto, se puede eliminar la interferencia producida por la luz que llega de los diferentes campos ópticos del grosor de la muestra que se observa, obteniendo imágenes digitales precisas del espécimen a observar. Las muestras empleadas para ser analizadas por microscopía confocal, se obtuvieron de acuerdo a los procedimientos descritos anteriormente.

Las imágenes se captaron empleando un microscopio confocal espectral (Leica TCS SP5, AOBS, Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) acoplado a un microscopio invertido con fuentes de láser de Diodo azul (405 nm), DPSS (561 nm), Argón (488 nm) y Helio-Neón (594, 633 nm). El sistema TCS SP de Leica permite crear el plano único focal y una serie de planos (horizontales y verticales), además de un corte vertical o un barrido xz, que proporciona un vista lateral de la muestra. Las imágenes se captaron por medio de una cámara de video digital Leica DFC 350 FX acoplada al microscopio y específica para la obtención de imágenes de fluorescencia (3.3 Mpíxeles; 12 bits de profundidad de escala de grises). Para cada preparación se tomaron imágenes en secciones de planos de 1 μm con aceite de inmersión empleando un objetivo 63X/1.4-0.6 con coerción cromática (lambda blue).

7. Western Blot.

7.1 Extracción de las muestras.

La isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa y la proteína p53 se cuantificaron mediante la técnica de western Blot. Tras los diferentes tratamientos, se realizó la extracción de proteínas para realizar el Western Blot, las células se lavaron 2 veces con PBS frío y se rasparon con un rascador de plástico. Para este procedimiento se empleó por cada placa, 100 μl de tampón de lisis constituido por 25 mM de Tris pH 7,9, 0,5 mM de EDTA, 0,5 mM de fenilmetilsulfonil floururo (PMSF), 12,5 $\mu\text{g/ml}$ de aprotinina y 10 mM de ortovanadato. Los lisados celulares obtenidos se dejaron reposar por 15 min en hielo y se centrifugaron a 13,000 r.p.m. durante 1 min a

4°C. Posteriormente, se recogió el sobrenadante y se desechó el precipitado. La concentración de proteína presente en el sobrenadante se cuantificó por medio del método colorimétrico del ácido bicinonínico (BCA). Los extractos proteicos obtenidos se alicuotaron y las muestras se almacenaron a -20° C, hasta ser procesadas.

7.2 Cuantificación de proteínas por el método de BCA.

El BCA es un método colorimétrico para la determinación de la cantidad de proteínas, basado en la reducción proporcional a la cantidad de proteína de Cu^{2+} a Cu^+ en medio alcalino (reacción de Biuret). Posteriormente el ácido bicinonínico forma un complejo color púrpura con los iones Cu^+ en el medio alcalino, cuya absorbancia puede ser determinada a una longitud de onda de 540 nm. Para tal determinación, por cada muestra se colocaron en una placa de 96 pocillos ($0,32 \text{ cm}^2$), 5 μl del extracto proteico y 5 μl de agua. Para realizar la curva patrón con BSA, se añadieron 5 μl de tampón de lisis y 5 μl de concentraciones crecientes de BSA (0-2 mg/ml) en cada pocillo. A continuación se añadieron a cada pocillo 200 μl de un reactivo comercial compuesto por dos soluciones, ambas fueron mezcladas previamente en un abrevadero. La placa se dejó incubar en la estufa a 37°C y protegida de la luz durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se realizó la lectura de la placa a una longitud de onda de 540 nm en un lector de placas ELX800 (BIO-TEK Instruments, Winooski, VT, Estados Unidos).

7.3 Electroforesis y transferencia de proteínas.

Los extractos de proteínas (15-20 μg) se disolvieron en una proporción 3:1, en un tampón de Laemmli compuesto por 125 mM de Tris, 2% de dodecilsulfonato sódico (SDS), 5% de glicerol, 1% de β -mercaptoetanol y 0,025% de azul de bromofenol. Enseguida, las muestras se hirvieron durante 5 min a 100° C. En base a la cuantificación de proteína se calculó la cantidad de volumen necesaria para tener 15-20 μg de proteína en cada carril del gel. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) a una corriente constante de 90-120 V durante 1-2 h. Después de ser separadas las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm de diámetro de poro durante 3 h a 350 mA constantes.

7.4 Incubación de anticuerpos

Una vez realizada la transferencia, se extrajo la membrana de nitrocelulosa y se bloquearon las uniones inespecíficas de los anticuerpos empleando una solución

de tampón salino de Tris y Tween (TBS-T; 0,1M de cloruro de sodio (NaCl), 0,01 M de Tris pH 7,5 y Tween 20 al 0,01%) con leche en polvo desnatada al 2,5% o 5%, durante toda la noche a 4°C (en el caso de la expresión de α -tubulina) o 30 min a temperatura ambiente (en el caso de la expresión de iNOS). A continuación se determinaron los niveles de la expresión de iNOS, empleando los respectivos anticuerpos primarios incubados en TBS-T en las condiciones especificadas en la tabla 5. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados sucesivos de 5 min cada uno, con una solución de tampón salino de TBS-T. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario adecuado unido a peroxidasa de rábano (HRP) (tabla 6). Al cabo de este tiempo, se efectuaron 3 lavados con una duración de 5 min cada uno con el tampón de TBS-T.

<i>Anticuerpos primarios</i>	<i>Dilución</i>	<i>Especie</i>	<i>Tiempo</i>	<i>T(°C)</i>	<i>Casa comercial</i>
iNOS	1: 1000	Conejo	12 h	4°C	BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, CA, Estados Unidos)
α -tubulina	1: 10 000	Ratón	1 h	23 °C	Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos)

Tabla 5. Características de los anticuerpos primarios empleados y sus condiciones de incubación correspondientes.

<i>Anticuerpos secundarios-HRP</i>	<i>Dilución</i>	<i>Especie</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Casa comercial</i>
Anti-ratón	1:10 000	Cabra	45 min	Millipore Corporation (Bedford, MA, Estados Unidos)
Anti-conejo	1:10 000	Cabra	1 h	Bio-Rad (Hércules, CA, Estados Unidos).

Tabla 6. Características de los anticuerpos secundarios empleados y sus condiciones de incubación correspondientes. Todos los anticuerpos fueron incubados a temperatura ambiente.

7.5 Revelado de la membrana

Las bandas inmunoreactivas se detectaron incubando la membrana durante 2 min a temperatura ambiente, con una mezcla de reactivos obtenidos de un kit comercial de quimioluminiscencia por luminol (Luminata™ Forte), produciéndose la emisión de luz por oxidación de la peroxidasa. Se eliminó el exceso de solución a la membrana, se envolvió en un plástico tipo film y se expuso en el analizador de imagen (Chemidoc™ XRS System, Bio-Rad, Hercules, California, Estados Unidos) durante el

tiempo necesario para obtener la señal del anticuerpo buscado. El análisis de la intensidad de las bandas se realizó empleando el programa informático de libre acceso NIH Image J 1.44p (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

La expresión de α -tubulina se empleó como control de carga, para lo cual la membrana fue incubada con una solución restauradora durante 20 min. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con la solución de TBS-T y se bloqueó la membrana durante 1 h con una solución con 5% de leche. Para la determinación de la α -tubulina la membrana se incubó con el anticuerpo primario monoclonal frente a α -tubulina de acuerdo a lo establecido en la tabla 5. Tras la incubación se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con el tampón de TBS-T. La membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a HRP (tabla 6). Se realizaron 3 lavados sucesivos durante 5 min con la solución de TBS-T y las bandas se detectaron empleando el kit comercial de quimioluminiscencia previamente especificado.

8. Cuantificación de nitritos en el sobrenadante celular.

La cantidad de nitritos de los sobrenadantes celulares fue determinada mediante el método de Griess, empleado como una medida indirecta de la cantidad de óxido nítrico, de acuerdo a lo descrito previamente (Green y et al., 1982; Lafuente et al., 2008). Las CMLAH se sembraron en placas de 24 pocillos (2,0 cm²). Al alcanzar la confluencia se ayunaron durante 24 h con DMEM-0,1% de BSA y se incubaron durante 18 h con los tratamientos correspondientes. Cada tratamiento fue realizado por triplicado.

Posteriormente, se recogieron 250 μ l de sobrenadante celular de cada pocillo y se transfirieron por duplicado a una placa de 96 pocillos (0,32 cm²) sobre la cual se efectuó el ensayo. Los pocillos de la placa fueron lavados 3 veces con PBS y se les añadió 500 μ l de hidróxido de sodio (NaOH) 0,2 M para posteriormente cuantificar la cantidad de proteína de cada pocillo por el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando el reactivo comercial correspondiente.

El método de Griess se basa en añadir al sobrenadante celular una solución de sulfanilamida al 1%, la cual reacciona de manera equimolar con los nitritos a pH ácido, originando la formación de una sal de diazonio que al reaccionar con la amina aromática, N-(1-Naftil) etilendiamina, (NEDA) al 0,1%, da lugar a un compuesto azoico de color rosado que absorbe a 540 nm tal y como se describe en la Fig. 13. Los

reactivos de Griess fueron estables durante 2 meses a 4°C, protegidos de la luz; y se mezclaron inmediatamente antes de realizar la reacción colorimétrica. A cada pocillo de la placa se le añadieron 200 μ l de la mezcla del reactivo de Griess y posteriormente se incubó la placa sin luz durante 10 min a temperatura ambiente. Los productos de la reacción fueron determinados midiendo la absorbancia en un lector de placas ELX800 (BIO-TEK Instruments, Winooski, VT, Estados Unidos) a 540 nm, durante la primera media hora tras haber añadido los reactivos de Griess.

Así mismo, en cada experimento fue realizada una curva patrón empleando concentraciones conocidas de 0 a 30 μ M de nitrito sódico (NaNO_2), con lo cual se estableció una relación entre la absorbancia y la concentración de nitritos. Los datos obtenidos se normalizaron respecto a la cantidad de proteínas de cada pocillo.

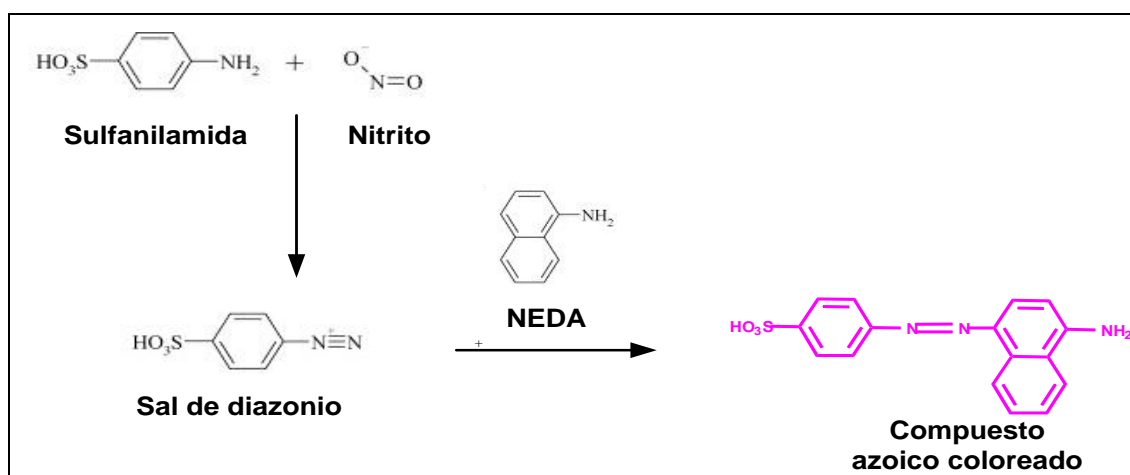


Fig. 13. Esquema de las reacciones del fundamento del método de Griess. La reacción de Griess se basa en la formación de un cromóforo por la reacción de sulfanilamida con nitrito en medio ácido, seguido de un acoplamiento con N-1-(naftil)etilendiamina (NEDA).

9. Determinación de la actividad de la NADPH oxidasa.

La actividad de la NADPH-oxidasa se determinó en CMLAH sometidas a distintos tratamientos, a través del método de quimiolumiscencia por lucigenina. Como se observa en la Fig. 14, este método se fundamenta en la formación de un catión de lucigenina por acción de un agente reductor del propio sistema biológico, a partir del cual se forma el dioxenato de lucigenina por acción del O_2^- producto de la enzima NADPH-oxidasa; posteriormente para estabilizar la lucigenina, el dioxenato cede su energía en forma de ondas electromagnéticas que pueden ser detectadas a través de un luminómetro.

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (9,6 cm²), al alcanzar la confluencia se ayunaron durante 24 h con DMEM-0,1% de BSA y se incubaron durante 18 h con los tratamientos correspondientes. Cada tratamiento fue realizado por triplicado. Al finalizar el tiempo de tratamiento, se extrajeron los lisados de proteínas, para lo cual las células se lavaron 2 veces con PBS y se rasparon con un rascador de plástico utilizando 600 µl de PBS en hielo. Los lisados celulares obtenidos se incubaron durante 15 min en hielo y se centrifugaron a 13,000 r.p.m. durante 1 min a 4°C. Posteriormente se recogió el sobrenadante y se desechó el precipitado. Enseguida se añadió a cada muestra 100 µl de tampón de homogenización compuesto por 50 mM de fosfato de potasio (KH₂PO₄), 1 mM de ácido etilenglicoltetraácetico (EGTA) y 150 mM sacarosa a un pH de 7. Cada muestra fue homogenizada durante 5 minutos en hielo empleando un micromortero de microtubos.

La cantidad de proteína se cuantificó por medio del método de BCA, descrito previamente en el apartado 6.2. Las muestras obtenidas se almacenaron a -80° C hasta ser procesadas. Una vez determinada la cantidad de proteína en cada muestra, se efectuaron los cálculos para obtener 5 µg de proteína. A continuación se preparó una mezcla compuesta por PBS sin calcio ni magnesio, 5 µM de N,N'-dimetil-9,9'-dinitrato de biacridinio (lucigenina) y 100 µM de β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Previamente a la realización del experimento la solución se calentó a 37° C. Posteriormente, se transfirió a un tubo de plástico 290 µl de la mezcla previamente descrita y 10 µl de lisado que contenía 5 µg de proteína. Finalmente se tomaron medidas en un luminómetro (Optocomp IB Bacterial Systems, GEM Biomedical Inc, Hamdem, CT, Estados Unidos) cada 10 s durante 5 min.

Las primeras 5 mediciones se descartaron para permitir la estabilización de las lecturas y a partir de la sexta medición se calculó un promedio de todas las medidas obtenidas. Los datos se expresaron como las unidades de luz relativas (URL) por µg de proteína presente en cada muestra sometida a los diferentes tratamientos.

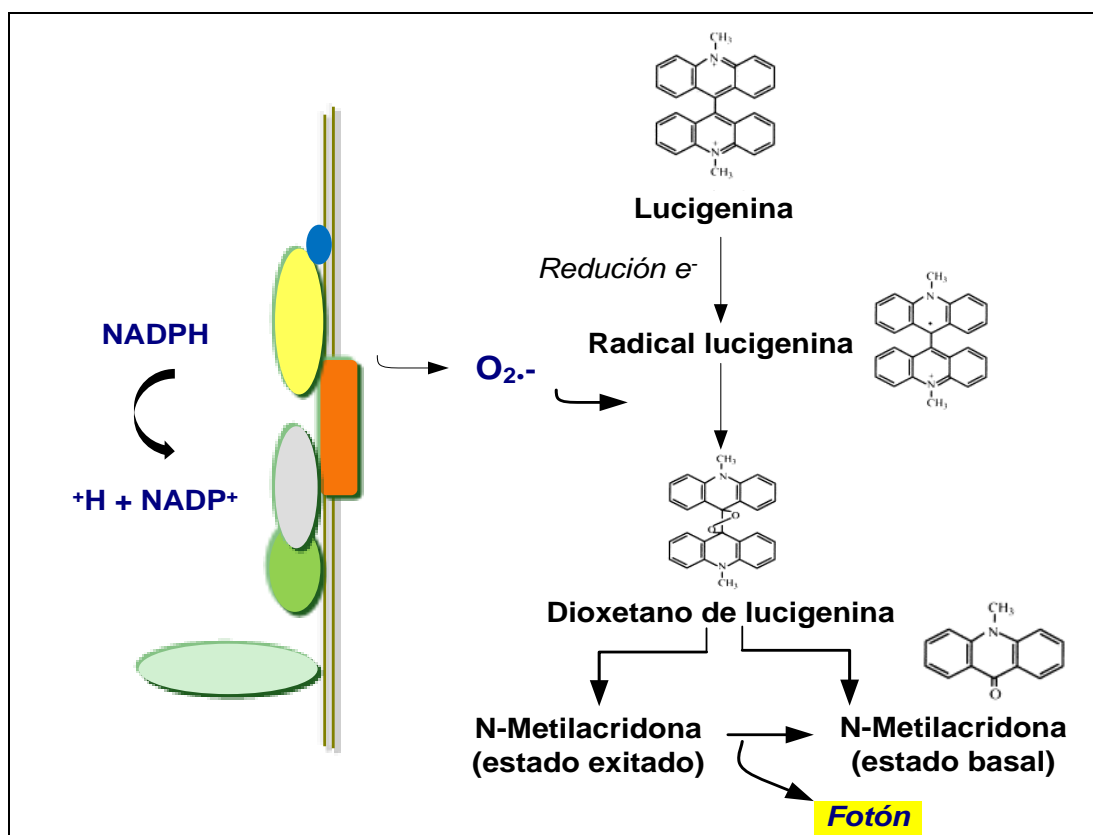


Fig. 14. Ilustración esquemática de las reacciones que dan lugar a la producción de quimioluminiscencia por lucigenina. La lucigenina primero es reducida, usualmente por el mismo sistema biológico. El anión superóxido O₂⁻ reacciona con la lucigenina reducida para generar un fotón (hv).

10. Ensayo de retardo en gel (EMSA).

El ensayo de retardo en gel fue empleado para medir la actividad de factor de transcripción NF- κ B. Es un método en el cual una sonda purificada de ADN específico para la secuencia de interés es marcada radiactivamente y se incuba con una muestra de extractos nucleares para formar un complejo proteína-ADN estable, lo que ocasiona un cambio en la movilidad electroforética del ADN; existiendo un retardo de los complejos en relación con el ADN libre (Fig. 15).

Las CMLAH se cultivaron en placas de 60 mm de diámetro y fueron ayunadas con medio DMEM 0,1% BSA e incubadas durante 18 h con los tratamientos correspondientes. Las placas se lavaron 2 veces con PBS frío y se les añadió 200 μ l de tampón de lisis A frío que contenía 10 mM de HEPES pH 7,9, 10 mM cloruro de potasio (KCl), 0,1 mM de EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM ditioneitol (DTT) y 0,5 mM PMSF para, posteriormente, ser rascadas. La suspensión obtenida se dejó reposar en

hielo durante 15 min y después se agregaron 12,5 μ l de etilfenol polietilenglicol éter (Nonidet P-40) al 10% y la muestra se agitó en el vortex durante 10 s. Posteriormente se centrifugó la suspensión celular a 13,000 r.p.m. durante 30 s y se desechó el sobrenadante que contenía el extracto citoplasmático y el ARN. El precipitado resultante se resuspendió en 50 μ l de tampón C frío, constituido por 20 mM de HEPES pH 7,9, 400 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 1 mM de DTT y 1 mM de PMSF y después fue agitado durante 15 min a 4°C. De nuevo se centrifugó durante 5 min a 13,000 r.p.m. y se recogió el sobrenadante que contenía el extracto nuclear, el cual se almacenó a -80°C hasta ser procesado. La cantidad de proteína presente en el extracto nuclear fue determinado mediante el método colorimétrico BCA, según lo descrito en el apartado 6.2.

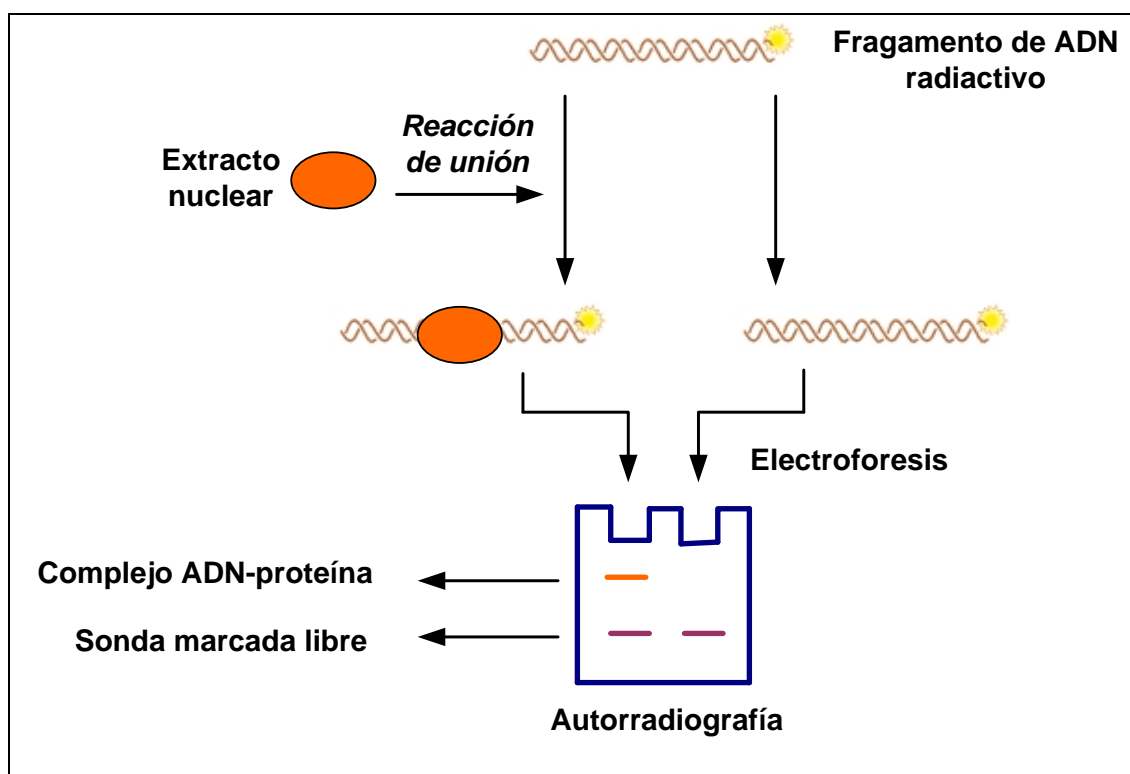


Fig. 15. Diagrama de la técnica de ensayo de retardo en gel (EMSA). Un fragmento de ADN de doble cadena marcado radiactivamente y específico para la secuencia de interés (NF- κ B) se incuba con un extracto nuclear de proteínas. El complejo resultante se separa de la sonda marcada libre de ADN mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida. La proteína retarda la movilidad de los fragmentos de ADN a los cuales está unida, por lo cual el ADN libre migrará más rápido a través del gel, en comparación con el complejo ADN-proteína.

De acuerdo al protocolo descrito (Romacho et al., 2009) se llevó a cabo el marcaje del oligonucleótido comercial que codifica para la secuencia consenso de NF- κ B (5'- AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') en el extremo 5' con [γ ³²P]ATP,

empleando la polinucleótido quinasa T4. A continuación, se purificó la sonda con columnas illustraMicroSpin™ G-25 y se midió la emisión tipo β - de la actividad de la sonda marcada en un contador de centelleo TriCarb 2800TR (Perkin Elmer, Whaltham, MA, Estados Unidos).

La reacción de unión del factor de transcripción al ADN se realizó incubando durante 15 min los extractos nucleares (5 μ g) en un tampón que contenía 0,40 mM de HEPES pH 7, 140 mM de NaCl, 5 mM de DTT, 10 μ g/ml de BSA, Nonidet p-40 al 0,01%, Ficoll al 4% y 0,05 μ g/ml de poli(dI-dC)-poli(dI-dC). Después se añadió el oligonucleótido marcado (50,000 cpm) y la mezcla se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. En algunos casos a la reacción de unión se le añadió un exceso (100X) de oligonucleótidos de doble cadena no marcados (sonda fría), con el fin de verificar la especificidad de la unión del oligonucleótido marcado al NF- κ B.

Los complejos proteína-ADN estables se separaron en un gel de poliacrilamida no desnaturizante al 4% en tampón de TBE 0,5% (45 mM de Tris-borato y 0,1 mM de EDTA a pH 8) a 80 V durante 1 h y a 4 °C. Los geles se secaron y se expusieron con películas para autorradiografía (X-Ray Film AX) a -80°C. Las bandas obtenidas fueron cuantificadas empleando el programa programa informático de libre acceso NIH Image J 1.44p (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

11. Citometría de Flujo.

La técnica de citometría de flujo se basa en hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y de una por una por delante de un haz luminoso, dando como resultado dos tipos de informaciones; la producida por la dispersión de luz y la relacionada con la emisión de luz ocasionada por los fluorocromos presentes en la célula al ser excitada por el rayo luminoso. Estas señales son detectadas y pueden ser procesadas a través de un ordenador. Por medio de este procedimiento esquematizado en la Fig. 16 se determinó la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1.

Este procedimiento fue llevado a cabo de acuerdo a lo descrito previamente (Azcutia et al., 2010). Las células se lavaron 2 veces con PBS y se despegaron con una solución de tripsina al 0,05%. Nuevamente fueron lavadas con PBS y centrifugadas durante 5 min a 3,000 r.p.m., el sobrenadante fue desechado y el precipitado fijado con PFA al 2% durante 15 min a temperatura ambiente. Las

suspensiones celulares fueron centrifugadas durante 3 min a 3,000 r.p.m. y se conservó el precipitado de cada una de ellas. Los precipitados se incubaron con una solución de bloqueo compuesta por PBS con 3% de BSA durante 30 min con el propósito de bloquear la unión de anticuerpos a sitios inespecíficos. Posteriormente, las soluciones se dividieron en dos alícuotas y se centrifugaron 3 min a 3,000 r.p.m. Los precipitados obtenidos se incubaron en una solución de PBS con 0,5% de BSA por un lado con el anticuerpo monoclonal frente a ICAM-1 (clon 6.5B5) y por otro lado con el anticuerpo monoclonal frente a VCAM-1 (clon IE5), en las condiciones indicadas en la tabla 7. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron durante 3 min a 6,000 r.p.m. y se descartó el sobrenadante. Posteriormente los precipitados se incubaron en oscuridad con el anticuerpo secundario unido al fluoróforo Alexa Fluor 488 de acuerdo a lo establecido en la tabla 8. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 3 min a 6,000 r.p.m. y se conservó el sobrenadante que se resuspendió en 500 μ l de PBS.

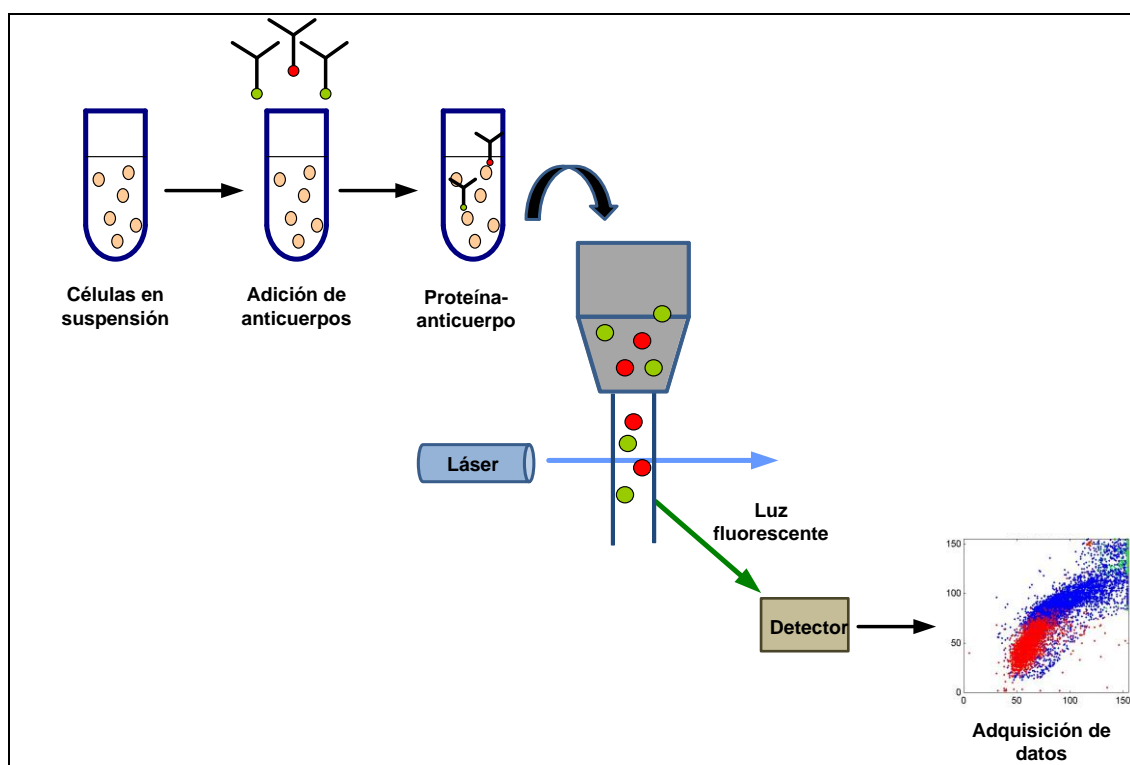


Fig. 16. Diagrama del fundamento de la técnica de citometría de flujo. Las células en suspensión a las que se le han añadido anticuerpos pasan alineadas a través de un tubo muy fino delante de un haz de láser. El impacto de las células con el láser es captado por detectores que miden la dispersión de la luz y la fluorescencia de la suspensión celular. Finalmente estas señales son digitalizadas para poder ser cuantificadas.

Las suspensiones celulares se conservaron en oscuridad a 4°C hasta ser analizadas en el citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos). Antes del ensayo, se ajustaron los parámetros relacionados con la

población celular, tales como el tamaño y su complejidad. Enseguida las muestras pasaron por el haz de luz y se midió la intensidad de la fluorescencia excitando el fluoróforo del anticuerpo secundario a 488 nm y se recogió la luz emitida a 519 nm; todo esto mediante el uso del programa informático Cell Quest BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos).

<i>Anticuerpos primarios</i>	<i>Dilución</i>	<i>Especie</i>	<i>Casa comercial</i>
ICAM-1	1:500	Ratón	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, Estados Unidos)
VCAM-1	1:300	Ratón	Millipore Corporation (Bedford, MA, Estados Unidos)

Tabla 7. Características de los anticuerpos primarios empleados y sus condiciones de incubación correspondientes. Todos los anticuerpos fueron incubados a temperatura ambiente y durante 20 minutos.

<i>Anticuerpos secundarios-fluorocromo</i>	<i>Dilución</i>	<i>Especie</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Casa comercial</i>
Anti Ig-G de ratón-Alexa Flour 488	1:750	Cabra	30 min	Molecular Probes-Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos)

Tabla 8. Características de los anticuerpos primarios empleados y sus condiciones de incubación correspondientes. Todos los anticuerpos fueron incubados a temperatura ambiente.

12. Determinación de la actividad SA- β -Galactosidasa (SA- β -Gal).

La determinación de la senescencia se llevó a cabo en las HUVEC empleando la tinción de SA- β -Gal. Es conocido, que en las células que han entrado en senescencia la enzima SA- β -Gal se eleva considerablemente. Como se detalla en la Fig. 17, esta enzima reacciona con el sustrato cromogénico y sintético 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal) a pH 6 (Dimitri et al., 1995). En esta reacción el X-gal es hidrolizado por la SA- β -Gal en galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol, el cual es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, que es un compuesto de color azul. Por lo tanto, las células senescentes presentarán esta coloración.

Las células fueron tratadas durante 24 h en un estado semiconfluyente, debido a que la confluencia podría causar la inducción de senescencia. Enseguida se realizó la

tinción mediante un kit comercial para la detección de SA- β -Gal. Primero se realizaron 2 lavados con PBS y se incubaron las células durante 7 min con una solución de fijación (dilución 1:10) que contenía formaldehído al 20%, glutaraldehído al 2%, 70,4 mM de fosfato de sodio (Na_2HPO_4), 14,7 mM de KH_2PO_4 , 1,37 M de NaCl y 26,8 mM de KCl. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas 3 veces con PBS. A continuación, se les añadió la mezcla de reacción que se encuentra a pH 6 y está compuesta por 5 mM de ferricianida de potasio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), 5 mM de ferrocianida de potasio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 1 mg/ml de X-gal y solución de tinción. Las placas fueron incubadas en una estufa sin CO_2 a 37°C durante un periodo entre 12 y 16 h. Finalmente las preparaciones fueron lavadas 3 veces con PBS, para eliminar cualquier resto de la tinción y conservadas en glicerol al 70%.

La tinción se visualizó empleando un microscopio óptico (Nikon TMS-F, Tokio, Japón) Para cada tratamiento, se contabilizaron aleatoriamente 800 células en diferentes campos y se identificó el número de células azules presentes. La proporción de células positivas a la tinción se determinó como el número de células azules presentes en el total de células contadas. Como control positivo de esta tinción se empleó el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a una concentración de 75 o 50 mM, el cual es conocido como un potente inductor de senescencia por estrés oxidativo cuyo daño es irreversible a concentraciones muy elevadas (Berlett y Stadman, 1997).

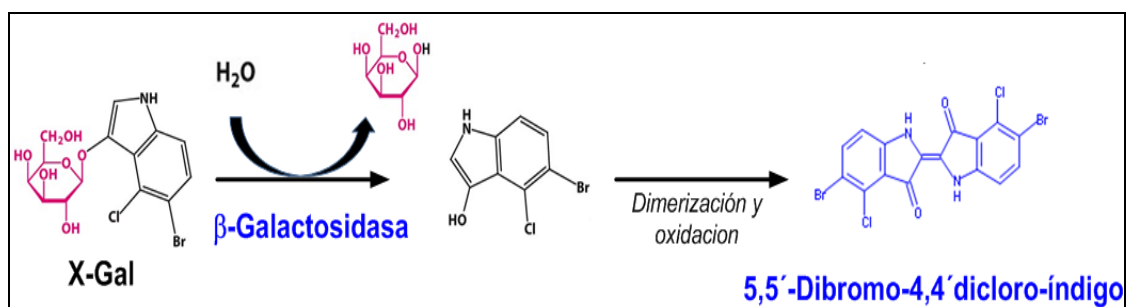


Fig. 17. Esquema de las reacciones que fundamentan la tinción de SA- β -Gal para la visualización de senescencia. El compuesto X-Gal es hidrolizado por la enzima β -galactosidasa, produciéndose galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol; el cual es oxidado a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, que es un compuesto de color azul.

13. Detección del daño telomérico.

Los puntos de daño en el ADN y la disfunción telomérica inducida (TIFs) se examinaron por una doble inmunofluorescencia. Todas las etapas involucradas en la realización de este experimento se llevaron a cabo a temperatura ambiente, las

diluciones y condiciones de incubación de los anticuerpos primarios y secundarios se resumen en la tabla 9 y 10 respectivamente.

Como se ha descrito previamente (Herbing et al., 2004; Cardus y Uryga et al., 2012), las células fueron lavadas 3 veces con PBS y fijadas durante 10 min con 4% de PFA en PBS. Se realizaron 2 lavados con PBS y se procedió a permeabilizar las células con 0.25% de Triton X-100 en PBS por 10 min. Una vez más, se efectuaron 2 lavados con PBS y las células fueron bloqueadas con una solución compuesta por 1% de BSA en PBS y 0,1% de Tween 20 (solución de bloqueo) durante 1 h.

Las preparaciones se incubaron con un anticuerpo monoclonal frente al factor 1 de unión a las repeticiones teloméricas (TRF-1, clon TRF-78) diluido en la solución de bloqueo previamente descrita (tabla 9). Tras lavar 3 veces con PBS y 0,1% de Tween 20 (PBS-0,1% Tween 20), las preparaciones se incubaron en solución de bloqueo con el anticuerpo secundario conjugado Alexa Fluor 488 en oscuridad (tabla 10). El anticuerpo frente a TRF-1 se emplea para detectar los telómeros debido a que la proteína TRF-1 se encuentra unida constitutivamente a las repeticiones TTAGGG del telómero, actuando como un regulador negativo de la longitud del mismo (Fig. 18) (Van Steensel y De Lange, 1997).

Posteriormente se realizaron 8 lavados durante 5 min con PBS-0,1% Tween 20 y se realizó de nuevo una fijación con 4% de PFA en PBS durante 15 min. A continuación se lavaron los cubreobjetos 2 veces con PBS. Con la finalidad de inactivar la acción del PFA, se incubaron las células durante 15 min con 25 mM de glicina en PBS.

Para detectar el daño telomérico se utilizó un anticuerpo policlonal frente a un fosfopéptido que se une a los residuos de Ser139 que rodean a la histona humana H2A.X, con el cual las preparaciones fueron incubadas en oscuridad y en una cámara humificada (tabla 9). Este anticuerpo fue empleado porque la H2A.X es una histona que se fosforila en el residuo Ser 139 (γ H2AX) cuando existe un daño en el ADN, tras lo cual desencadena la respuesta de reclutamiento de proteínas para que el ADN dañado sea reparado (Fig. 18) (D'Adda di Fagagna et al., 2003; Von Zglinicki et al., 2005).

Transcurrido este tiempo, se realizaron 5 lavados con PBS-0,1% Tween 20 durante 5 min. Después, las preparaciones se incubaron en la oscuridad y en una cámara húmeda, con el anticuerpo secundario conjugado Alexa Fluor 594 (tabla 10). Después se realizaron 8 lavados durante 5 min con PBS-0,1% Tween 20 y 1 vez con

PBS. El núcleo fue contrateñido con DAPI 150 mM durante 5 min. Se efectuaron 4 lavados con PBS y finalmente, los cubreobjetos se montaron empleando ProLong.

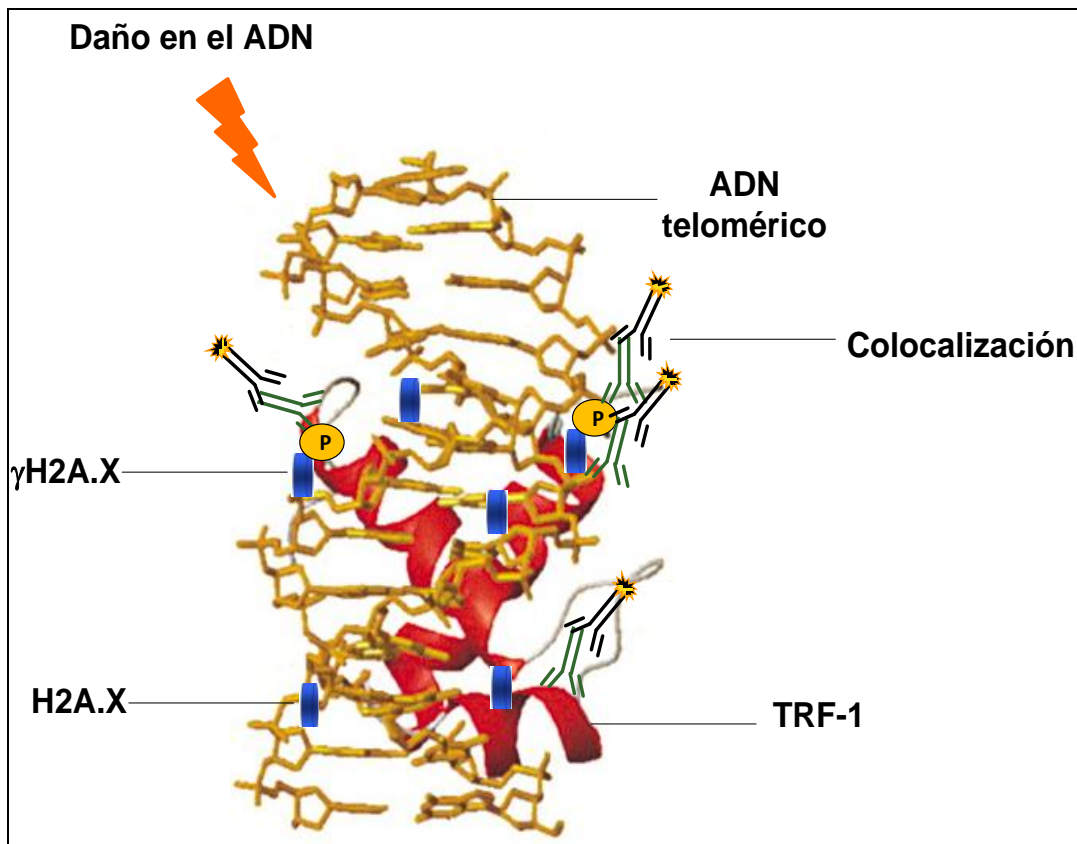


Fig. 18. Esquema del fundamento de la detección de daño telomérico. La proteína TRF-1 se encuentra unida a las repeticiones TTAGGG del telómero. La H2A.X es una histona que se fosforila en el residuo Ser 139 (γ H2AX) cuando existe un daño en el ADN. Los TIFs se detectan cuando colocalizan los anticuerpos que reconocen a ambas proteínas.

Para visualizar las muestras se utilizó un microscopio confocal (Nikon Eclipse 80i, Tokio, Japón) empleando un objetivo de inmersión Nikon S Flour 40x/1.3NA y un filtro fluorescente apropiado para DAPI, fluoresceína y rojo Texas (UV-2E/C, B-2E/C y G-2E/C, respectivamente). Se realizaron 40-50 capas (Z-stacks) de cada imagen con intervalos de espesor de 0,2 μ m empleando una cámara digital acoplada al microscopio (Hamamatsu Orca 285, Hamamatsu, Japón) y las imágenes se analizaron con el soporte informático Volocity 3D versión 5,5 (Perkin Elmers Inc., Massachusetts, MA, Estados Unidos). Las imágenes de alta resolución obtenidas se restauraron utilizando el módulo de restauración del soporte informático Volocity. Para determinar los puntos de colocalización en las 3 dimensiones, las capas de la imagen fueron

convertidas a voxels (píxeles de volumen) y fueron analizadas empleado el módulo de colocación del soporte informático. El porcentaje de fluorescencia roja, verde y la colocación fue expresado como voxels por células. Los puntos de disfunción telomérica inducida fueron expresados de la misma manera y se consideraron positivos cuando las células tenían \geq sitios de colocación. Para llevar a cabo estas cuantificaciones se analizaron al menos 250 núcleos de 10 imágenes de campos seleccionados aleatoriamente para cada tratamiento.

<i>Anticuerpos primarios</i>	<i>Dilución</i>	<i>Especie</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Casa comercial</i>
TRF-1	1:1000	Ratón	1 h	Abcam (Cambridge, Reino Unido)
p-histona H2A.X.	1:100	Conejo	1 h	Cell signaling (Beverly, MA, Estados Unidos)

Tabla 9. Características de los anticuerpos primarios empleados y sus condiciones de incubación correspondientes. Todos los anticuerpos fueron incubados a temperatura ambiente.

<i>Anticuerpos secundarios-fluorocromo</i>	<i>Dilución</i>	<i>Especie</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Casa comercial</i>
Anti Ig-G de conejo-Alexa Flour 594	1:250	Cabra	1 h	Molecular Probes-Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos)
Anti Ig-G de ratón-Alexa Flour 488	1:50 000	Cabra	1 h	Molecular Probes-Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos)

Tabla 10. Características de los anticuerpos primarios empleados y sus condiciones de incubación correspondientes. Todos los anticuerpos fueron incubados a temperatura ambiente.

14. Materiales.

Los medios de cultivo M199 y DMEM, el FCS y la tripsina empleados se obtuvieron de Biological Industries (Beit-Haemek, Israel), la penicilina de Penilevel laboratorios ERN S.A (Barcelona, España), el sulfato de estreptomina de Reig-Jofré (Barcelona, España) y la heparina sódica de Chiesi S.A (Barcelona, España). Los materiales de plástico estériles para el cultivo de células fueron adquiridos a Techno Plastic Products AG (TTP, Trasadingen, Suiza), los micromorteros de microtubos a Labbox (Barcelona, España), los cubreobjetos y portaobjetos a Menzel-Glaser (Braunschweig, Alemania). El glicerol, NaCl, KH₂PO₄, la sacarosa, el ácido acético y

fosfórico, fueron proporcionados por Panreac Química (Barcelona, España). De Merck se utilizaron el PFA, el KCl, NaOH y el aceite de inmersión (Darmstadt, Alemania).

Las membranas de nitrocelulosa fueron adquiridas a Whatman (Kent, Reino Unido), las películas fotográficas X-Ray Film AX a Konica Monolta Holdings Inc. (Madrid, España) y el kit de BCA a Pierce (Rockford, IL, USA). Las columnas *illustraMicroSpin™ G-25* y el poli(dl-dC)-poli(dl-dC) fueron conseguidos en GE Healthcare (Piscataway, NJ, Estados Unidos). El Nonidet P-40 fue obtenido en Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania) y la leche desnatada Sveltesse en Nestle (Vevey, Suiza). El oligonucleótido comercial para NF- κ B se adquirió en Sigma-Genosys (Cambridge, Reino Unido) y la polinucleótido quinasa T4 en Promega (Madison, WI, Estados Unidos). La solución restauradora (Re-Blot Plus Mild Solution) y la *Luminata™ Forte*, fueron suministrados por Millipore Corporation (Bedford, MA, Estados Unidos). De Bio Rad se empleó el reactivo Bio Rad Protein Assay (Hércules, CA, Estados Unidos). El DAPI y el ProLong fueron proporcionados por Molecular Probes-Invitrogen (Carlsbad, CA, Estados Unidos).

La IL-1 β y la visfatina fueron suministradas por PeproTech (Londres, Reino Unido). El inhibidor de la Nampt (E)-N-[4-(1-benzoilpiperidina-4-il) butil]-3-(piridin-3-il) acrilamida, APO866, fue cedido por Topotarget (Lausana, Suiza). Mientras que los inhibidores del receptor Mas, D-Ala⁷-Ang-(1-7) (A779) y D-Pro⁷-Ang-(1-7) (D-Pro) se consiguieron en BACHEM (Bubendorf, Suiza). En tanto que los siguientes reactivos fueron adquiridos a Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, Estados Unidos): Angiotensina II (Ang II), Angiotensina-(1-7) (Ang-(1-7)), el inhibidor de la NADPH-oxidasa (apocinina) y de NF- κ B (PDTC), lucigenina, NADPH, colagenasa tipo II, colágeno, EGCS, BSA, triton X-100, tween 20, NEDA, Tris, H₂O₂, HEPES, NMN, el kit de senescencia y el resto de reactivos empleados salvo que se indique lo contrario.

15. Análisis estadístico.

Los resultados de los experimentos se expresan como la media \pm error estándar de la media (EEM). El análisis estadístico se efectuó empleando el modelo de análisis de varianza (ANOVA), para analizar curvas de concentración y *t*-de student, para analizar valores discretos. Para dichos cálculos estadísticos se emplearon los programas informáticos Stat View 5.0 y el GraphPad Prism 5.0. Los resultados fueron considerados significativos a partir de un valor de *p* inferior a 0,05 (*p*<0,05).

RESULTADOS

I. RESULTADOS EN CMLAH

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CMLAH.

Después de obtener los cultivos celulares, se caracterizaron en función de su aspecto morfológico y por técnicas de inmunofluorescencia indirecta. Las células de músculo liso exhibieron una estructura alargada característica de este tipo celular y presentaron una tinción positiva de los filamentos delgados de α -actina, específica del músculo liso, obtenida a través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Fig. 19). De acuerdo a estas características se determinó que se trataba de un cultivo de células de músculo liso de aorta humana, que posteriormente fue empleado para la realización de los experimentos de este trabajo.

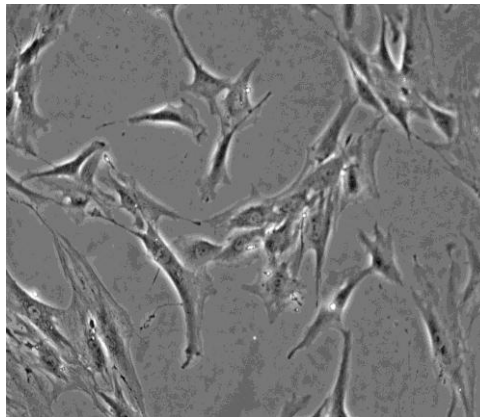
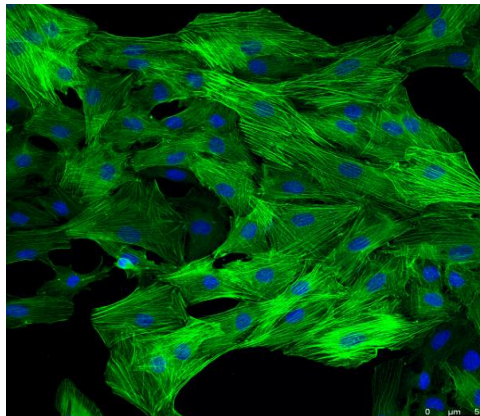
A**B**

Fig. 19. Células de músculo liso de aorta humana (CMLAH). (A) Micrografía en contraste de fase de un cultivo de CMLAH. 200X. (B) Tinción positiva de los filamentos de α -actina (1/50) de las CMLAH por inmunofluorescencia indirecta. 400X.

2. LA ANG-(1-7) ATENÚA LA INFLAMACIÓN INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II E IL-1 β EN CMLAH A TRAVÉS DEL RECEPTOR Mas.

2.1 La Ang-(1-7) previene la inducción de iNOS estimulada por Ang II de una manera dependiente de la concentración.

Con el fin de determinar si el efecto antiinflamatorio de la Ang-(1-7) podría ser dependiente de su concentración, las CMLAH se incubaron durante 18 h con concentraciones crecientes de Ang-(1-7) (1 nM a 1 μ M) y se estimularon con Ang II (100 nM). Por la técnica de Western blot se observó que el tratamiento con Ang II aumentó significativamente la expresión de iNOS (Fig. 20). Por otra parte observamos, que la Ang-(1-7) disminuyó significativamente los niveles de iNOS de una manera dependiente de la concentración, ya observable a partir de la concentración de 1nM (Fig. 20).

2.2 La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, previene la inducción de iNOS estimulada por Ang II.

Al alcanzar la confluencia, las CMLAH se ayunaron durante 24 h y fueron tratadas con Ang II (100 nM) y Ang-(1-7) (100 nM) o en combinación durante 18 h. Posteriormente, se cuantificó la expresión de la enzima proinflamatoria iNOS mediante Western blot. En la figura 21 se observa que la Ang II indujo la expresión de iNOS de una manera significativa respecto al tratamiento basal. En presencia de Ang-(1-7) la inducción de iNOS causada por Ang II se redujo significativamente (Fig. 21).

Para comprobar si el efecto antiinflamatorio de la Ang-(1-7) estaba mediado a través del receptor Mas se emplearon dos antagonistas selectivos del receptor Mas, el A779 y D-Pro⁷-Ang-(1-7). Así, las CMLAH se preincubaron con los antagonistas del receptor Mas, A779 (1 μ M) o D-Pro⁷-Ang-(1-7) (1 μ M), y seguidamente se estimularon con Ang II y Ang-(1-7) durante 18 h. Se observó que el efecto inhibitor de la Ang-(1-7) sobre la inducción de iNOS por Ang II se abolió en presencia de dichos inhibidores (Fig. 21). Lo anterior nos indicó que la acción de la Ang-(1-7) está mediada a través del receptor Mas. Cabe mencionar que la Ang-(1-7), el A779 y el D-Pro⁷-Ang-(1-7) por si solos no modificaron de manera significativa la inducción basal de iNOS (97,59 \pm 24,52% para Ang-(1-7), 110,36 \pm 10,02% para A779 y 116,77 \pm 9,81% para D- D-Pro⁷-Ang-(1-7) respecto a las condiciones basales; *p>0.05; resultados de nueve experimentos independientes).

Por otra parte, mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta se visualizó la inducción de iNOS estimulada por Ang II (100 nM) y la reducción parcial de este efecto por Ang-(1-7) (100 nM). Paralelamente se observó que la disminución de los niveles de expresión de iNOS causada por la acción de la Ang-(1-7) fue prevenida por la presencia del antagonista del receptor Mas, A779 (1 μ M) (Fig. 22).

En tanto que la expresión de iNOS y la liberación de nitritos inducida por Ang II (100 nM) fue abolida totalmente en presencia de losartán (1 μ M), lo que confirmó que la acción de la Ang II está mediada por el receptor AT₁ (94,59 \pm 3,86% para iNOS y 97,39 \pm 0,07% para nitritos ambos frente a Ang II; #p<0.05; resultados de cuatro y tres experimentos independientes respectivamente).

2.3 La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, previene la liberación de nitritos estimulada por Ang II.

Una vez demostrada la capacidad de la Ang-(1-7) para inhibir la expresión de iNOS inducida por Ang II, se decidió comprobar su efecto sobre la liberación de nitritos, los cuales fueron cuantificados en el sobrenadante celular de las CMLAH, como una medida indirecta de la producción de óxido nítrico (NO) mediante el método de Griess. Para ello las células fueron nuevamente tratadas con los diferentes compuestos. Se observó un incremento de la liberación de nitritos producido por Ang II (100 nM), que en combinación con Ang-(1-7) (100 nM) disminuyó de manera significativa (Fig. 23). Así mismo, se determinaron los valores de nitritos en las células que fueron pretratadas con A779 (1 μ M) o D-Pro⁷-Ang-(1-7) (1 μ M). Tal y como se muestra en la figura 23, estos compuestos causaron una abolición del efecto inhibitor de Ang-(1-7) sobre la liberación de nitritos estimulada por Ang II. Por si mismos, la Ang-(1-7), el A779 y el D-Pro⁷-Ang-(1-7) no lograron modificar los niveles de nitritos respecto a las condiciones basales (108,90 \pm 8,80% para Ang-(1-7), 101,10 \pm 18,20% para A779 y 105,49 \pm 1,81% para D-Pro⁷-Ang-(1-7) respecto a las condiciones basales; *p>0.05; resultados de tres y cuatro experimentos independientes).

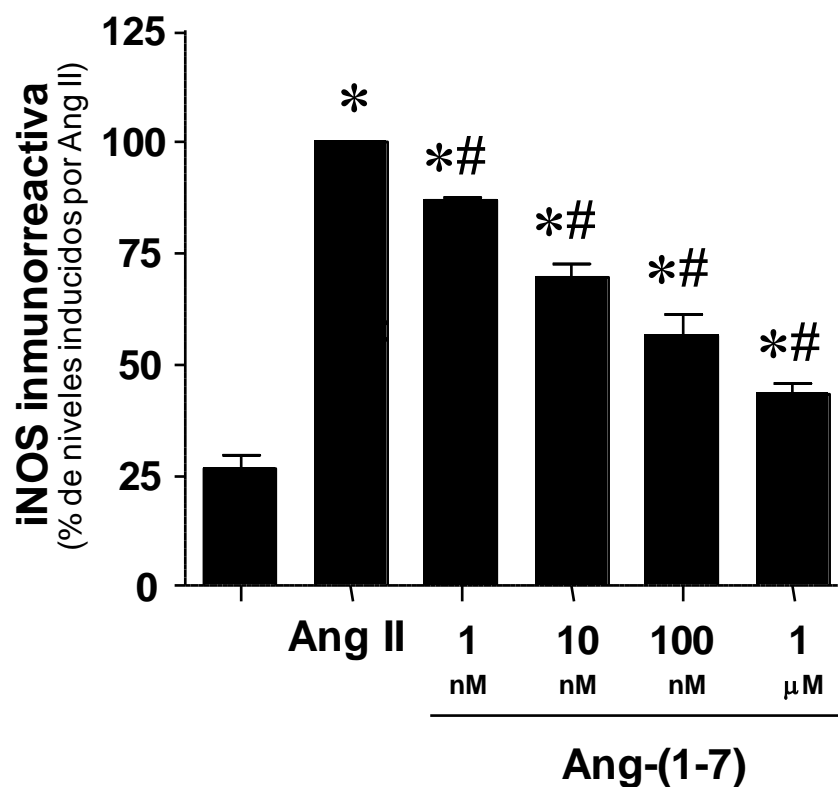
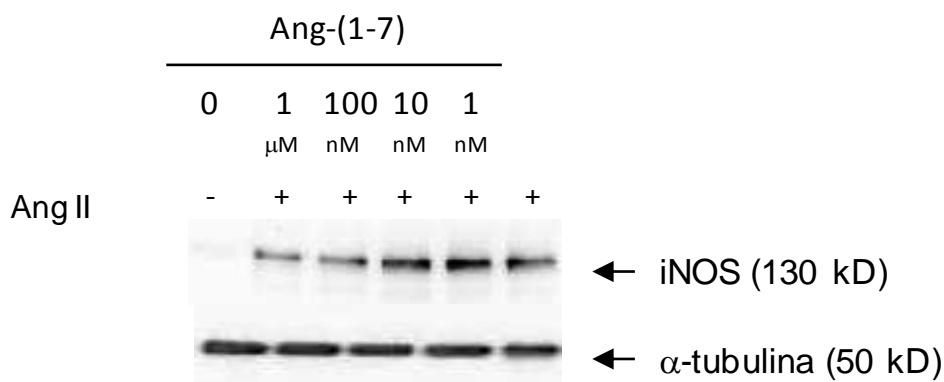
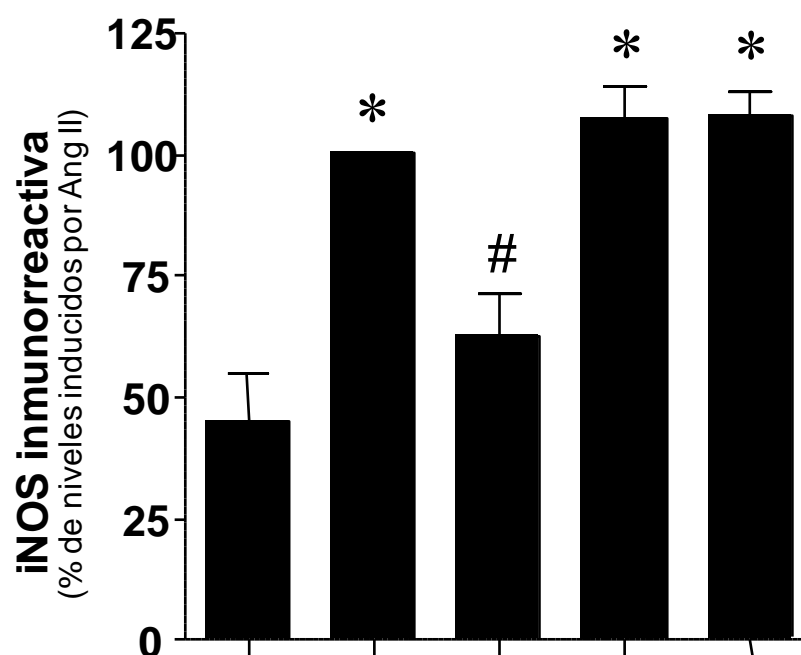
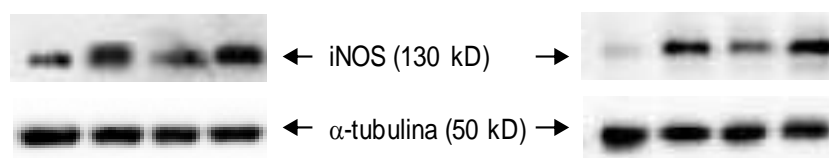


Fig. 20. La Ang-(1-7) previene la inducción de iNOS estimulada por Ang II de una manera dependiente de la concentración. Las CMLAH se expusieron a Ang II (100 nM) en combinación con concentraciones crecientes de Ang-(1-7) (1 nM a 1 μM) durante 18 h y los niveles de iNOS se cuantificaron por Western blot. Se muestra un ejemplo representativo de un gel de Western blot en la parte superior. Los resultados representan la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido por Ang II (# $p < 0.05$ frente a Ang II; * $p < 0.05$ frente a condiciones basales).

Ang II	-	+	+	+	-	+	+	+	Ang II
Ang-(1-7)	-	-	+	+	-	-	+	+	Ang-(1-7)
A779	-	-	-	+	-	-	-	+	D-Pro ⁷ -Ang-(1-7)



Ang II	-	+	+	+	+
Ang-(1-7)	-	-	+	+	+
A779	-	-	-	+	-
D-Pro ⁷ -Ang-(1-7)	-	-	-	-	+

Fig. 21. La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, previene la inducción de iNOS estimulada por Ang II. Las CMLAH se estimularon con Ang II (100 nM) en combinación con Ang-(1-7) (100 nM) durante 18 h y posteriormente se determinaron los niveles de iNOS por Western blot. En algunos casos, las células se preincubaron con los antagonistas del receptor Mas, A779 (1 μ M) o D-Pro⁷-Ang-(1-7) (1 μ M). Se muestra un ejemplo representativo de un gel de Western blot en la parte superior. Los resultados representan la media \pm EEM de nueve experimentos independientes. Los datos se expresan como porcentaje del efecto inducido por Ang II (# p <0.05 frente a Ang II; * p <0.05 frente a condiciones basales).

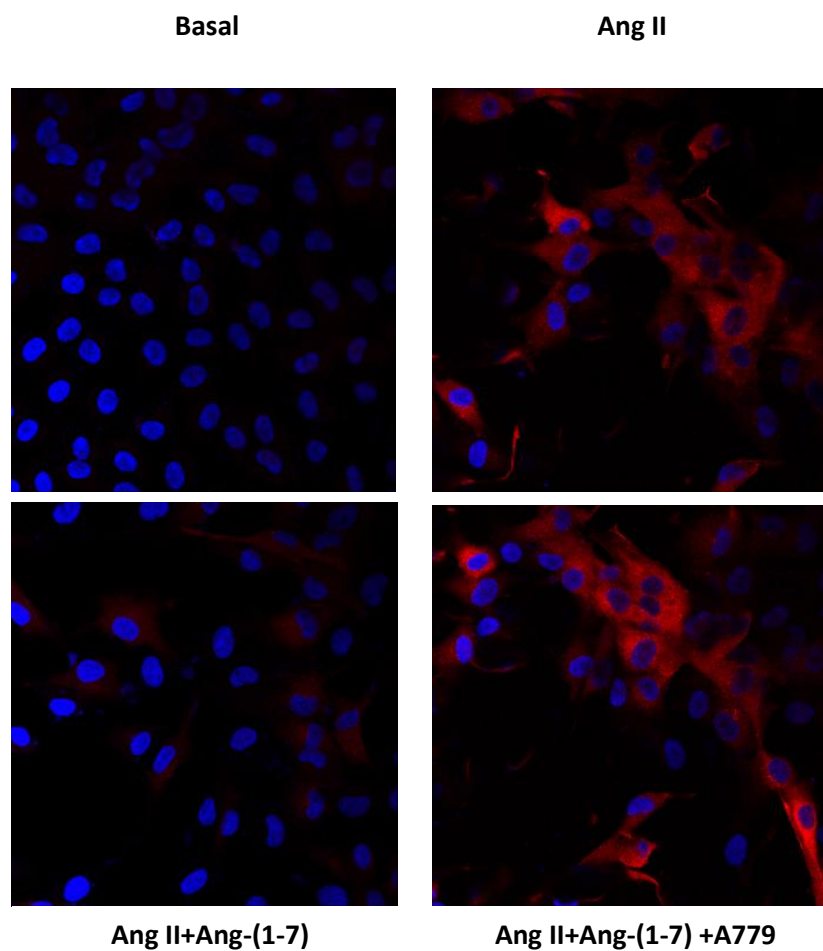


Fig. 22. Inmunolocalización de iNOS mediante inmunofluorescencia indirecta. Las CMLAH se estimularon con Ang II (100 nM) en combinación con Ang-(1-7) (100 nM) durante 18 h. En algunos casos, las células se preincubaron con el antagonista del receptor Mas, A779 (1 μ M). En rojo se identifica la tinción positiva para iNOS (1/250). En azul aparecen los núcleos contrateñidos con DAPI. 400X. El tratamiento con Ang II incrementó la expresión de iNOS que fue reducida significativamente en presencia de la Ang-(1-7) y revertida con el tratamiento con A779.

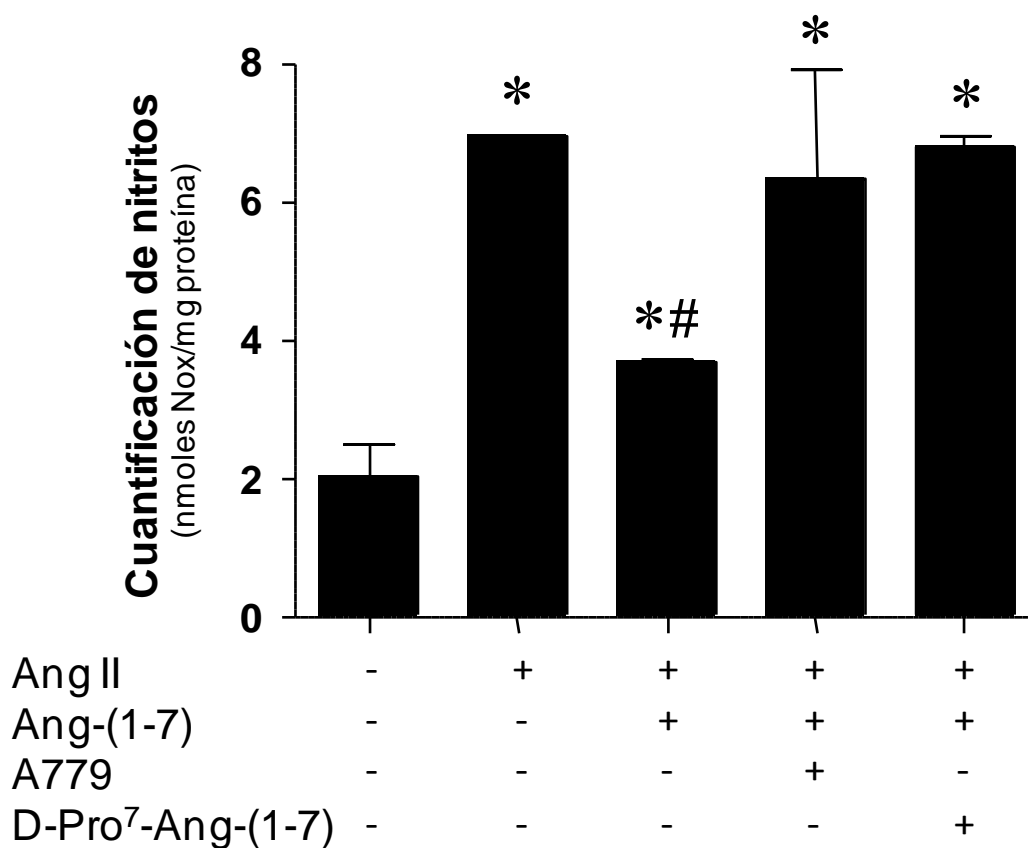


Fig. 23. La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, previene la liberación de nitritos estimulada por Ang II. Las CMLAH se expusieron a Ang II (100 nM) sola o en conjunto con Ang-(1-7) (100 nM). Tras 18 h, se cuantificó la liberación de nitritos en los sobrenadantes celulares mediante el método de Griess. En algunos casos, las células se preincubaron con los antagonistas del receptor Mas, A779 (1 μ M) o D-Pro⁷-Ang-(1-7) (1 μ M). Los resultados representan la media \pm EEM de seis experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido por Ang II (# $p < 0.05$ frente a Ang II; * $p < 0.05$ frente a condiciones basales).

2.4 La Ang-(1-7) previene la inducción de iNOS estimulada por IL-1 β de una manera dependiente de la concentración.

Paralelamente, en otro grupo de experimentos las células se estimularon con la citoquina IL-1 β (2,5 ng/ml) durante 18 h y se expusieron a concentraciones crecientes de Ang-(1-7) (1 nM a 1 μ M). Transcurrido este tiempo, mediante Western blot, se observó un aumento muy marcado en la expresión de iNOS en las células tratadas con IL-1 β . Cuando las CMLAH fueron incubadas con Ang-(1-7), este aumento disminuyó significativamente de una manera dependiente de la concentración, a partir de la concentración de 1 nM (Fig. 24).

2.5 La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, previene la inducción de iNOS estimulada por IL-1 β .

Para determinar la acción de la Ang-(1-7) sobre una molécula inflamatoria independiente al SRA, las CMLAH fueron tratadas durante 18 h con la citoquina IL-1 β a las concentraciones de 2,5 y 10 ng/ml. Además, en algunos casos, los cultivos fueron incubados con Ang-(1-7) (100 nM) y con o sin A779 o D-Pro⁷-Ang-(1-7) (ambos a 1 μ M). En la figura 25 se observa en las CMLAH una inducción alta de la expresión de iNOS causada por IL-1 β a una concentración de 2,5 y 10 ng/ml, respectivamente. En las células incubadas con Ang-(1-7) la inducción de iNOS disminuyó significativamente (Fig. 25). Paralelamente, el efecto de Ang-(1-7) fue revertido totalmente al pretratar las células con A779 y D-Pro⁷-Ang-(1-7), indicando que la acción de la Ang-(1-7) está regulada a través del receptor Mas (Fig. 25).

Mediante inmunofluorescencia indirecta también se confirmó el efecto inhibitorio de la Ang-(1-7) (100 nM) sobre la inducción de iNOS causada por IL-1 β (2,5 ng/ml) y como dicha acción fue revertida cuando las células se preincubaron con A779 (1 μ M) (Fig. 26).

La expresión de los niveles de iNOS y la liberación de nitritos estimulada por IL-1 β (2,5 ng/ml) fue abolida totalmente en presencia de anakinra (1 μ g/ml), lo que confirmó que la acción de la IL-1 β está mediada por el receptor IL-1R (93,31 \pm 4,77% para iNOS y 99,62 \pm 0,11% para nitritos ambos frente a IL-1 β ; †p<0.05; resultados de cuatro y tres experimentos independientes respectivamente).

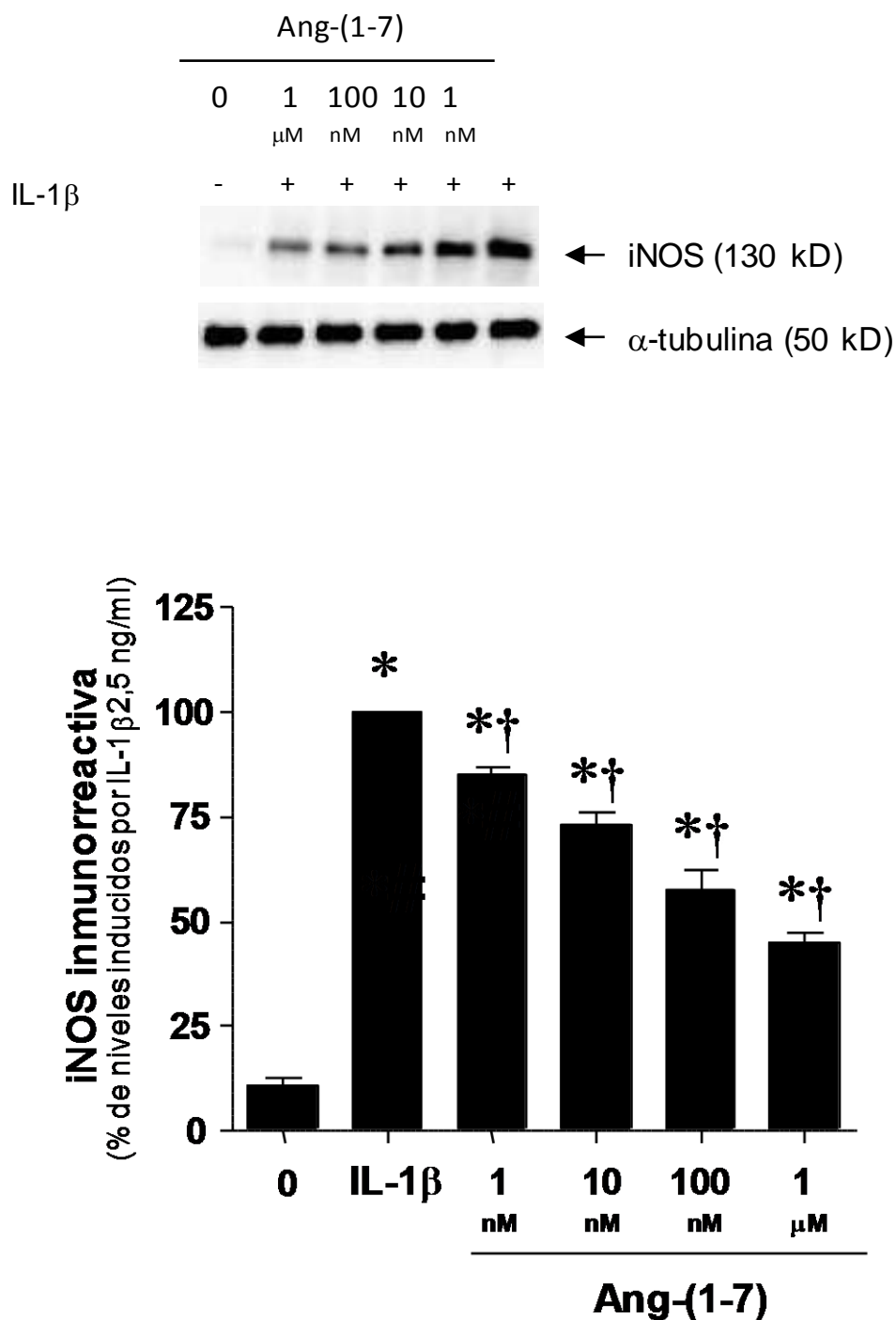


Fig. 24. La Ang-(1-7) previene la inducción de iNOS estimulada por IL-1 β de una manera dependiente de la concentración. Las CMLAH se expusieron a IL-1 β (2,5 ng/ml) en combinación con concentraciones crecientes de Ang-(1-7) (1 nM a 1 μM) durante 18 h y los niveles de iNOS se cuantificaron por Western blot. Se muestra un ejemplo representativo de un gel de Western blot en la parte superior. Los resultados representan la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido por IL-1 β 2,5 ng/ml ($\dagger p < 0.05$ frente a IL-1 β 2,5 ng/ml; * $p < 0.05$ frente a condiciones basales).

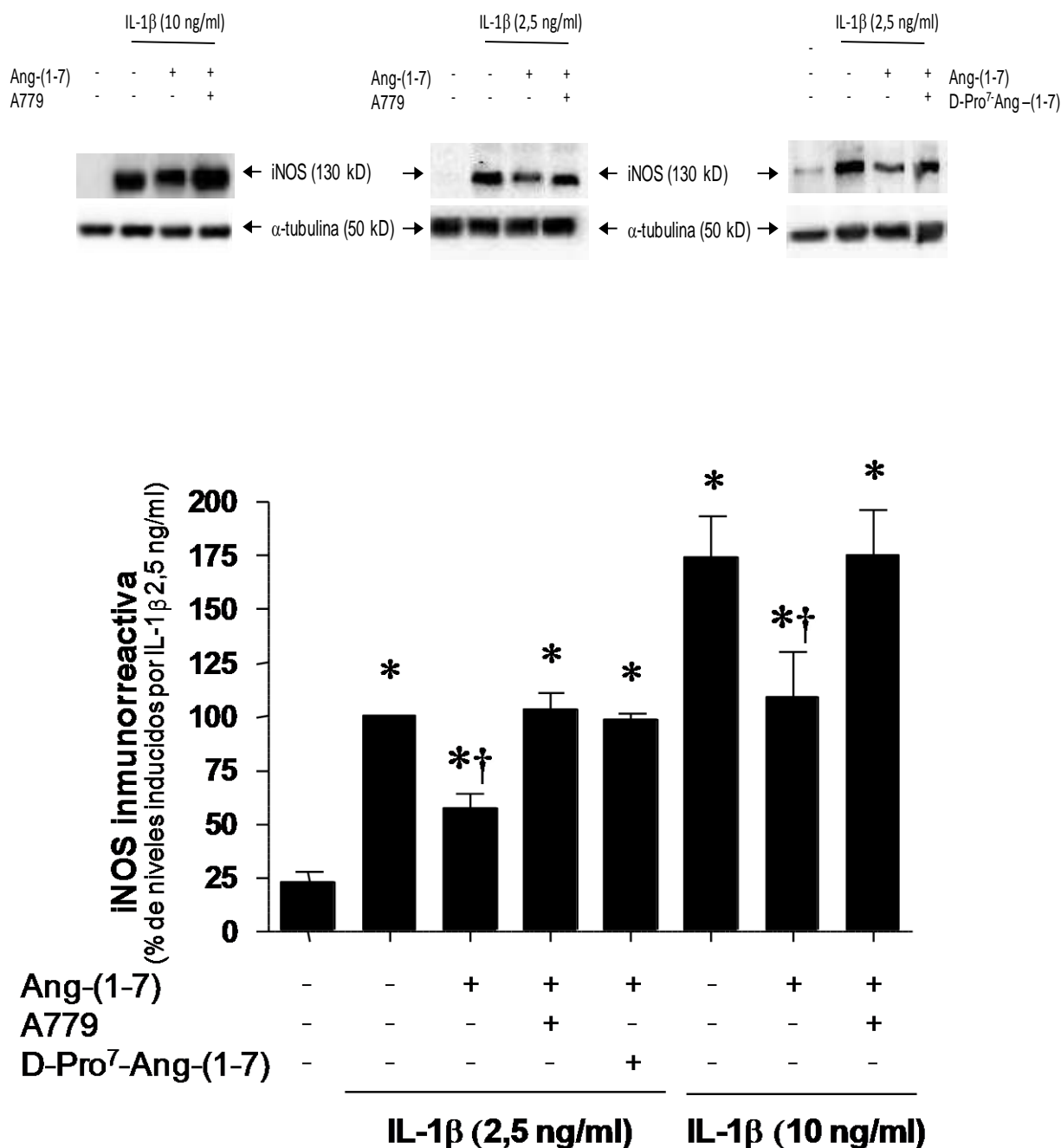


Fig. 25. La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, previene la inducción de iNOS estimulada por IL-1 β . Las CMLAH se estimularon con IL-1 β (2,5 y 10 ng/ml) en combinación con Ang-(1-7) (100 nM) durante 18 h y posteriormente se determinaron los niveles de iNOS por Western blot. En algunos casos, las células se preincubaron con los antagonistas del receptor Mas, A779 (1 μ M) o D-Pro⁷-Ang-(1-7) (1 μ M). Se muestra un ejemplo representativo de un gel de Western blot en la parte superior. Los resultados representan la media \pm EEM de siete experimentos independientes. Los datos se expresan como porcentaje del efecto inducido por IL-1 β 2,5 ng/ml ($\dagger p < 0.05$ frente a IL-1 β 2,5 ng/ml; * $p < 0.05$ frente a condiciones basales).

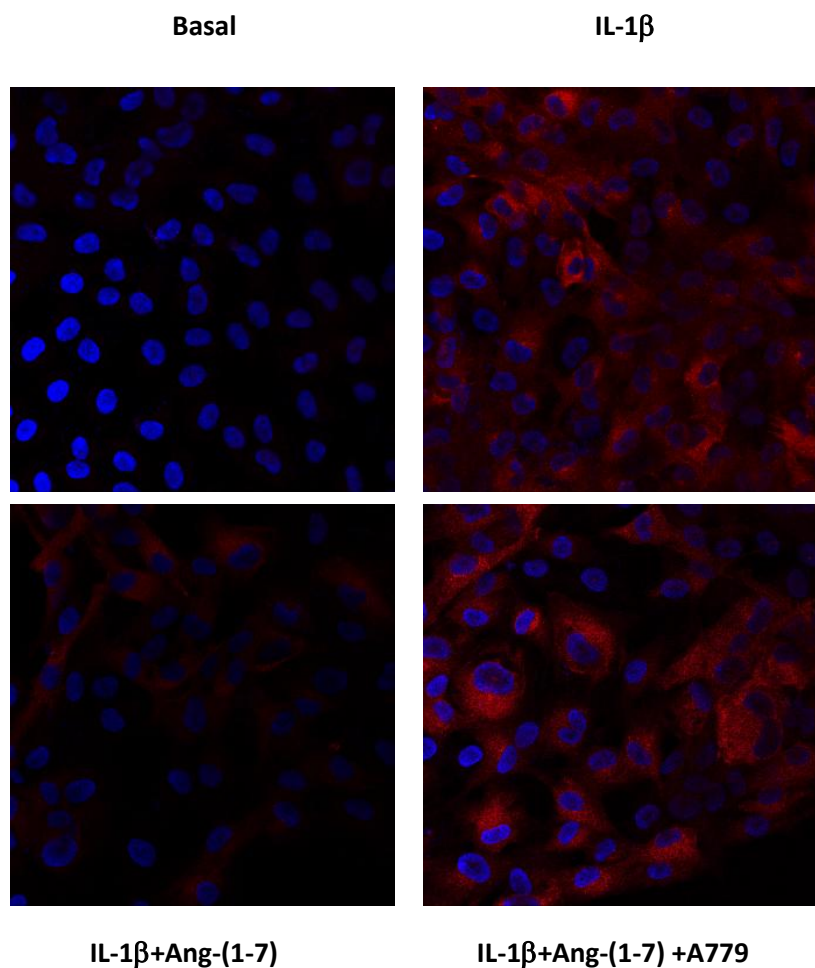


Fig. 26. Inmunolocalización de iNOS mediante inmunofluorescencia indirecta. Las CMLAH se estimularon con IL-1 β (2,5 ng/ml) en combinación con Ang-(1-7) (100 nM) durante 18 h. En algunos casos, las células se preincubaron con el antagonista del receptor Mas, A779 (1 μ M). En rojo se identifica la tinción positiva para iNOS (1/250). En azul aparecen los núcleos contrateñidos con DAPI. 400X. El tratamiento con IL-1 β incrementó la expresión de iNOS que fue reducida significativamente en presencia de la Ang-(1-7) y revertida con el tratamiento con A779.

2.6 La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, previene la liberación de nitritos estimulada por IL-1 β .

Después de comprobar el efecto de la Ang-(1-7) sobre la inducción de iNOS causada por IL-1 β , se determinó su acción sobre la producción de NO cuantificada indirectamente mediante el método de Griess en el sobrenadante celular. Las CMLAH fueron estimuladas con IL-1 β (2,5 y 10 ng/ml) y co-incubadas con Ang-(1-7) (100 nM) durante 18 h. La inducción de la liberación de nitritos aumentó considerablemente en las células tratadas con IL-1 β y de una manera concentración dependiente (Fig 27). Dicha estimulación se redujo significativamente cuando las células fueron tratadas con Ang-(1-7) (Fig. 27). Análogamente cuando las CMLAH fueron pretratadas con A779 o D-Pro⁷-Ang-(1-7) se observó una abolición del efecto de la Ang-(1-7) sobre la liberación de nitritos causada por la IL-1 β (2,5 ng/ml y 10 ng/ml), con lo cual se confirmó la participación del receptor Mas en dicha respuesta (Fig.27).

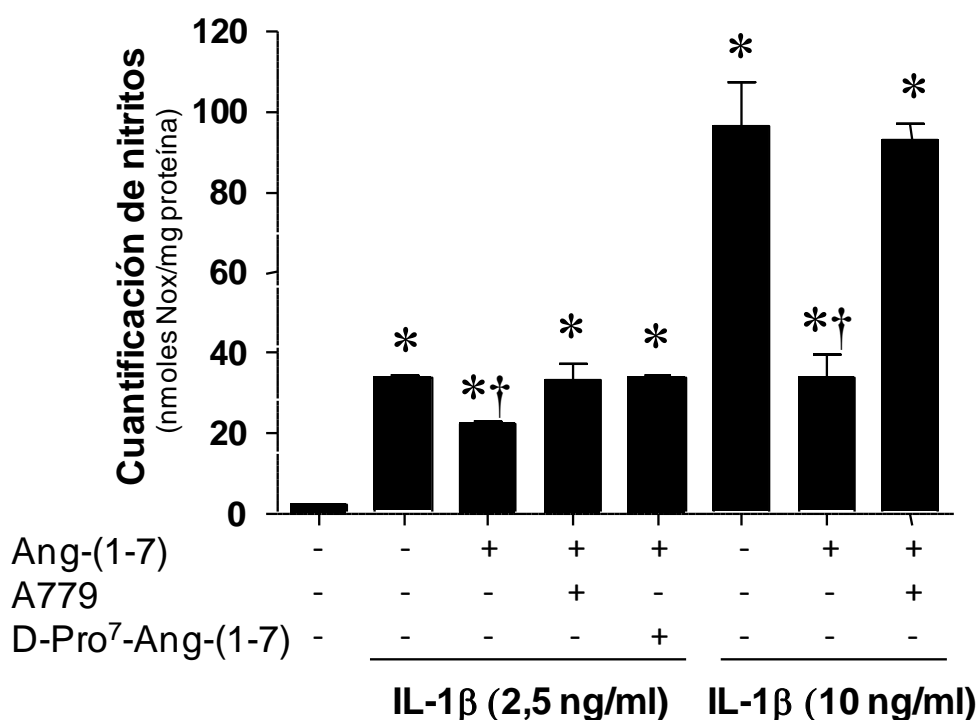


Fig. 27. La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, previene la liberación de nitritos estimulada por IL-1 β . Las CMLAH se incubaron con IL-1 β (2,5 y 10 ng/ml) y Ang-(1-7) (100 nM). En algunos casos, las células se preincubaron con los antagonistas del receptor Mas, A779 (1 μ M) o D-Pro⁷-Ang-(1-7) (1 μ M). Tras 18 h, se cuantificó la liberación de nitritos en los sobrenadantes celulares mediante el método de Griess. Los resultados representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido por IL-1 β ($\dagger p < 0.05$ frente a IL-1 β 2,5 ng/ml ; * $p < 0.05$ frente a condiciones basales).

3. PARTICIPACIÓN DE LA ENZIMA NADPH-OXIDASA EN LA ACCIÓN ANTIINFLAMATORIA DE LA ANG-(1-7) EN LAS CMLAH.

3.1 La enzima NADPH-oxidasa media la inducción de iNOS y la liberación de nitritos estimulada por Ang II e IL-1 β .

Una vez comprobado el efecto antiinflamatorio de la Ang-(1-7) sobre la expresión de iNOS y la liberación de nitritos, inducidos tanto por Ang II como por IL-1 β , se decidió estudiar la implicación de la NADPH oxidasa en este proceso. Para ello, las CMLAH fueron preincubadas 30 min con el inhibidor de la enzima NADPH oxidasa, apocinina (30 μ M), y posteriormente se trataron con Ang II (100 nM) durante 18 h. Mediante la técnica de Western blot, en la figura 28 se observa cómo en presencia de la apocinina, la inducción de iNOS causada por Ang II se abolió por completo siendo similar a las condiciones basales. Esto permitió deducir que la Ang II aumenta la expresión de iNOS, a través de la inducción previa de la actividad NADPH-oxidasa; lo que conlleva a un aumento de la inflamación. El efecto de la apocinina por si misma, no modificó los niveles de iNOS respecto a las condiciones basales (Fig. 28).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se cuantificó la liberación de nitritos en células tratadas con Ang II (100 nM) e incubadas con apocinina (30 μ M) o ambos, durante 18 h. La co-incubación con apocinina disminuyó significativamente la liberación de nitritos inducida por Ang II (Fig. 29). La apocinina por si misma, no modificó de la liberación basal de nitritos (Fig. 29).

Paralelamente, se realizaron experimentos empleando la apocinina para determinar la acción de la enzima NADPH-oxidasa en la inducción de iNOS causada por IL-1 β . Las CMLAH fueron pretratadas con apocinina (30 μ M) y tratadas con IL-1 β (2,5 ng/ml) durante 18 h. La inducción de la expresión de iNOS inducida por IL-1 β fue revertida por completo a los niveles basales en presencia del inhibidor (Fig. 30). Análogamente estos resultados fueron similares a los observados con Ang II previamente descritos, lo cual nos sugirió que la expresión de iNOS inducida por IL-1 β , también requiere de la activación previa de la enzima NADPH-oxidasa.

Posteriormente se cuantificó la liberación de nitritos en CMLAH estimuladas con IL-1 β . Para ello, las CMLAH fueron preincubadas con apocinina (30 μ M) y tratadas con IL-1 β (2,5 ng/ml) durante 18 h. Mediante la técnica de Griess se determinó que la preincubación con apocinina disminuyó significativamente la liberación de nitritos

inducida por la IL-1 β prácticamente en niveles similares a los observados en condiciones basales (Fig. 31).

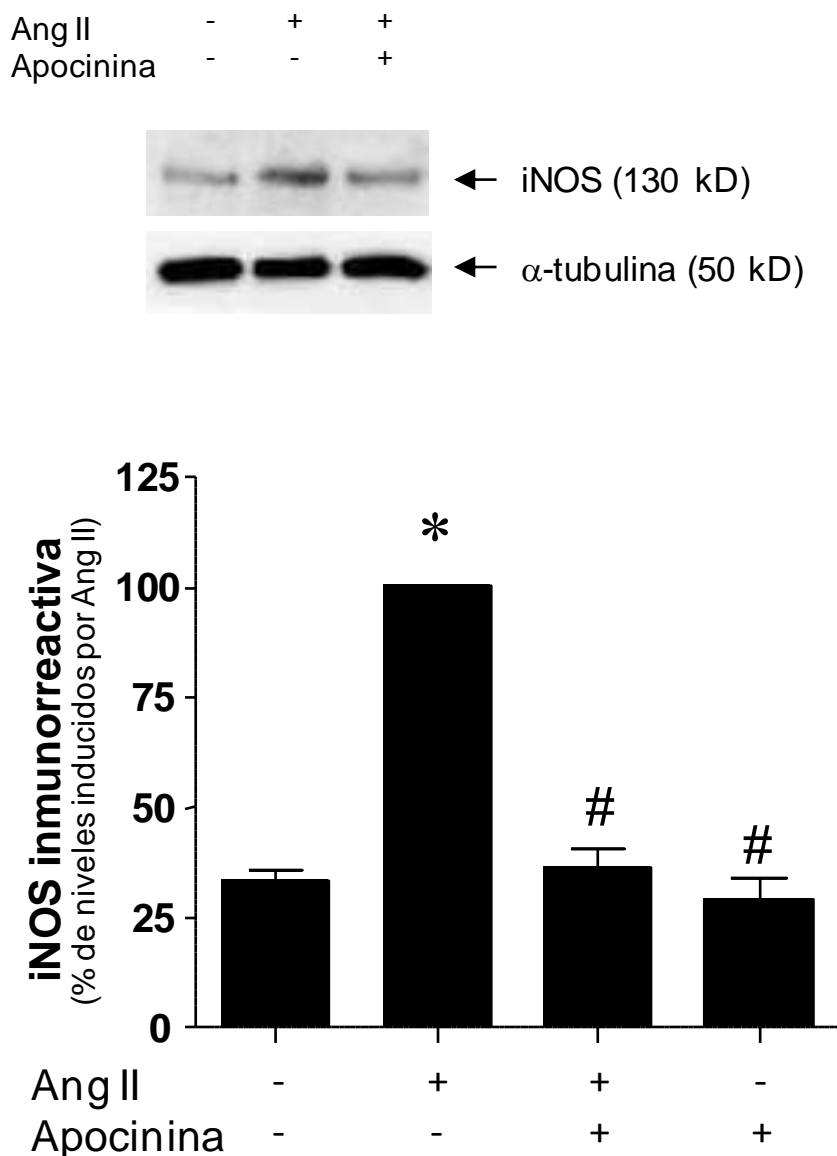


Fig. 28. La enzima NADPH-oxidasa media la inducción de iNOS estimulada por Ang II. Los cultivos de CMLAH fueron pretratados con apocinina (30 μ M) y estimulados con Ang II (100 nM) durante 18 h. Posteriormente fueron determinados los niveles de expresión de iNOS por la técnica de Western blot. Se muestra un ejemplo representativo de un gel de Western blot en la parte superior. Los resultados representan la media \pm EEM de siete experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido por Ang II (# p <0.05 frente a Ang II; * p <0.05 frente a condiciones basales).

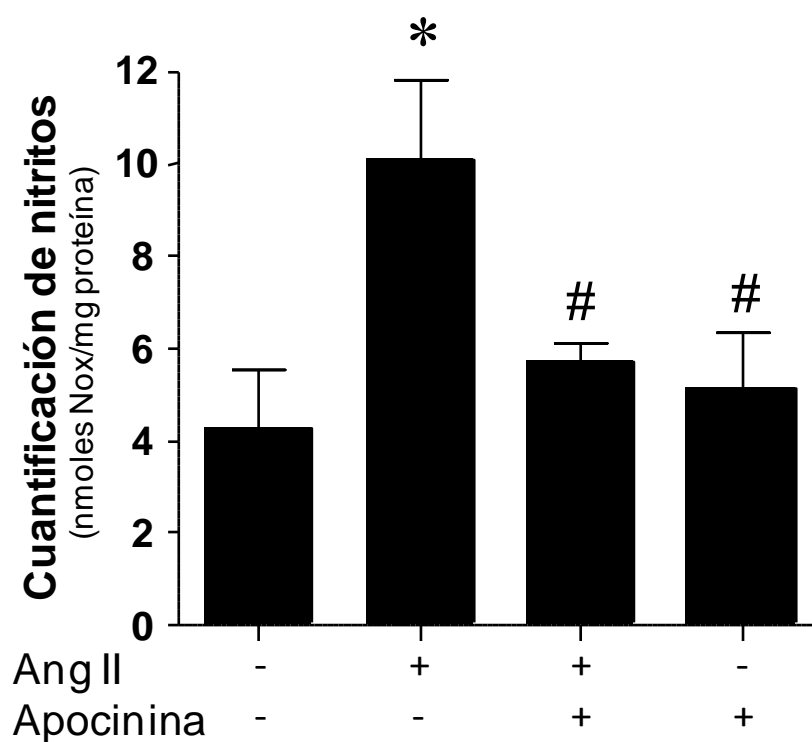


Fig. 29. La enzima NADPH-oxidasa media la liberación de nitritos estimulada por **Ang II**. Las CMLAH se pretrataron con apocinina (30 μ M) durante 30 min y se estimularon con a Ang II (100 nM). Tras 18 h se cuantificó la liberación de nitritos en los sobrenadantes celulares mediante el método de Griess. Los resultados representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido por Ang II (# p <0.05 frente a Ang II; * p <0.05 frente a condiciones basales).

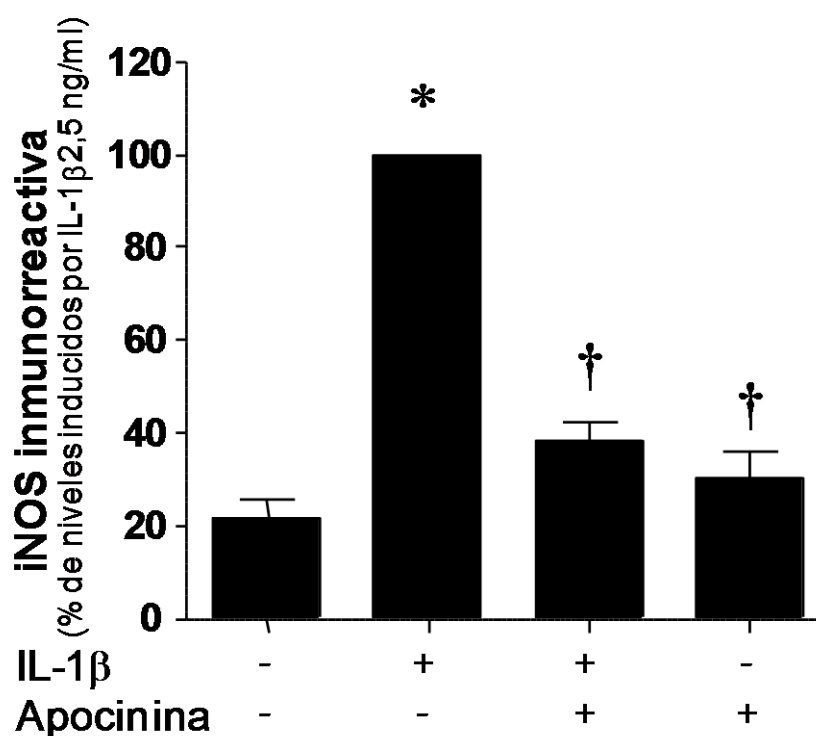
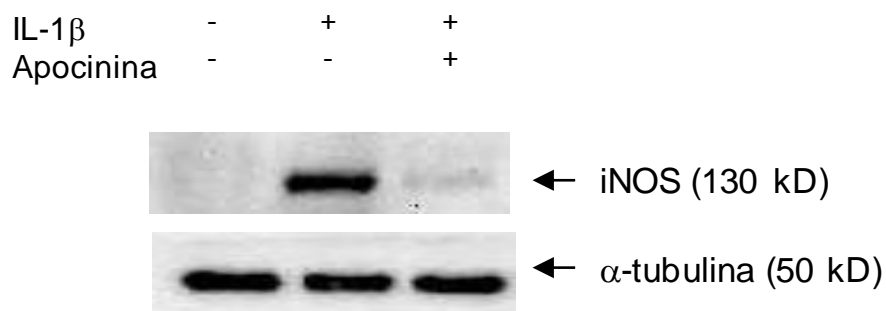


Fig. 30. La enzima NADPH-oxidasa media la inducción de iNOS estimulada por IL-1 β . Los cultivos de CMLAH fueron pretratados con apocinina (30 μ M) y estimulados con IL-1 β (2,5 ng/ml) durante 18 h. Posteriormente fueron determinados los niveles de expresión de iNOS por la técnica de Western blot. Se muestra un ejemplo representativo de un gel de Western blot en la parte superior. Los resultados representan la media \pm EEM de cinco experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido por IL-1 β 2,5 ng/ml ($\dagger p < 0.05$ frente a IL-1 β 2,5 ng/ml; * $p < 0.05$ frente a condiciones basales).

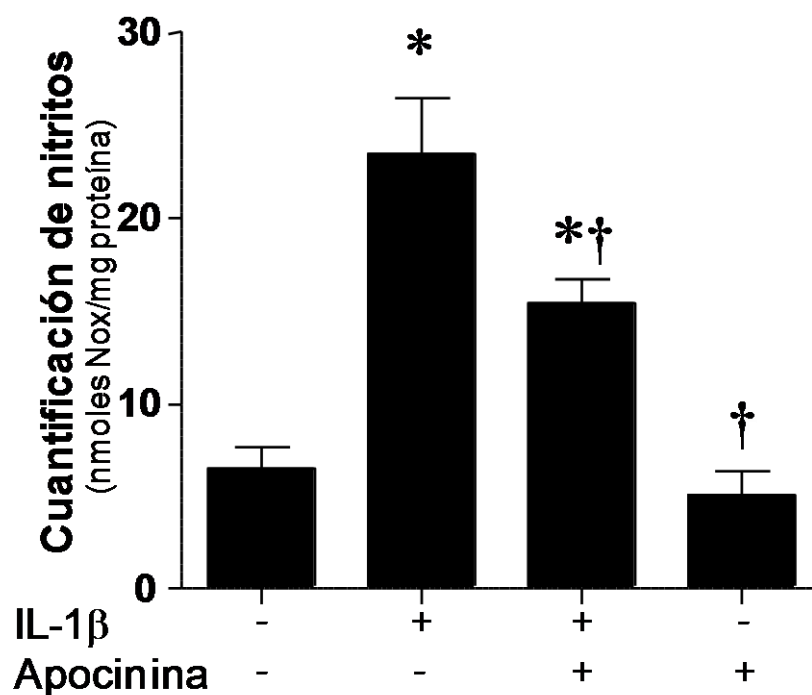


Fig. 31. La enzima NADPH-oxidasa media la liberación de nitritos estimulada por IL-1 β . Las CMLAH se pretrataron con apocinina (30 μ M) durante 30 min y se estimularon con a IL-1 β (2,5 ng/ml). Tras 18 h se cuantificó la liberación de nitritos en los sobrenadantes celulares mediante el método de Griess. Los resultados representan la media \pm EEM de cinco experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido por IL-1 β 2,5 ng/ml (\dagger p<0.05 frente a IL-1 β 2,5 ng/ml; *p<0.05 frente a condiciones basales).

3.2 La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, previene la inducción de la NADPH oxidasa estimulada por Ang II e IL-1 β .

Es conocido que la enzima NADPH oxidasa es una fuente importante de generación de O₂⁻. Además se ha descrito, que la Ang II induce considerablemente la actividad de esta enzima en las células musculares lisas, aumentando la formación del anión O₂⁻ y provocando la inactivación del óxido nítrico; lo cual está asociado con la patogénesis de la hipertensión (Rajogopalan et al., 1996). Los resultados anteriores sugirieron que la inducción de iNOS por Ang II e IL-1 β podría estar mediada por la actividad de la enzima NADPH oxidasa. En consecuencia, se decidió averiguar si el efecto antiinflamatorio de la Ang-(1-7) podría estar relacionado con la atenuación de la actividad de la enzima NADPH oxidasa. Para ello las CMLAH fueron estimuladas con Ang II (100 nM) sola o con Ang-(1-7) (100 nM) durante 18 h. En algunos experimentos se emplearon los inhibidores del receptor Mas, A779 o D-Pro⁷-Ang-(1-7) (ambos a 1 μ M).

Posteriormente, la producción de O₂⁻ fue determinada mediante la técnica de quimioluminiscencia con lucigenina previamente descrita. En la figura 32 se puede observar como la Ang II provocó un aumento notable de la actividad de la enzima, evidenciada por una alta producción de O₂⁻. Este aumento se vio reducido significativamente cuando las células se trataron con Ang-(1-7) (Fig. 32). La acción inhibitoria de la Ang-(1-7) fue abolida en presencia del A779 y el D-Pro⁷-Ang-(1-7), lo cual confirmó que la inhibición de la actividad de la enzima está mediada por el receptor Mas (Fig. 32). La Ang-(1-7), el A779 y el D-Pro⁷-Ang-(1-7) por si mismos, no incrementaron la actividad de la NADPH oxidasa respecto a las condiciones basales (138,6 \pm 26,90 para Ang-(1-7), 127,34 \pm 30,16 para A779 y 114,43 \pm 3,28 para D-Pro⁷-Ang-(1-7); *p>0.05; resultados de siete experimentos independientes).

Por otra parte, las CMLAH se preincubaron con el inhibidor de la enzima NADPH oxidasa, apocinina (1 μ M) y después se estimularon con Ang II (100 nM) para corroborar la acción de este inhibidor sobre la activación de la enzima. Se observó que el tratamiento con apocinina abolió por completo la activación de la enzima, lo cual también nos permitió conocer que la técnica era eficiente para determinar la expresión de la enzima NADPH oxidasa (Fig. 32).

En el músculo liso, citoquinas inflamatorias como la IL-1 β inducen la activación de la NADPH oxidasa (Miller et al., 2007). Teniendo estos antecedentes y después de obtener los datos anteriores, se procedió a determinar si el efecto antiinflamatorio de la Ang-(1-7) sobre la IL-1 β también estaba mediado por la inhibición

parcial de la actividad NADPH oxidasa. Las células fueron preincubadas con A779 (1 μ M) o D-Pro⁷-Ang-(1-7) (1 μ M) y tratadas con IL-1 β (2,5 ng/ml), (Ang-(1-7) (100 nM) o en combinación durante 18 h. En la figura 33 se puede observar como la IL-1 β ocasionó un incremento marcado de la actividad de la enzima respecto a las condiciones basales, mientras que en las células tratadas con Ang-(1-7) esta actividad disminuyó de manera significativa (Fig. 33), produciéndose una menor cantidad de O₂. La acción de la Ang-(1-7) sobre la actividad de la NADPH oxidasa se revirtió en presencia del A779 y D-Pro⁷-Ang-(1-7), lo que permitió determinar que la Ang-(1-7) a través del receptor Mas atenúa la actividad de la enzima cuando es estimulada por la IL-1 β (Fig. 33).

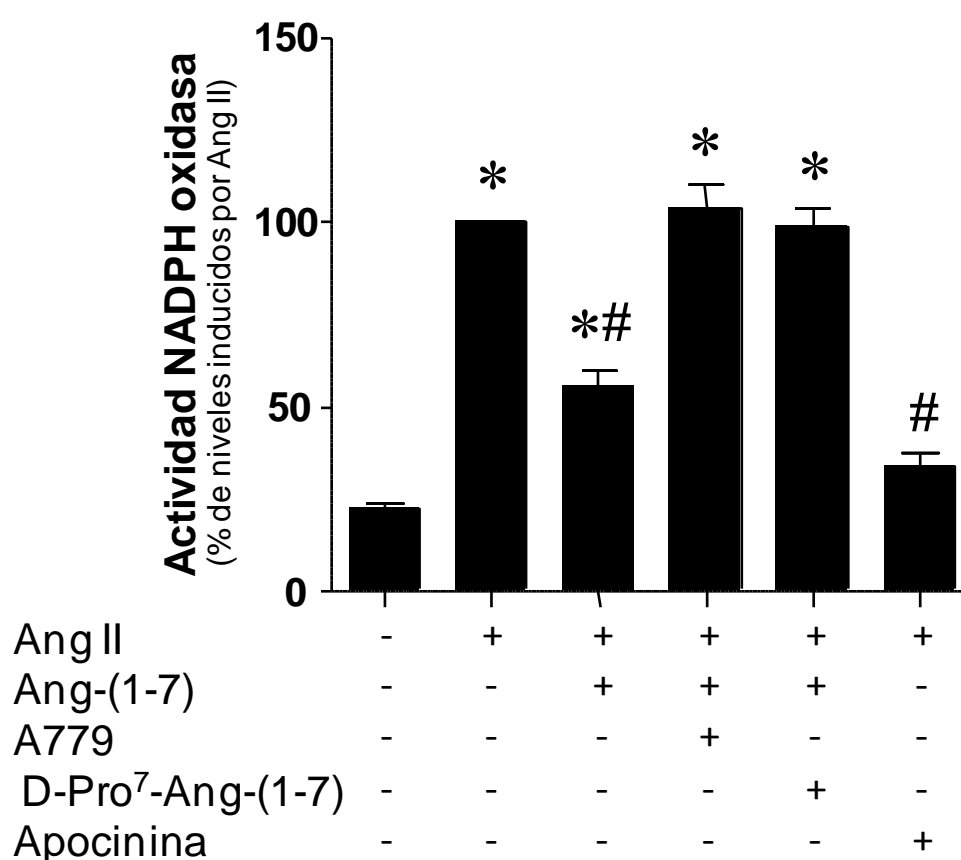


Fig. 32. La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, previene la inducción de la NADPH oxidasa estimulada por Ang II. Las células fueron estimuladas con Ang II (100 nM) y Ang-(1-7) (100 nM) durante 18 h y preincubadas con apocinina (30 μ M) y los inhibidores del receptor Mas A779 (1 μ M) o D-Pro⁷-Ang-(1-7) (1 μ M). Transcurrido este tiempo, se determinó la actividad de la enzima NADPH oxidasa mediante la técnica de quimioluminiscencia por lucigenina. Los resultados representan la media \pm EEM de siete experimentos independientes. Los datos se expresan como porcentaje del efecto inducido por Ang II (# p <0.05 frente a Ang II; * p <0.05 frente a condiciones basales).

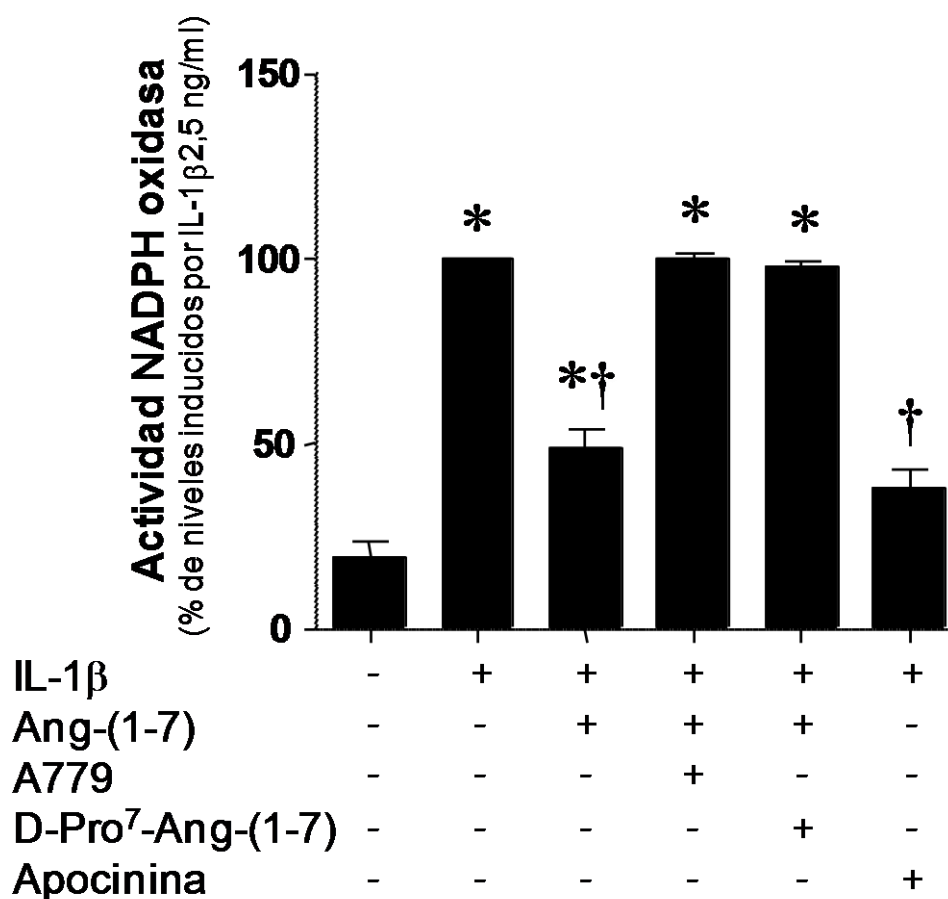


Fig. 33. La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, previene la inducción de la NADPH oxidasa estimulada por IL-1β. Las células fueron estimuladas con IL-1β (2,5 ng/ml) y Ang-(1-7) (100 nM) durante 18 h y preincubadas con apocinina (30 μM) y los inhibidores del receptor Mas A779 (1 μM) o D-Pro⁷-Ang-(1-7) (1 μM). Transcurrido este tiempo se determinó la actividad de la enzima NADPH oxidasa mediante la técnica de quimioluminiscencia por lucigenina. Los resultados representan la media ± EEM de seis experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido por IL-1β 2,5 ng/ml (†p<0.05 frente a IL-1β 2,5 ng/ml; *p<0.05 frente a condiciones basales).

4. LA ANG-(1-7) DISMINUYE LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B EN LAS CMLAH.

4.1 La Ang II y la IL-1 β inducen la expresión de iNOS a través de NF- κ B.

Una vez demostrada la capacidad de la Ang-(1-7) para atenuar la inducción de la enzima NADPH-oxidasa y por ende la expresión de iNOS a través del receptor Mas, se procedió a explorar el papel del NF- κ B en esta ruta de señalización. Con el fin de determinar si la inducción de iNOS también requería la activación previa de NF- κ B, se estudió el efecto del inhibidor de dicho factor, el agente antioxidante ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC), sobre la acción causada por la Ang II. Las células fueron preincubadas con PDTC (100 μ M) 20 min antes de la estimulación con Ang II durante 18 h, para comprobar la acción inhibitoria de dicho compuesto. Mediante la realización de la técnica de Western blot se observó que la expresión de iNOS causada por Ang II fue significativamente menor en las células tratadas con PDTC (Fig. 34).

En otro grupo de experimentos, las CMLAH se preincubaron 20 min con el PDTC (100 μ M) y se estimularon con IL-1 β (2,5 ng/ml) durante 18 h. Se observó que el tratamiento con PDTC inhibió significativamente la expresión de iNOS inducida por IL-1 β en el tiempo estudiado (Fig. 35). El tratamiento con PDTC por si mismo, no alteró los niveles de expresión basal de iNOS tanto en los experimentos de células tratadas con Ang II e IL-1 β (Fig. 34 y 35).

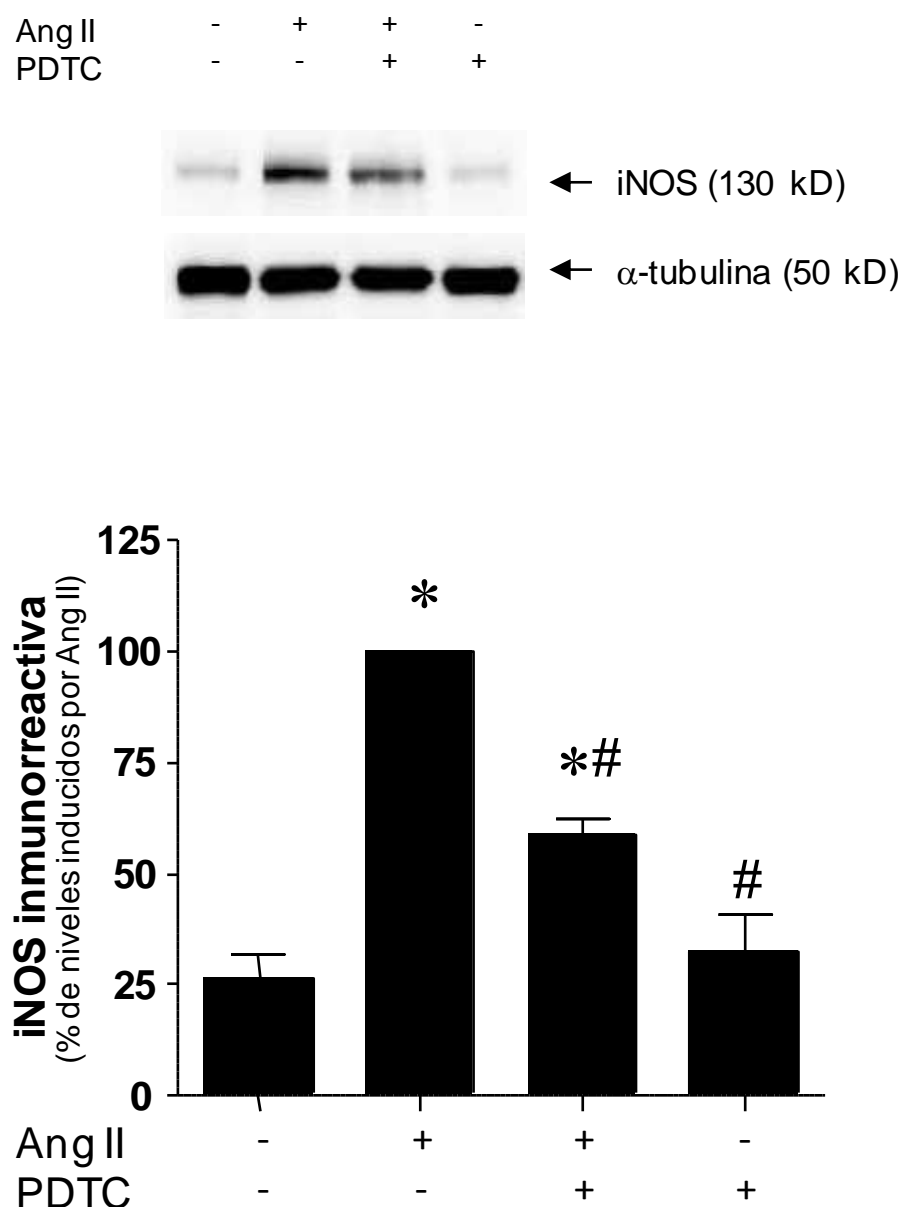


Fig. 34. La Ang II induce la expresión de iNOS a través de NF- κ B. Las CMLAH se preincubaron durante 20 min con el inhibidor del factor de transcripción NF- κ B, PDTC (100 μ M) y se expusieron a Ang II (100 nM). Tras 18 h se cuantificaron los niveles de expresión de iNOS mediante el método de Western blot. Se muestra un ejemplo representativo de un gel de Western blot en la parte superior. Los resultados representan la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido por Ang II (# p <0.05 frente a Ang II; * p <0.05 frente a condiciones basales).

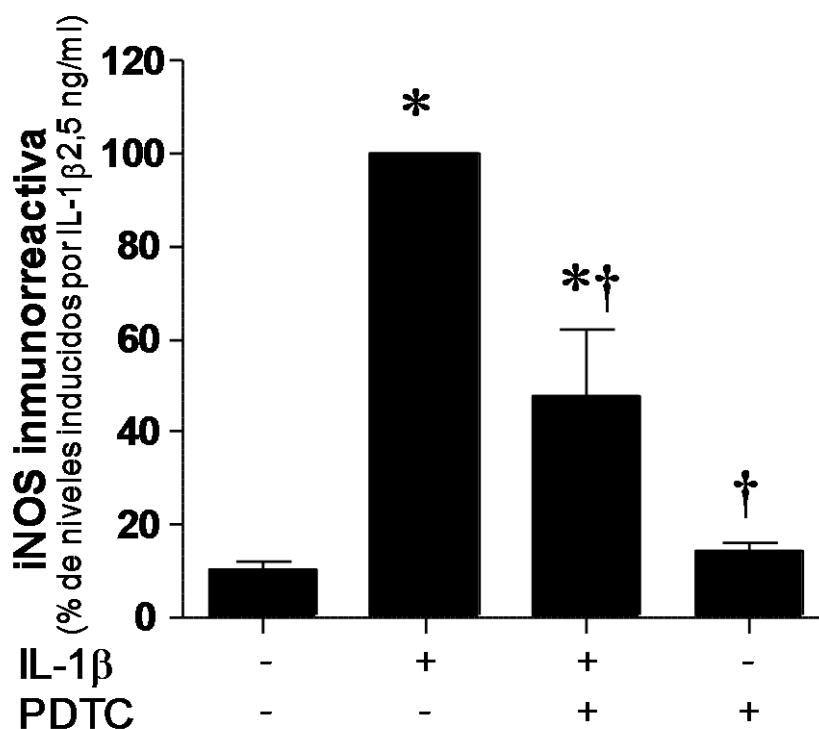
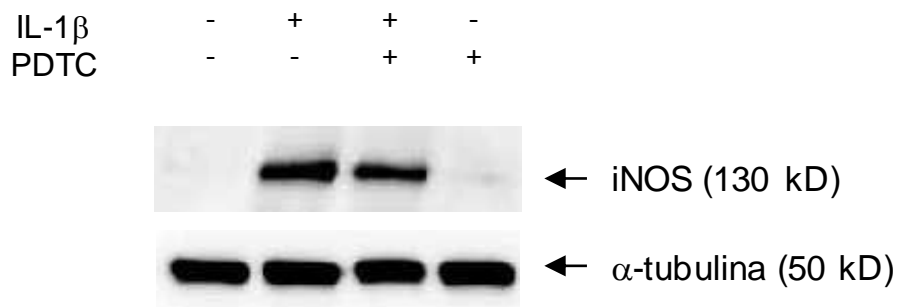


Fig. 35. La IL-1 β induce la expresión de iNOS a través de NF- κ B. Las CMLAH se preincubaron durante 20 min con el inhibidor del factor de transcripción NF- κ B, PDTC (100 μ M) y se estimularon con IL-1 β (2,5 ng/ml). Tras 18 h se determinaron los niveles de expresión de iNOS mediante el método de Western blot. Se muestra un ejemplo representativo de un gel de Western blot en la parte superior. Los resultados representan la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido por IL-1 β 2,5 ng/ml ($\dagger p < 0.05$ frente a IL-1 β 2,5 ng/ml; * $p < 0.05$ frente a condiciones basales).

4.2 La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, disminuye la activación de NF- κ B inducida por Ang II e IL-1 β .

Es conocido que el péptido vasoactivo, Ang II, puede activar el factor de transcripción NF- κ B, el cual puede actuar como un indicador intracelular para los efectos inducidos por Ang II (Kranzhofer et al., 1999; Muller et al., 2000).

Una vez determinado que la activación de iNOS causada tanto por Ang II como por IL-1 β , requiere de la activación previa de NF- κ B, se procedió a analizar el papel de la Ang-(1-7) sobre la activación de este factor de transcripción. Las células se preincubaron con A779 (1 μ M) durante 20 min y posteriormente se estimularon con Ang II (100 nM) y Ang-(1-7) (100 nM), solos o en combinación durante 18 h. Mediante ensayos de retardo en gel se observó que la Ang II aumentó de manera muy marcada la activación de NF- κ B (Fig 36). Esta activación disminuyó significativamente al co-incubar la Ang II con Ang-(1-7) (Fig. 36). Cuando los cultivos fueron preincubados con A779, la disminución provocada por la Ang-(1-7) fue abolida, lo cual confirma que la acción de la Ang-(1-7) está mediada por el receptor Mas (Fig. 36).

En otro grupo de experimentos, las CMLAH se incubaron con el inhibidor del NF- κ B, PDTC (100 μ M), previamente al estímulo con Ang II (100 nM), para comprobar la acción inhibitoria de dicho compuesto. Se observó que el tratamiento con PDTC abolió por completo la activación de NF- κ B inducida por Ang II, tal y como era de esperar (Fig. 36). Además, las CMLAH también se incubaron con el inhibidor de la enzima NADPH oxidasa, apocinina (30 μ M). Dicho tratamiento abolió la activación del factor de transcripción NF- κ B inducida por Ang II. Este resultado corroboró que la enzima NADPH oxidasa está implicada en la activación de este factor de transcripción (Fig. 36). Cabe mencionar que el PDTC y la apocinina por si solos no modificaron la expresión basal de NF- κ B (120,633 \pm 12,279 para PDTC y 106 \pm 9,657 para apocinina respecto a las condiciones basales; * p >0.05; resultados de cinco experimentos independientes).

Con el fin de determinar si la Ang-(1-7) también era capaz de atenuar la activación de NF- κ B estimulada por IL-1 β (2,5 ng/ml), las CMLAH fueron tratadas con esta citoquina inflamatoria e incubadas con la Ang-(1-7) (100 nM) durante 18 h. Mediante EMSA, fue posible observar que la activación del NF- κ B derivada del tratamiento con IL-1 β , disminuyó significativamente en presencia de la Ang-(1-7) (Fig. 37). Cuando las CMLAH fueron pretratadas con A779 (1 μ M) en presencia de IL-1 β y Ang-(1-7), la activación de NF- κ B fue similar a la causada por la IL-1 β por si misma.

Es decir, el efecto de la Ang-(1-7) fue abolido por el A779, lo que indica que su acción está mediada a través de su unión al receptor Mas (Fig. 37).

En otro grupo de experimentos, las CMLAH se preincubaron con PDTC (100 μ M), previamente al estímulo con IL-1 β (2,5 ng/ml), para comprobar la acción inhibitoria de dicho compuesto. Se determinó que el tratamiento con PDTC abolió por completo la expresión de NF- κ B inducida por IL-1 β , tal y como era de esperar (Fig. 37). Además, las CMLAH también se incubaron con el inhibidor de la enzima NADPH oxidasa, apocinina (30 μ M). Dicho tratamiento abolió la activación del factor de transcripción NF- κ B inducida por Ang II. Este resultado corroboró que la enzima NADPH oxidasa está implicada en la activación de este factor de transcripción (Fig. 37). Cabe mencionar que el PDTC y la apocinina por si solos no modificaron la expresión basal de NF- κ B (137,407 \pm 10,52 para PDTC y 111,57 \pm 14,65 para apocinina respecto a las condiciones basales; $p > 0.05$; resultados de tres experimentos independientes).

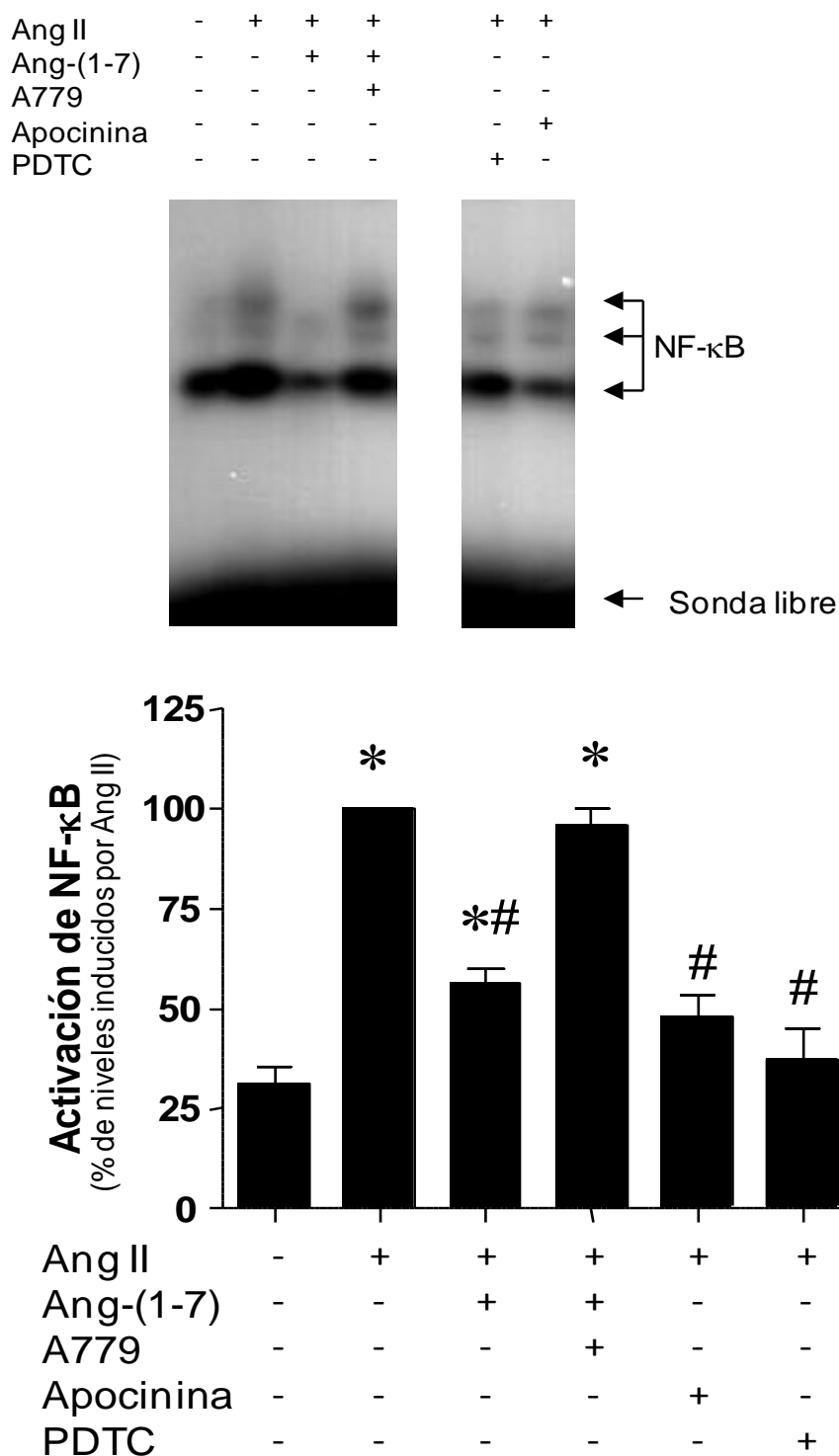


Fig. 36. La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, disminuye la activación de NF-κB inducida por Ang II. Las CMLAH se trataron con Ang II (100 nM) y Ang-(1-7) (100 nM) durante los tiempos indicados. En algunos casos, los cultivos se preincubaron con el antagonista del receptor Mas, A779 (1 μM), y los inhibidores apocinina (30 μM) y PDTC (100 μM). Se muestra un EMSA representativo de las CMLAH sometidas a los diferentes tratamientos. Los resultados representan la media ± EEM de cinco experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido por Ang II (#p<0.05 frente a Ang II; *p<0.05 frente a condiciones basales).

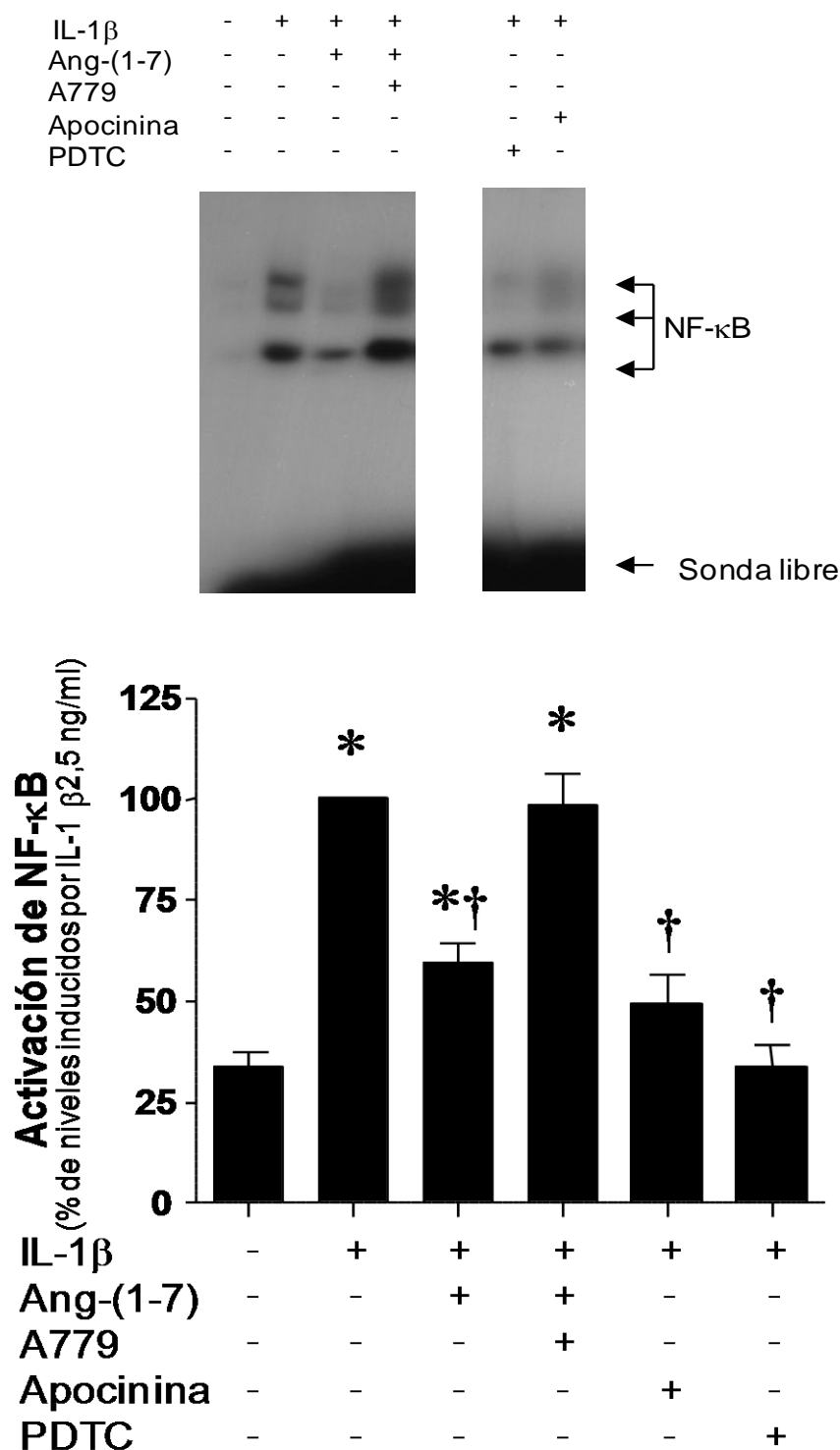


Fig. 37. La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, disminuye la activación de NF- κ B inducida por IL-1 β . Las CMLAH se trataron con IL-1 β (2,5 ng/ml) y Ang-(1-7) (100 nM) durante los tiempos indicados. En algunos casos, los cultivos se preincubaron con el antagonista de Mas, A779 (1 μ M), y los inhibidores apocinina (30 μ M) y PDTC (100 μ M). Se muestra un gel representativo de las CMLAH sometidas a los diferentes tratamientos. Los resultados representan la media \pm EEM de tres experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido por IL-1 β 2,5 ng/ml (\dagger p<0.05 frente a IL-1 β 2,5 ng/ml; *p<0.05 frente a condiciones basales).

II. RESULTADOS EN HUVEC

1. CARACTERIZACIÓN DE LAS HUVEC.

Análogamente a las CMLAH, las HUVEC fueron caracterizadas por su aspecto morfológico y por la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Las células endoteliales presentaron la morfología poligonal y la disposición en monocapa que se produce por la inhibición por densidad, las cuales son características propias de este tipo celular. Así mismo, se obtuvo una tinción positiva para el factor VIII o el factor de Von Willebrand por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Fig. 38).

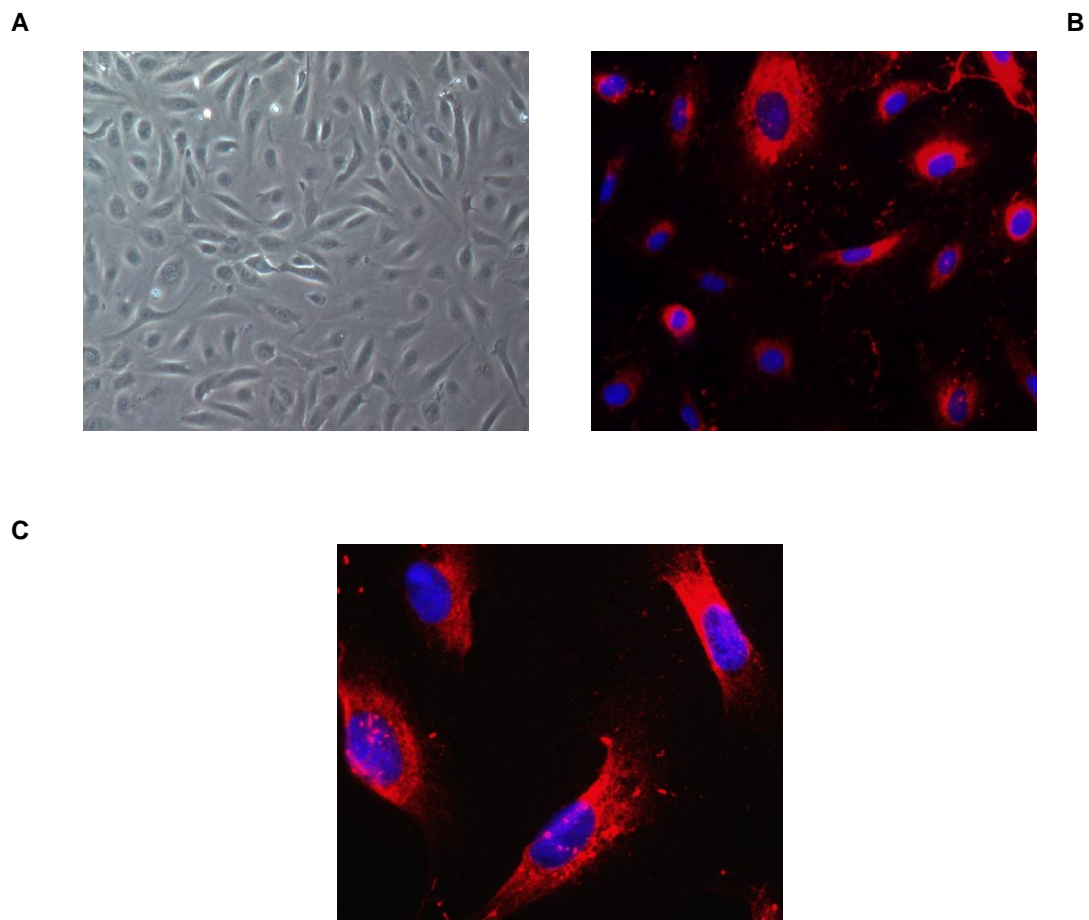


Fig. 38. Células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC). (A) Microfotografía en contraste de fase de un cultivo de HUVEC semiconfluyente y en monocapa. 200X (B) Caracterización de las HUVEC mediante la tinción por inmunofluorescencia indirecta de los gránulos del Factor VIII (1/100). 400X. (C) Detalle del patrón de expresión granular del Factor VIII. 1000X.

2. LA ANG-(1-7), A TRAVÉS DEL RECEPTOR Mas, ATENÚA LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN ICAM-1 Y VCAM-1 INDUCIDAS POR ANGIOTENSINA II E IL-1 β EN HUVEC.

Al término de los experimentos realizados en CMLAH, se decidió explorar la si la Ang-(1-7) presentaba también acción antiinflamatoria en las HUVEC y concretamente sobre la expresión de ICAM-1 y VCAM-1. La importancia de este estudio se debió a que estas moléculas expresadas en las células endoteliales tienen un papel principal en la migración y adhesión leucocitaria, considerado un evento temprano en la formación de la placa aterosclerótica.

Para llevar a cabo la determinación de las moléculas de adhesión sobre la superficie celular se empleó la citometría de flujo. La Ang II (100 nM) aumentó la expresión tanto de ICAM-1 como de VCAM-1, mientras que la co-incubación con Ang-(1-7) (100 nM) disminuyó notablemente la expresión de ambas moléculas (Fig. 39B y 40B). Además, se observó en las células pretratadas con A779 e incubadas con Ang II y Ang-(1-7), se presentó una abolición significativa del efecto de la Ang-(1-7) sobre la expresión de CAMs en las HUVEC (Fig. 39B y 40B). Esto permitió definir que el receptor Mas estaba implicado directamente en el efecto de la Ang-(1-7), tal y como se había observado en los ensayos en CMLAH. Los niveles basales de expresión de CAMs no se modificaron por Ang-(1-7) o A779 por si solos, tanto en los experimentos con Ang II como IL-1 β (108,205 \pm 7,41% y 116,78 \pm 12,61% de ICAM-1 y VCAM-1 respectivamente para Ang-(1-7) y 109,620 \pm 10,049% y 123,63 \pm 7,25% de ICAM-1 y VCAM-1 respectivamente para A779; * p >0.05; resultados de siete y cinco experimentos independientes).

La expresión de ICAM-1 y VCAM-1 también se visualizó mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta, de tal forma que se confirmaron los resultados obtenidos anteriormente por citometría de flujo. La Ang II aumentó la expresión de ambas moléculas de adhesión, mientras que la Ang-(1-7) disminuyó este incremento; lo cual fue revertido totalmente en presencia del A779 (Fig. 39A y 40A).

Paralelamente a los experimentos anteriores, se determinó el papel de la Ang-(1-7) sobre la inducción de las moléculas de adhesión empleando la IL-1 β como estímulo inflamatorio. Para tal caso, algunos cultivos de HUVEC confluentes se preestimularon con el inhibidor A779 (1 μ M) para posteriormente ser tratados con IL-1 β (2,5 ng/ml) y Ang-(1-7) (100 nM) o ambos durante 18 h. En presencia de la IL-1 β se observó un aumento tanto de ICAM-1 como de VCAM-1, lo cual fue disminuido notablemente con el tratamiento de Ang-(1-7) (Fig. 41B y 42B). A continuación, se

determinó que la incubación de las HUVEC con A779 en presencia de IL-1 β y Ang-(1-7), produjo un aumento de la expresión de ambas moléculas de adhesión, lo que condujo a considerar que el mecanismo de acción de la Ang-(1-7) está mediado a través del receptor Mas (Fig. 41B y 42B).

Mediante técnicas de inmunofluorescencia, también se pudieron observar y confirmar los datos obtenidos por citometría de flujo. La expresión de las CAMs en la superficie celular aumentó por efecto de la IL-1 β , lo cual fue notablemente disminuido en presencia de la Ang-(1-7); mientras que el A779 abolió por completo dicha acción (Fig. 41A y 42A).

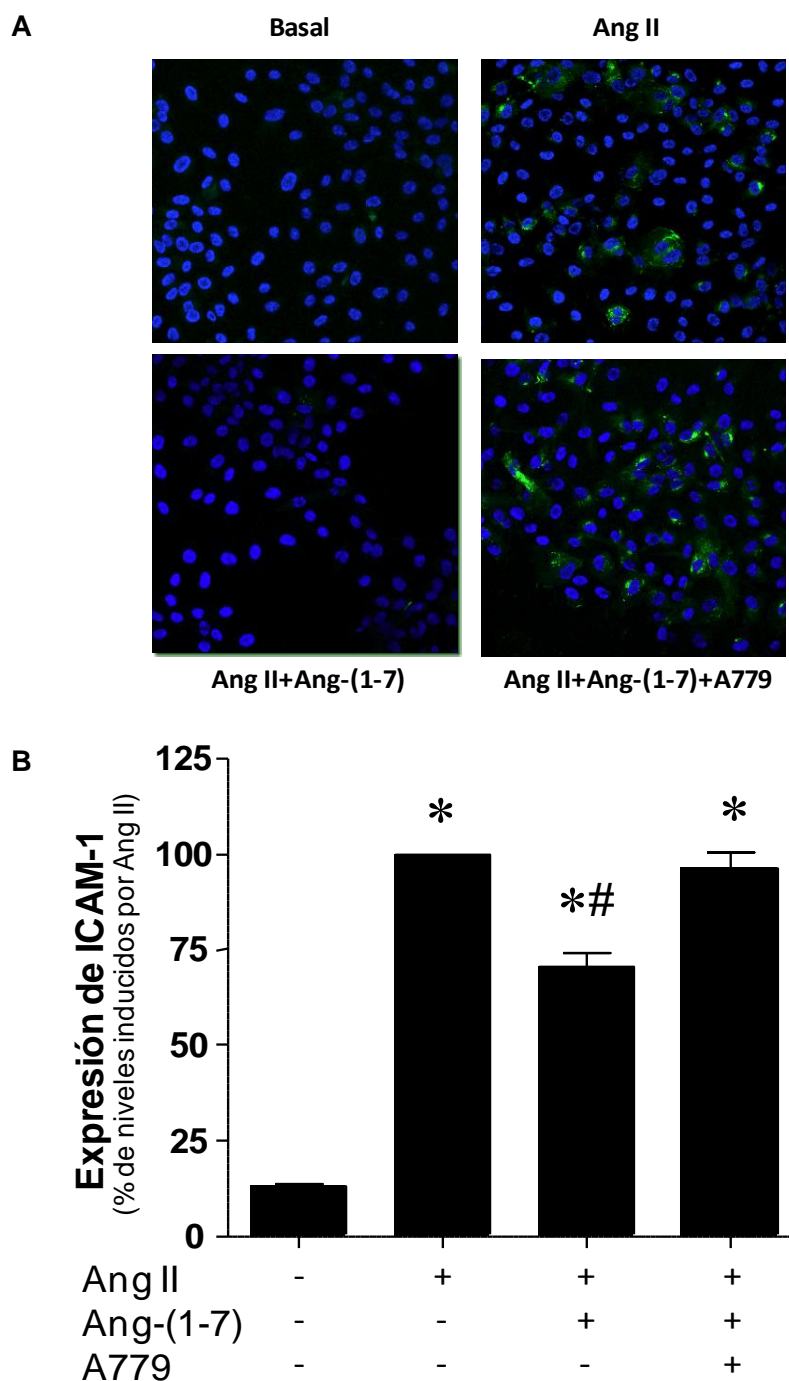


Fig. 39. La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, atenúa la expresión de ICAM-1 inducida por Ang II. Las HUVEC fueron incubadas durante 18 h con Ang II (100 nM) y Ang-(1-7) (100 nM). En algunos casos, los cultivos se preincubaron con el antagonista del receptor Mas, A779 (1 μ M). **(A)** En verde se identifica la tinción positiva para ICAM-1 (1/100). En azul aparecen los núcleos contrateñidos con DAPI. 400X. El tratamiento con Ang II incrementó la expresión de ICAM-1 que fue reducida significativamente en presencia de la Ang-(1-7) y revertida con el inhibidor A779. **(B)** Posteriormente se determinaron los niveles de ICAM-1 mediante citometría de flujo. Los resultados representan la media \pm EEM de siete experimentos independientes respectivamente y se expresan como porcentaje del efecto inducido por Ang II (# $p < 0.05$ frente a Ang II; * $p < 0.05$ frente a condiciones basales).

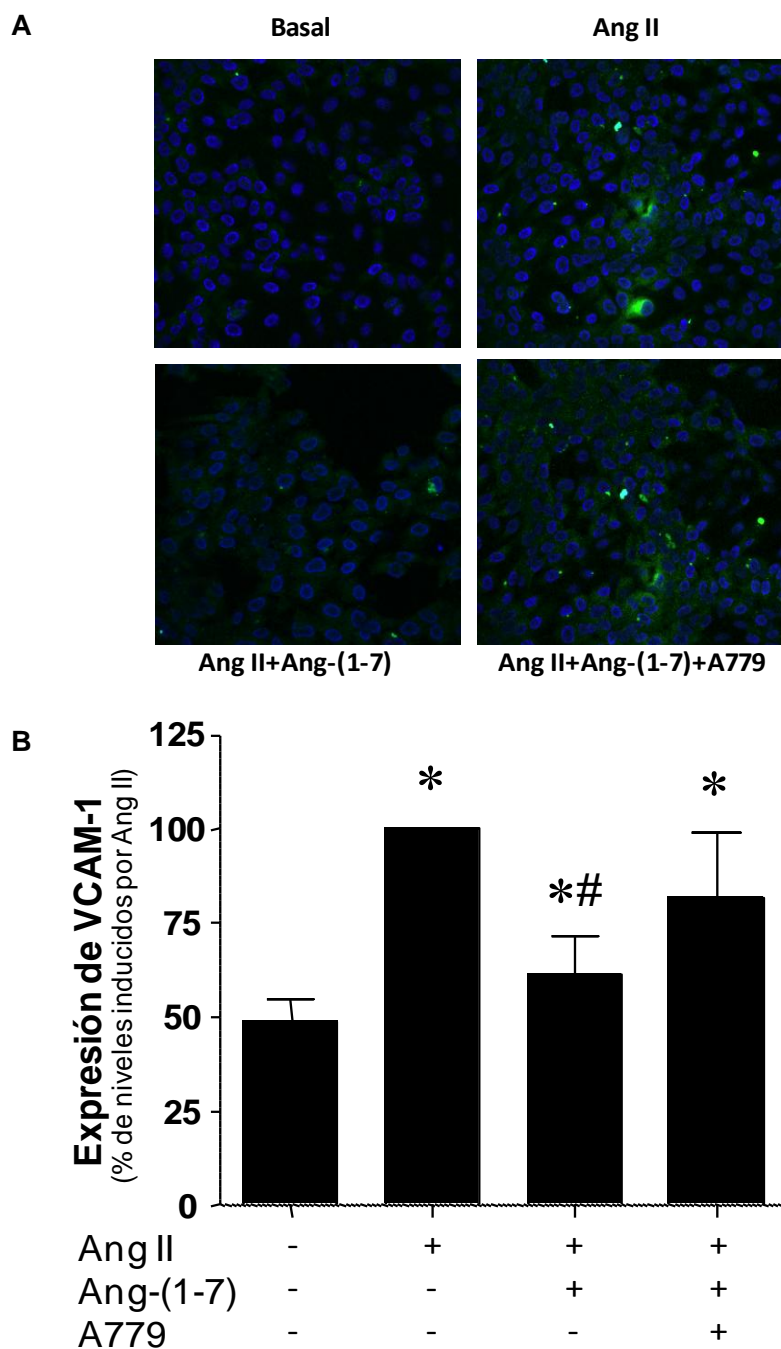


Fig. 40. La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, disminuye la expresión de VCAM-1 inducida por Ang II. Las HUVEC fueron incubadas durante 18 h con Ang II (100 nM) y Ang-(1-7) (100 nM). En algunos casos, los cultivos se preincubaron con el antagonista del receptor Mas, A779 (1 μ M). **(A)** En verde se identifica la tinción positiva para VCAM-1 (1/100). En azul aparecen los núcleos contrateñidos con DAPI. 400X. El tratamiento con Ang II incrementó la expresión de VCAM-1 que fue reducida significativamente en presencia de la Ang-(1-7) y revertida con el inhibidor A779. **(B)** Posteriormente se determinaron los niveles de VCAM-1 mediante citometría de flujo. Los resultados representan la media \pm EEM de cinco experimentos independientes respectivamente y se expresan como porcentaje del efecto inducido por Ang II (# $p < 0.05$ frente a Ang II; * $p < 0.05$ frente a condiciones basales).

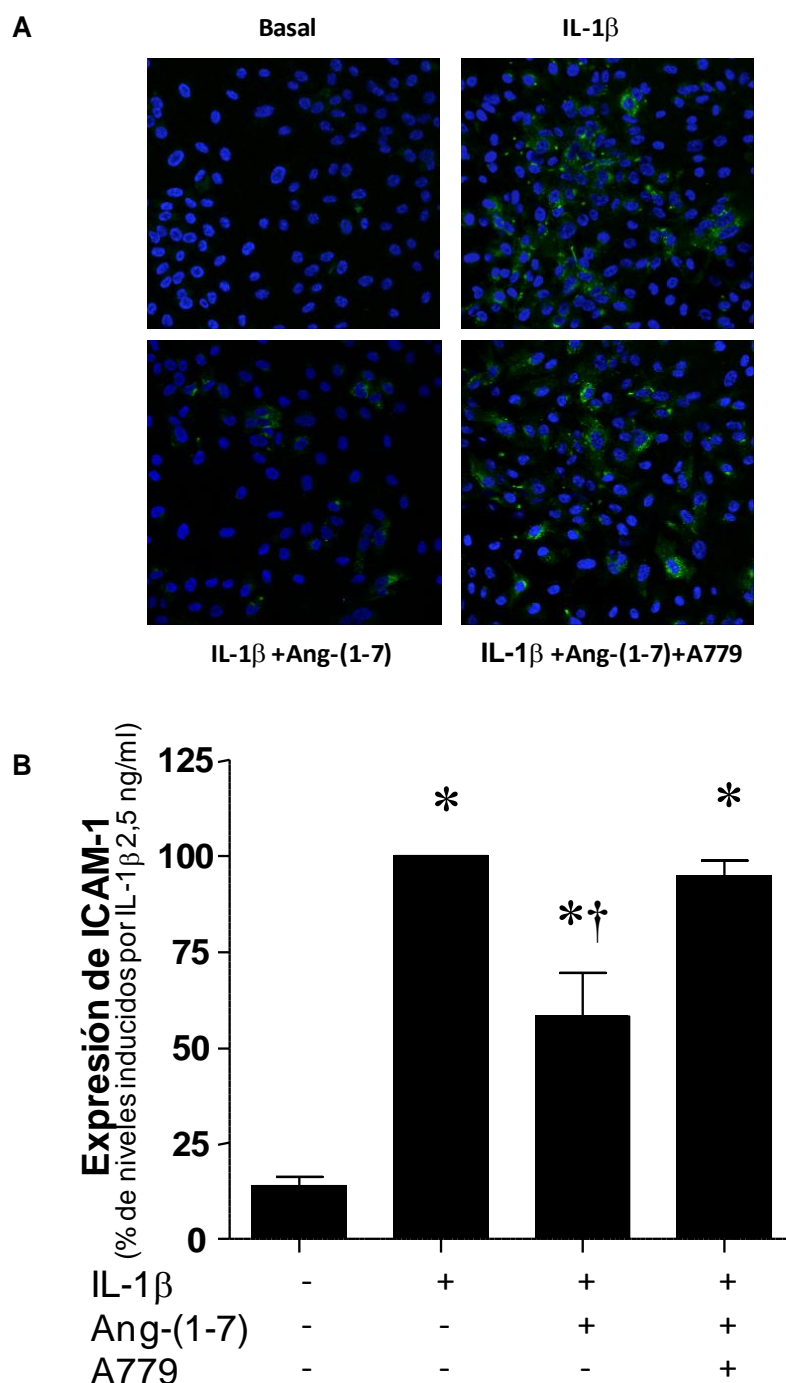


Fig. 41. La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, atenúa la expresión de ICAM-1 inducida por IL-1 β . Las HUVEC fueron incubadas durante 18 h con IL-1 β (2,5 ng/ml) y Ang-(1-7) (100 nM). En algunos casos, los cultivos se preincubaron con el antagonista del receptor Mas, A779 (1 μ M). **(A)** En verde se identifica la tinción positiva para ICAM-1 (1/100). En azul aparecen los núcleos contrateñidos con DAPI. 400X. El tratamiento con IL-1 β incrementó la expresión de ICAM-1 que fue reducida significativamente en presencia de la Ang-(1-7) y revertida con el inhibidor A779. **(B)** Posteriormente se determinaron los niveles de ICAM-1 mediante citometría de flujo. Los resultados representan la media \pm EEM de seis experimentos independientes respectivamente y se expresan como porcentaje del efecto inducido por IL-1 β 2,5 ng/ml ($\dagger p < 0.05$ frente a IL-1 β 2,5 ng/ml; * $p < 0.05$ frente a condiciones basales).

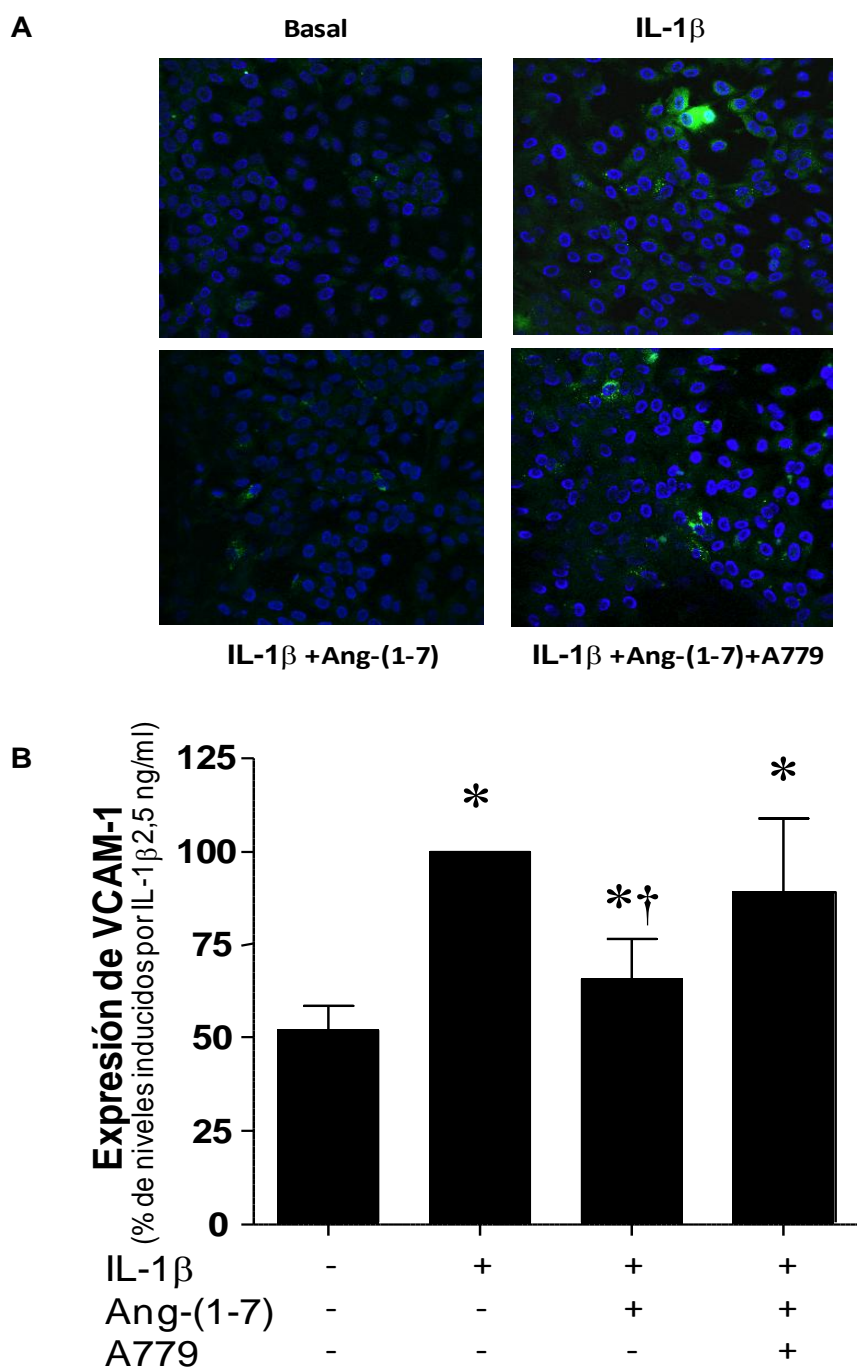


Fig. 42. La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, atenúa la expresión de VCAM-1 inducida por IL-1β. Las HUVEC fueron incubadas durante 18 h con IL-1β (2,5 ng/ml) y Ang-(1-7) (100 nM). En algunos casos, los cultivos se preincubaron con el antagonista del receptor Mas, A779 (1 μM). **(A)** En verde se identifica la tinción positiva para VCAM-1 (1/100). En azul aparecen los núcleos contrateñidos con DAPI. 400X. El tratamiento con IL-1β incrementó la expresión de VCAM-1 que fue reducida significativamente en presencia de la Ang-(1-7) y revertida con el inhibidor A779. **(B)** Posteriormente se determinaron los niveles de VCAM-1 mediante citometría de flujo. Los resultados representan la media ± EEM de cinco experimentos independientes respectivamente y se expresan como porcentaje del efecto inducido por IL-1β 2,5 ng/ml (†p<0.05 frente a IL-1β 2,5 ng/ml; *p<0.05 frente a condiciones basales).

3. LA ENZIMA NADPH OXIDASA ESTÁ IMPLICADA EN LA REDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ICAM-1 Y VCAM-1 MEDIADA POR ANG-(1-7) EN HUVEC.

3.1 La enzima NADPH-oxidasa media la inducción de ICAM-1 y VCAM-1 estimulada por Ang II IL-1 β en HUVEC.

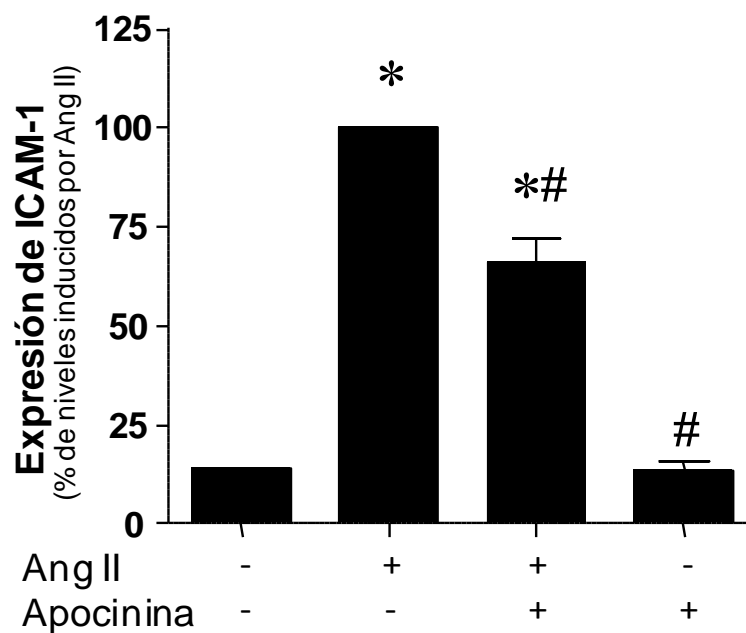
Tras la obtención de los resultados anteriores, se procedió a determinar si la Ang-(1-7), podría mediar la disminución de la inducción de CAMs a través de la enzima NADPH oxidasa al igual que lo observado en CMLAH.

Las HUVEC se pretrataron con el inhibidor de la enzima NADPH oxidasa, apocinina (30 μ M), y se estimularon con Ang II (100 nM) durante 18 h. Mediante la técnica de citometría de flujo se observó un aumento de la expresión tanto de ICAM-1 como de VCAM-1 en la superficie celular en presencia de la Ang II. El aumento de las CAMs inducido por Ang II disminuyó de manera significativa cuando las células fueron incubadas con apocinina, obteniéndose valores similares al tratamiento basal (Fig. 43A y 43B). El tratamiento con apocinina por si solo no modificó los niveles basales de expresión de las CAMs (Fig. 43A y 44B).

A continuación, las HUVEC se incubaron con el inhibidor de la enzima NADPH oxidasa, apocinina (30 μ M), antes del tratamiento con IL-1 β (2,5 ng/ml); para comprobar su acción sobre la inducción de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1. Después del tratamiento de 18 h y por medio de la técnica de citometría de flujo, se observó un aumento significativo de las dos moléculas de adhesión estudiadas en presencia de la IL-1 β . Dicho aumento fue abolido por completo en las células tratadas con apocinina, hasta alcanzar niveles similares a las condiciones basales (Fig. 44A y 44B). La apocinina por si misma no cambió los niveles basales de expresión de ICAM-1 y VCAM-1 (Fig. 44A y 44B).

Dado que la NADPH oxidasa participa en la inducción de las CAMs, la inhibición de esta enzima por Ang-(1-7) puede constituir un motivo de su efecto atenuador de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1.

A



B

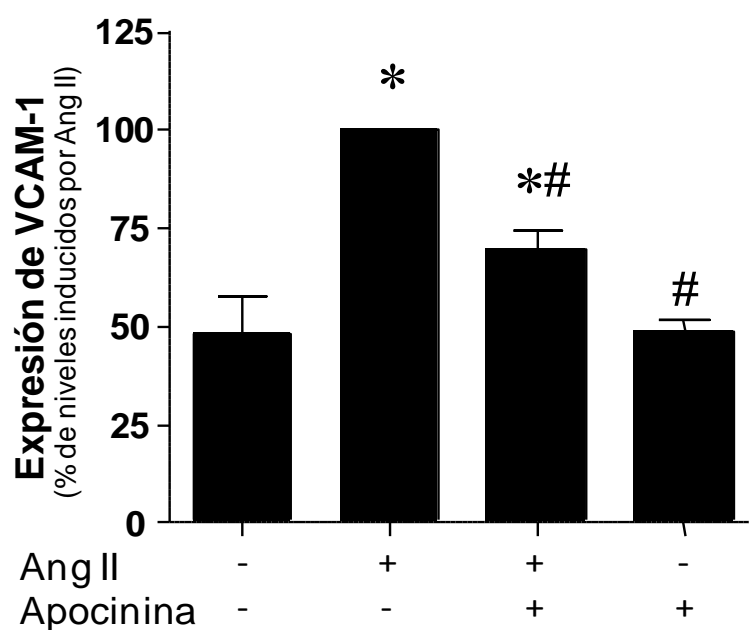
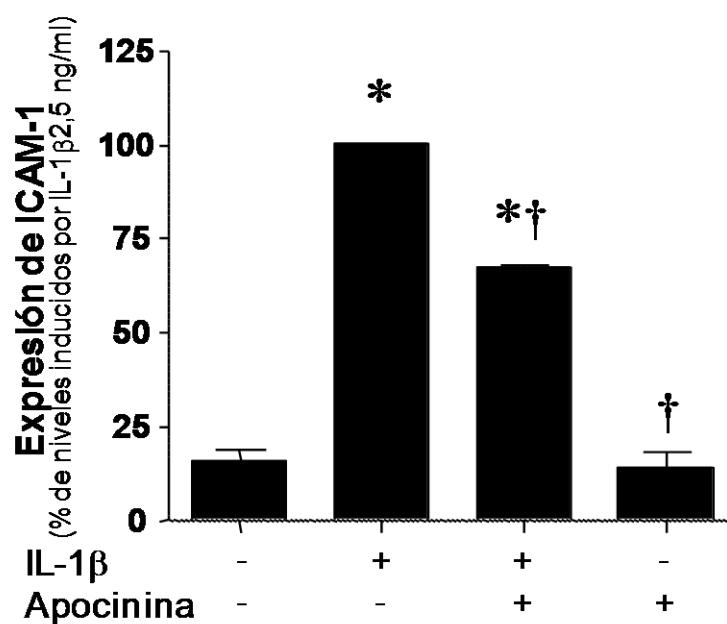


Fig. 43. La enzima NADPH oxidasa media la inducción de ICAM-1 y V-CAM-1 estimulada por Ang II. Las HUVEC fueron preincubadas con el inhibidor de la enzima NADPH oxidasa, apocinina (30 μ M) y tratadas con Ang II (100 nM) durante 18 h. Posteriormente se determinaron los niveles de **(A)** ICAM-1 y **(B)** VCAM-1 mediante citometría de flujo. Los resultados representan la media \pm EEM tres experimentos independientes en ambos casos y se expresan como porcentaje del efecto inducido por Ang II (# p <0.05 frente a Ang II; * p <0.05 frente a condiciones basales).

A



B

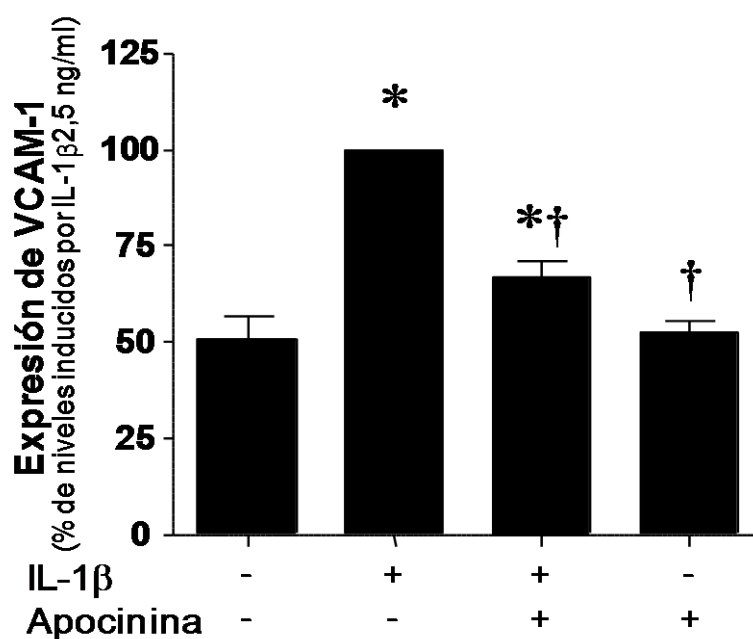


Fig. 44. La enzima NADPH oxidasa media la inducción de ICAM-1 y V-CAM-1 estimulada por IL-1 β . Las HUVEC fueron preincubadas con apocinina (30 μ M) y tratadas con IL-1 β (2,5 ng/ml) durante 18 h. Posteriormente se determinaron los niveles de (A) ICAM-1 y (B) VCAM-1 mediante citometría de flujo. Los resultados representan la media \pm EEM de tres y cuatro experimentos independientes respectivamente. Los datos se expresan como porcentaje del efecto inducido por IL-1 β 2,5 ng/ml ($\dagger p < 0.05$ frente a IL-1 β 2,5 ng/ml * $p < 0.05$ frente a condiciones basales).

4. LA ANG-(1-7), A TRAVÉS DEL RECEPTOR MAS, ATENÚA LA SENESENCIA EN HUVEC INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II E IL-1 β

4.1 La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, disminuye la senescencia endotelial inducida por Ang II e IL-1 β .

Una vez establecida la acción antiinflamatoria de la Ang-(1-7) a través del receptor Mas en las CMLAH y las HUVEC así como los posibles mecanismos implicados, se decidió estudiar la implicación de esta molécula en la senescencia endotelial entendida como un mecanismo de daño vascular. Es conocido que el proceso de senescencia puede ser producida por estímulos extracelulares como el estrés oxidativo entre otros factores. Como habíamos comprobado en los experimentos anteriores, tanto la Ang II y la IL-1 β están implicadas en la generación de estrés oxidativo y daño celular asociado a enfermedades cardiovasculares, por consiguiente era importante establecer si Ang II y la IL-1 β podrían inducir la entrada en senescencia de las HUVEC y averiguar si la Ang-(1-7) a través del receptor Mas podría prevenir este proceso.

De acuerdo al protocolo descrito previamente, cuando las HUVEC estaban semiconfluentes se sometieron a los diferentes tratamientos durante 24 h y posteriormente se realizó la tinción de SA- β -gal. El valor basal de células positivas a la tinción SA- β Gal en los experimentos realizados fue de $1,17 \pm 0,16\%$ (resultados de 18 experimentos independientes). La Ang II (100 nM) produjo un aumento del número de células senescentes en cultivo respecto a las condiciones basales (Fig. 45A y 45B). En las células estimuladas con Ang II y tratadas con Ang-(1-7), disminuyó significativamente el número de células azules (Fig. 45B) y este efecto fue revertido cuando se co-incubaron con A779 (1 μ M) (Fig. 45B). Este hecho puso de manifiesto que la acción de la Ang-(1-7) para proteger a las células de la entrada en senescencia está implicado el receptor Mas.

De la misma manera, se preincubaron las HUVEC con A779 (1 μ M) y se trataron las HUVEC con IL-1 β (2,5 ng/ml), Ang-(1-7) (100 nM) o en combinación durante 24 h. La IL-1 β provocó un aumento en el número de células senescentes presentes en el cultivo respecto a las condiciones basales (Fig. 46A y 46B). La incubación de las células con Ang-(1-7) produjo una disminución de las células positivas a la tinción de Sa- β -gal (Fig. 46B), este efecto fue abolido en presencia de A779 (Fig. 46B). Tanto en los experimentos realizados con Ang II e IL-1 β , el número de células senescentes en las células tratadas con Ang-(1-7) y A779 por si mismos, no fueron significativas respecto a los tratamientos basales (Fig. 45B y 46B).

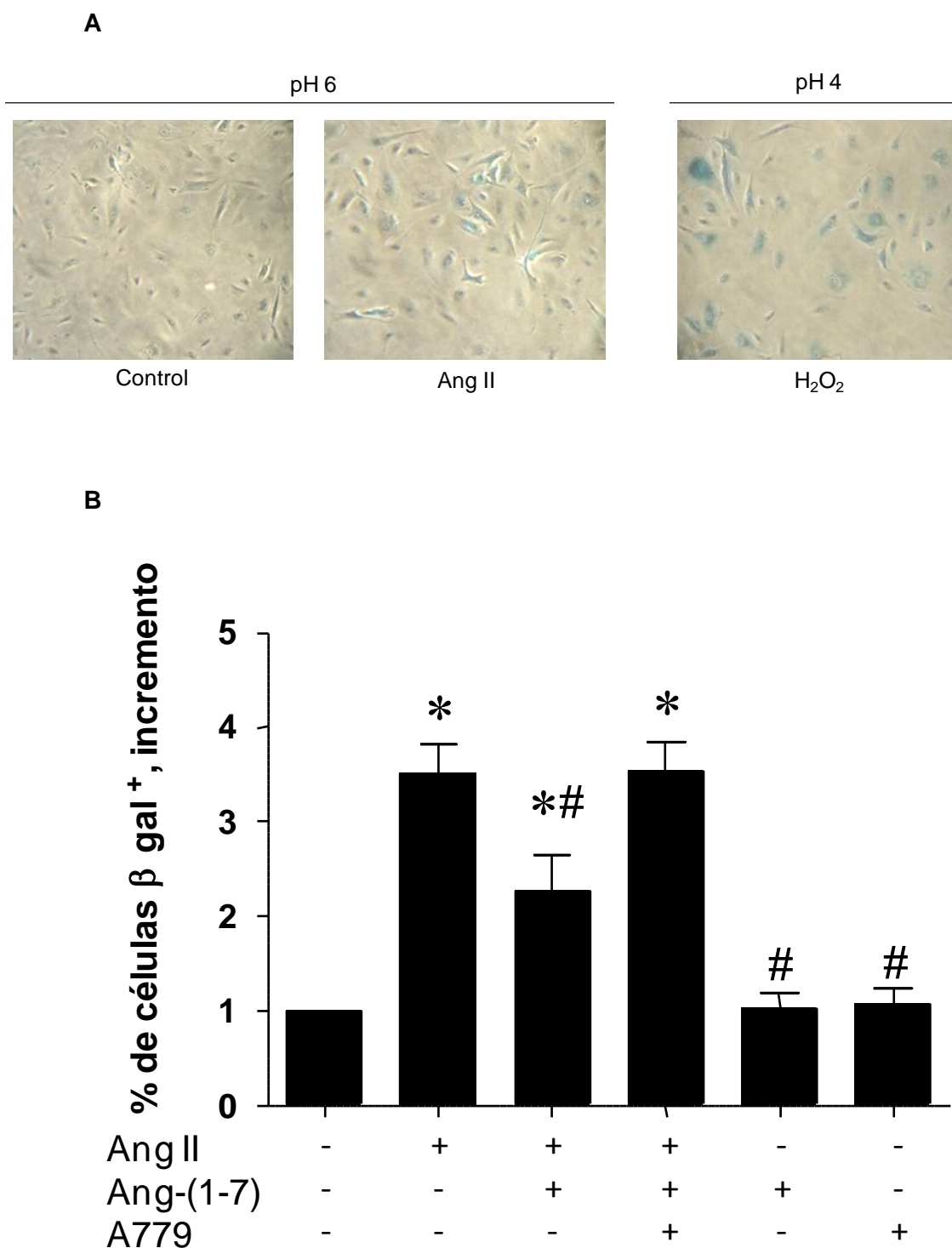


Fig. 45. La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, disminuye la senescencia endotelial inducida por Ang II. Las HUVEC fueron preincubadas con A779 (1 μ M) y estimuladas con Ang II (100 nM) y Ang-(1-7) (100 nM). Tras 24 h se realizó una tinción de de SA- β -gal y un recuento de células senescentes. **(A)** Imágenes representativas en campo claro. 200X. **(B)** Los resultados representan la media \pm EEM cuatro experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido respecto al control (# $p < 0.05$ frente a Ang II* $p < 0.05$ frente a condiciones basales).

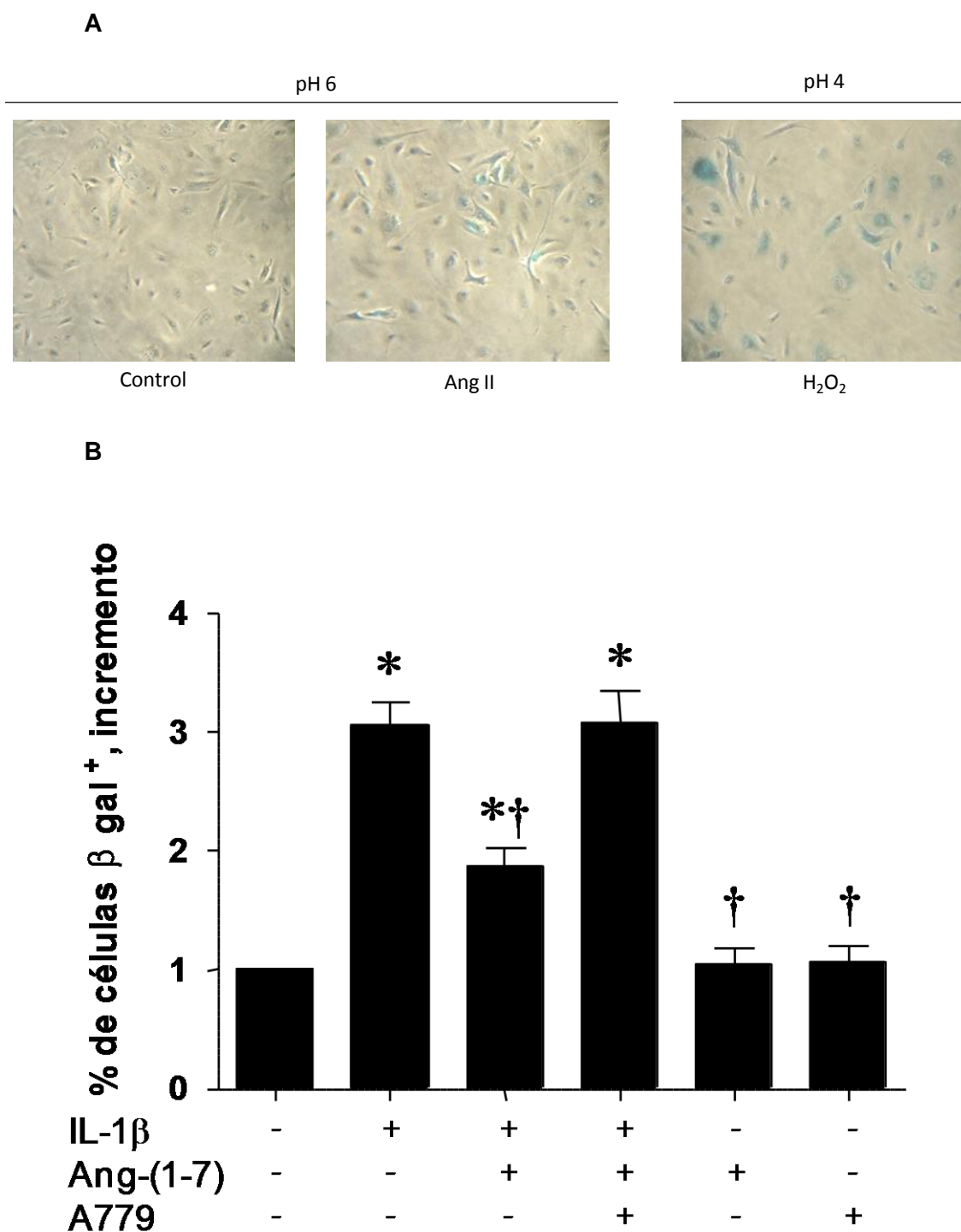


Fig. 46. La Ang-(1-7) a través del receptor Mas, disminuye la senescencia endotelial inducida por IL-1 β . Las HUVEC fueron preincubadas con A779 (1 μ M) y estimuladas con IL-1 β (2,5 ng/ml) y Ang-(1-7) (100 nM). Tras 24 h se realizó una tinción de SA- β -gal y un recuento de células senescentes. **(A)** Imágenes representativas en campo claro. 200X. **(B)** Los resultados representan la media \pm EEM seis experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido respecto al control (\dagger p<0.05 frente a IL-1 β 2,5 ng/ml *p<0.05 frente a condiciones basales).

4.2 La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, atenúa la inducción de daño en el ADN y disfunción telomérica provocada por Ang II. IL-1 β .

Con el fin de estudiar otro parámetro de senescencia, se realizó una doble inmunofluorescencia para determinar los puntos de daño telomérico inducido, que están relacionados con el daño en el ADN y la disfunción telomérica. Las HUVEC fueron pretratadas A779 (1 μ M) e incubadas con Ang II (100 nM), Ang-(1-7) (100 nM) y o en combinación durante 24 h. Mediante una doble inmunofluorescencia indirecta se colocaron y cuantificaron los puntos de daño en el ADN (γ H2AX). Los TIFs se definieron como los sitios donde los puntos de daño en el ADN (γ H2AX) colocaron con las señales de la proteína TRF-1 que se encuentra unida a los telómeros, lo cual evidenció la presencia de daño en estas estructuras celulares.

En la figura 47, se muestra en las células tratadas con Ang II un marcado incremento de los puntos de daño γ H2AX, fluorescencia colocada y TIFs (Fig. 47A, 47B, 47C y 47D). Este daño telomérico fue parcialmente revertido en las células co-incubadas con Ang-(1-7) respecto al tratamiento con Ang II sola (Fig. 47A, 47B, 47C y 47D). Para elucidar si esta acción se realizaba a través del receptor Mas, en algunos cultivos las células se incubaron con A779. Se observó que el tratamiento con A779 (1 μ M) abolió la acción de la Ang-(1-7) (Fig. 47A, 47B, 47C y 47D). Esto demostró que la Ang-(1-7) atenuó el daño en el ADN y la disfunción telomérica inducida a través del receptor Mas.

Por otra parte las HUVEC se incubaron con IL-1 β (2,5 ng/ml) durante 24 h. Posteriormente, se realizó una doble tinción de inmunofluorescencia y se observó que la IL-1 β aumentó el daño en el ADN, la fluorescencia colocada y los TIFs en relación a las condiciones basales (Fig. 48A, 48B, 48C y 48D). Una vez obtenido este resultado, se comprobó el efecto del tratamiento con Ang-(1-7) (100 nM), obteniéndose una disminución significativa de daño en el ADN, la fluorescencia colocada y los TIFs, respecto al estímulo con IL-1 β (Fig. 48A, 48B, 48C y 48D). Dicho efecto, fue revertido con A779 (1 μ M), lo cual correspondió con lo observado en el caso de la Ang II. Este hecho indicó que la Ang-(1-7) previene el daño telomérico asociado a la senescencia inducido por IL-1 β a través del receptor Mas (Fig. 48A, 48B, 48C y 48D).

A

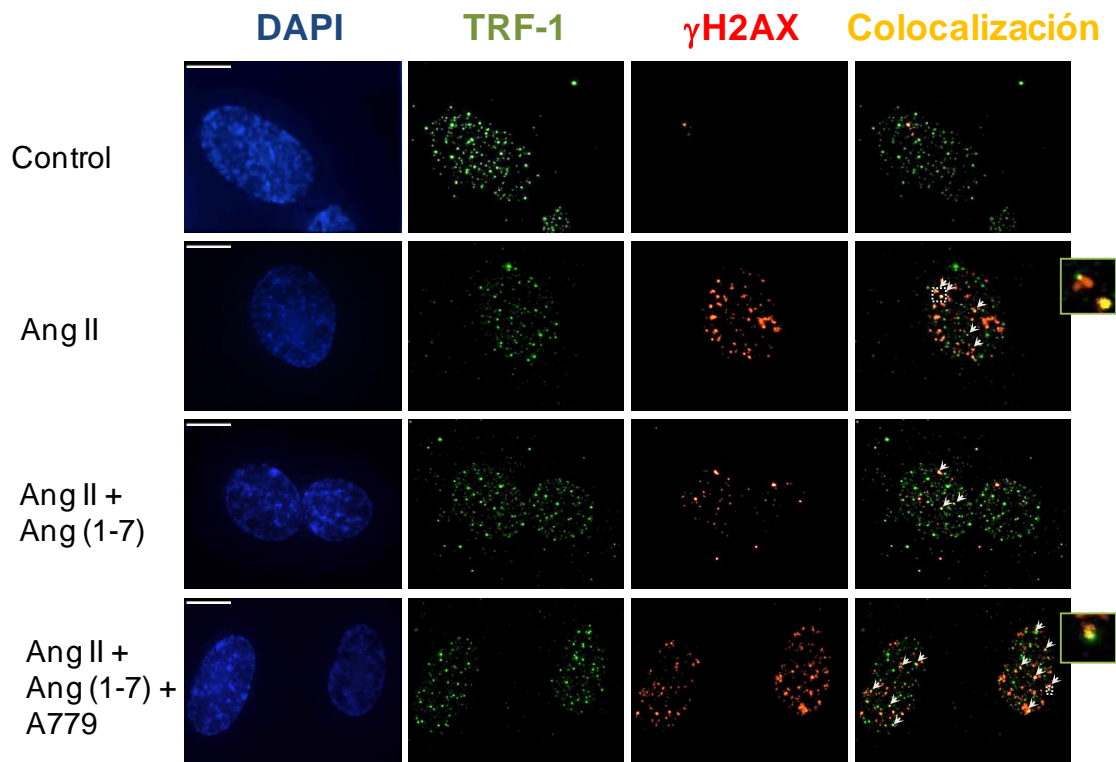


Fig. 47. La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, atenúa la inducción de daño en el ADN y disfunción telomérica provocada por la Ang II. Las HUVEC fueron preincubadas con A779 (1 μ M) y estimuladas con Ang II (100 nM) con o sin Ang-(1-7) (100 nM). **(A)** Tras 24 h se realizó una doble tinción de inmunofluorescencia con un anticuerpo contra γ H2AX (rojo), TRF-1 (verde) y el núcleo fue contrateñido con DAPI (azul). Las flechas en las imágenes superpuestas señalan los puntos de colocalización (TIFs). En el pequeño panel de la derecha se muestra una imagen ampliada de los puntos de colocalización. 1400 X.

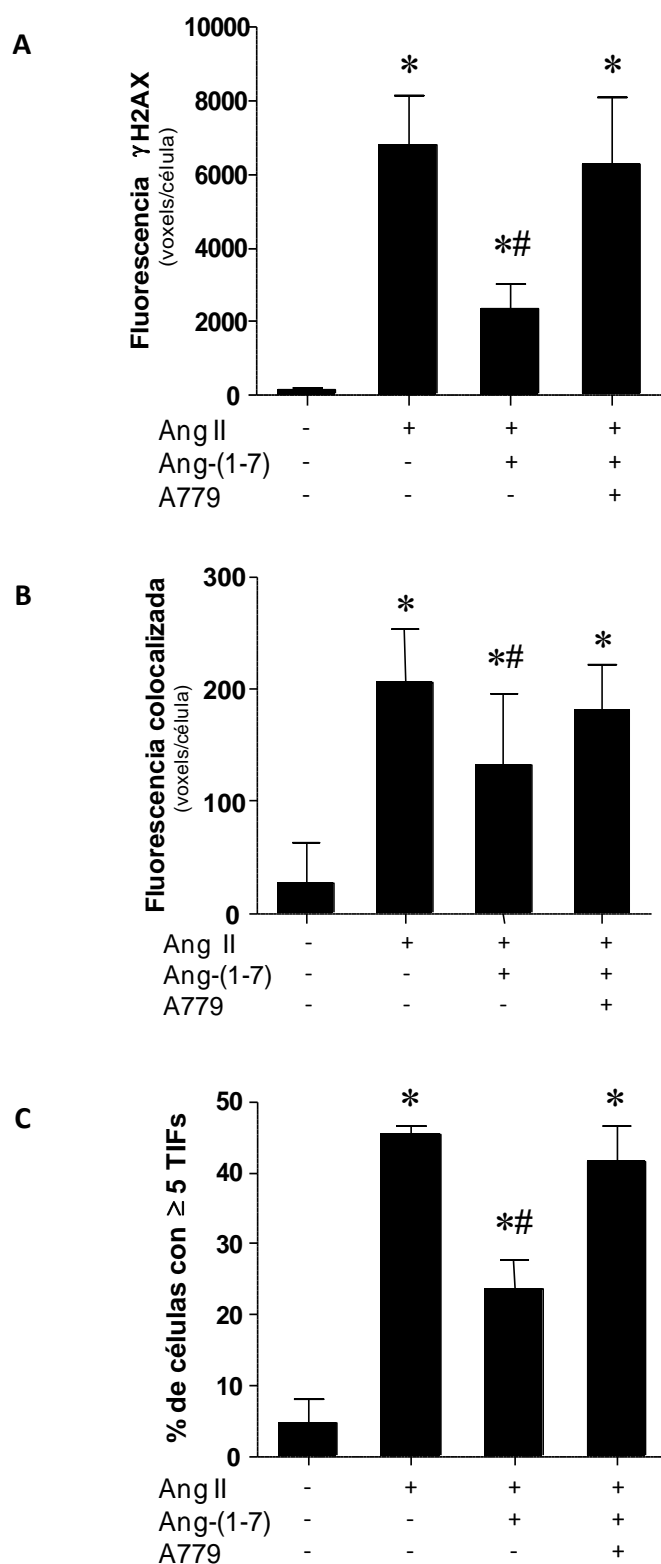


Fig. 47. (B y C) Cuantificación de γ H2AX y TIFs expresados como una media de la fluorescencia en voxels/ célula. **(D)** Cuantificación de TIFs expresados como el porcentaje de células con ≥ 5 TIFs/célula. Los datos representan la media de 3 experimentos con >250 células cuantificadas en cada caso ($\#p < 0.05$ frente a Ang II $*p < 0.05$ frente a condiciones basales).

A

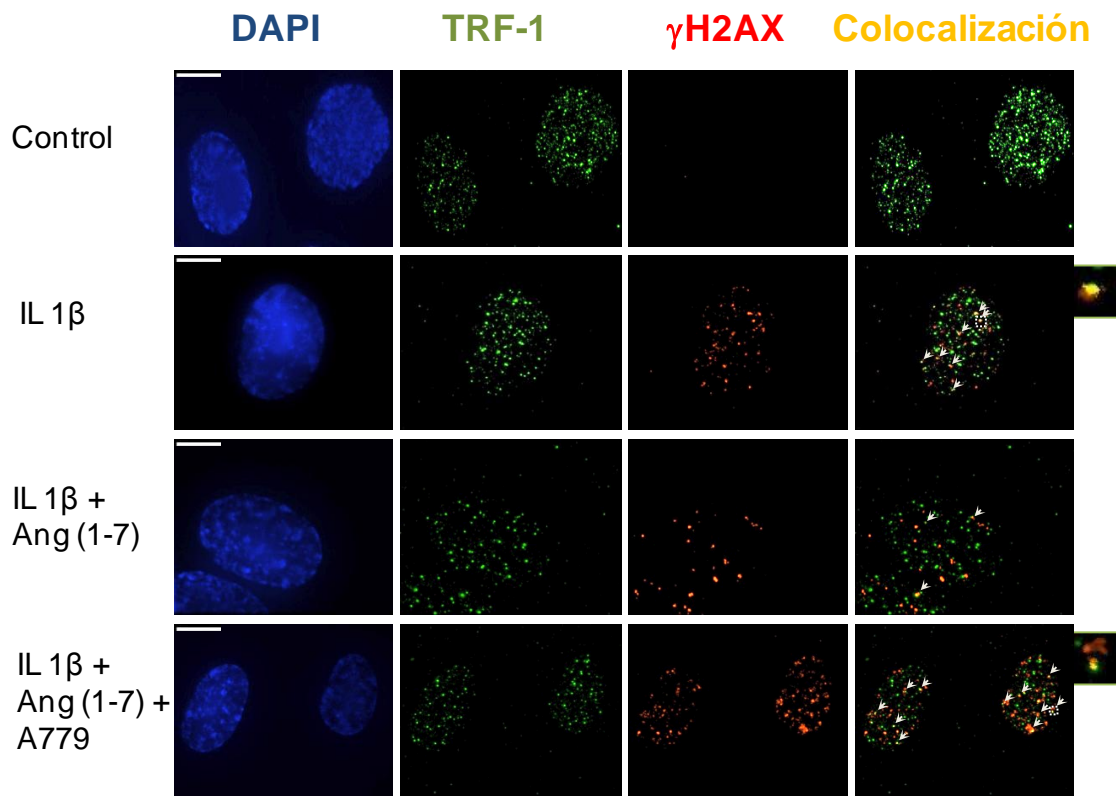


Fig. 48. La Ang-(1-7), a través del receptor Mas, atenúa la inducción de daño en el ADN y disfunción telomérica provocada por IL-1 β . Las HUVEC fueron preincubadas con A779 (1 mM) y estimuladas con IL-1 β (2,5 ng/ml) y Ang-(1-7) (100 nM). **(A)** Tras 24 h se realizó una doble tinción de inmunofluorescencia con un anticuerpo contra γ H2AX (rojo), TRF-1 (verde) y el núcleo fue contrateñido con DAPI (azul). Las flechas en las imágenes superpuestas señalan los puntos de colocalización (TIFs). En el pequeño panel de la derecha se muestra una imagen ampliada de los puntos de colocalización. 1400X.

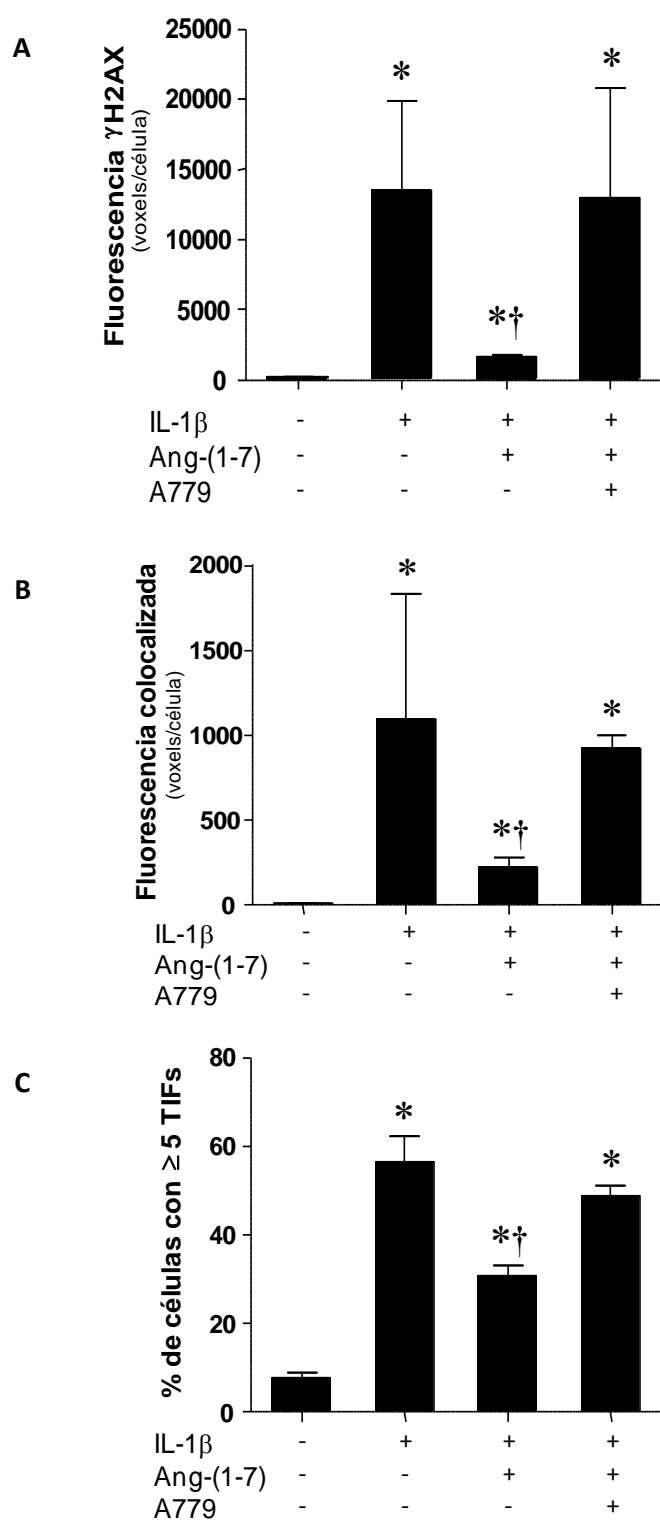


Fig. 48. (B y C) Cuantificación de γ H2AX y TIFs expresados como una media de la fluorescencia en voxels/ célula. **(D)** Cuantificación de TIFs expresados como el porcentaje de células con ≥ 5 TIFs/célula. Los datos representan la media de tres experimentos con >250 células cuantificadas en cada caso ($\dagger p < 0.05$ frente a IL-1 β 2,5 ng/ml * $p < 0.05$ frente a condiciones basales).

5. LA VISFATINA INDUCE LA SENESCENCIA EN HUVEC INDUCIDA A TRAVÉS DE SU ACTIVIDAD FOSFORRIBOSIL TRANSFERASA.

Paralelamente a los estudios con Ang-(1-7) se realizaron experimentos con la adipoquina visfatina, lo cual nos permitió comparar dos tipos de adipoquinas con acciones contrarias ligadas a enfermedades cardiovasculares y metabólicas. Con este propósito, se presentan a continuación los resultados derivados del análisis de los parámetros de senescencia previamente descritos en las HUVEC.

5.1 La visfatina induce el aumento del número de células senescentes en cultivo de una manera dependiente de la concentración y del tiempo.

Una vez que las HUVEC se encontraron semiconfluentes, fueron tratadas con distintas concentraciones de visfatina (25 ng/ml, 50 ng/ml y 100 ng/ml) durante 24 h. A continuación se realizó la tinción de SA- β -gal y se observó que la visfatina produjo un aumento significativo del número de células senescentes en cultivo, de una manera concentración dependiente (Fig. 49A y 49B). A la concentración umbral de 50 ng/ml se observó un aumento de $3,11 \pm 0.94\%$ en el número de células senescentes respecto al cultivo en condiciones basales (* $p < 0.05$; resultados de cinco experimentos independientes; Fig. 49A y 49B).

Después de obtener estos resultados, se eligió la concentración de visfatina 50 ng/ml por ser una concentración patofisiológica representativa, y se incubaron las células con este tratamiento durante 24, 48, 72 y 96 h. Al término de cada intervalo de tiempo, se observó que el número de células azules era mayor en función del aumento en el tiempo (Fig. 50). Paralelamente se utilizó el H₂O₂ (50 mM) como control positivo de la técnica, que produjo un aumento de células senescentes considerablemente mayor respecto a las condiciones basales y de manera dependiente del tiempo (Fig. 50).

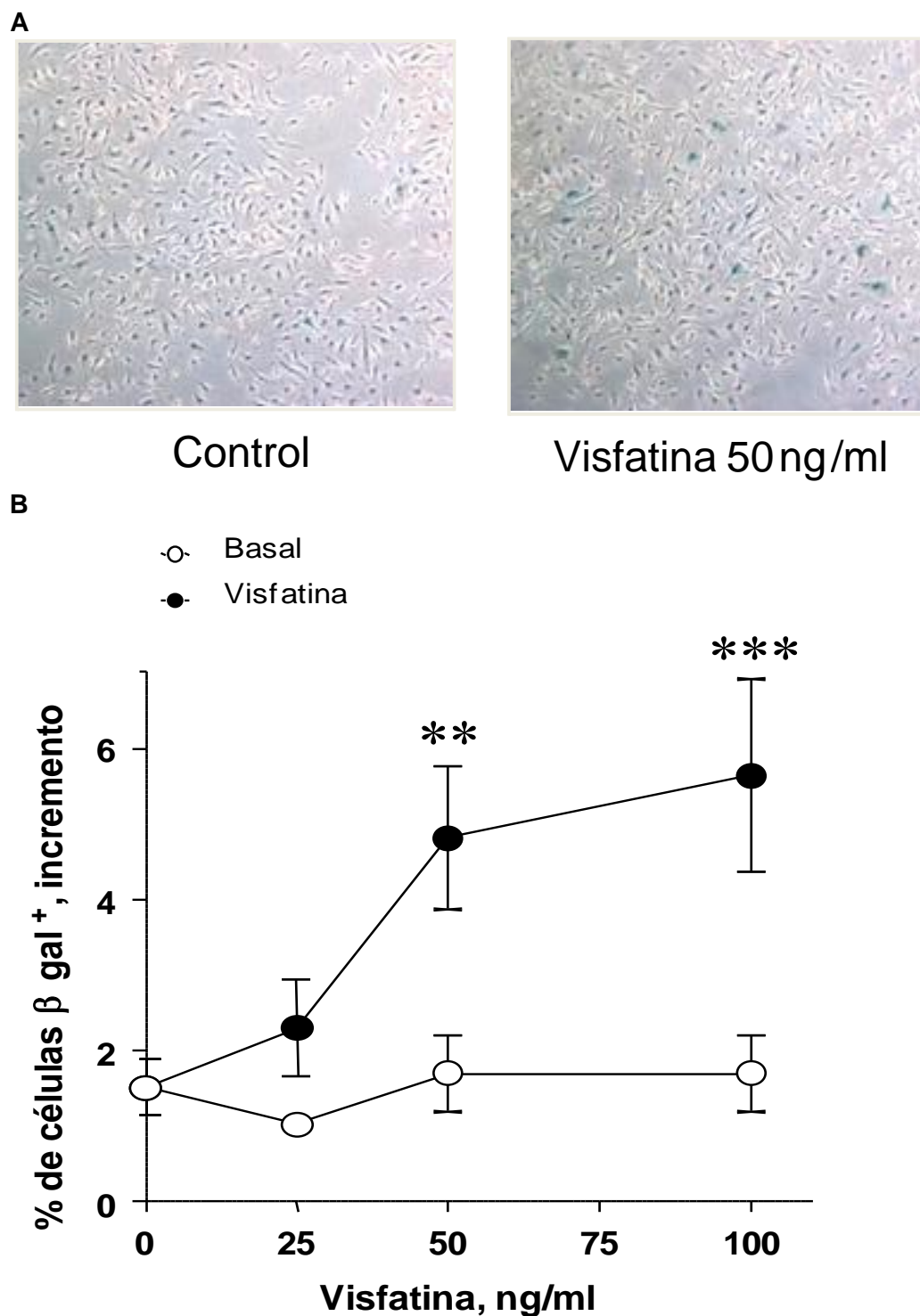


Fig. 49. La visfatina induce el número de células senescentes en cultivo de una manera dependiente de la concentración. (A) Las HUVEC fueron incubadas durante 24 h con visfatina (50 ng/ml) y fueron teñidas para la visualización de SA-β-gal. Imágenes representativas en campo claro. 200X. **(B)** Las HUVEC fueron tratadas con visfatina a diferentes concentraciones (25 ng/ml, 50 ng/ml y 100 ng/ml) durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se realizó una tinción de SA-β-gal y un recuento de células senescentes. Los resultados representan la media ± EEM de cinco experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido respecto al control (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 frente a condiciones basales).

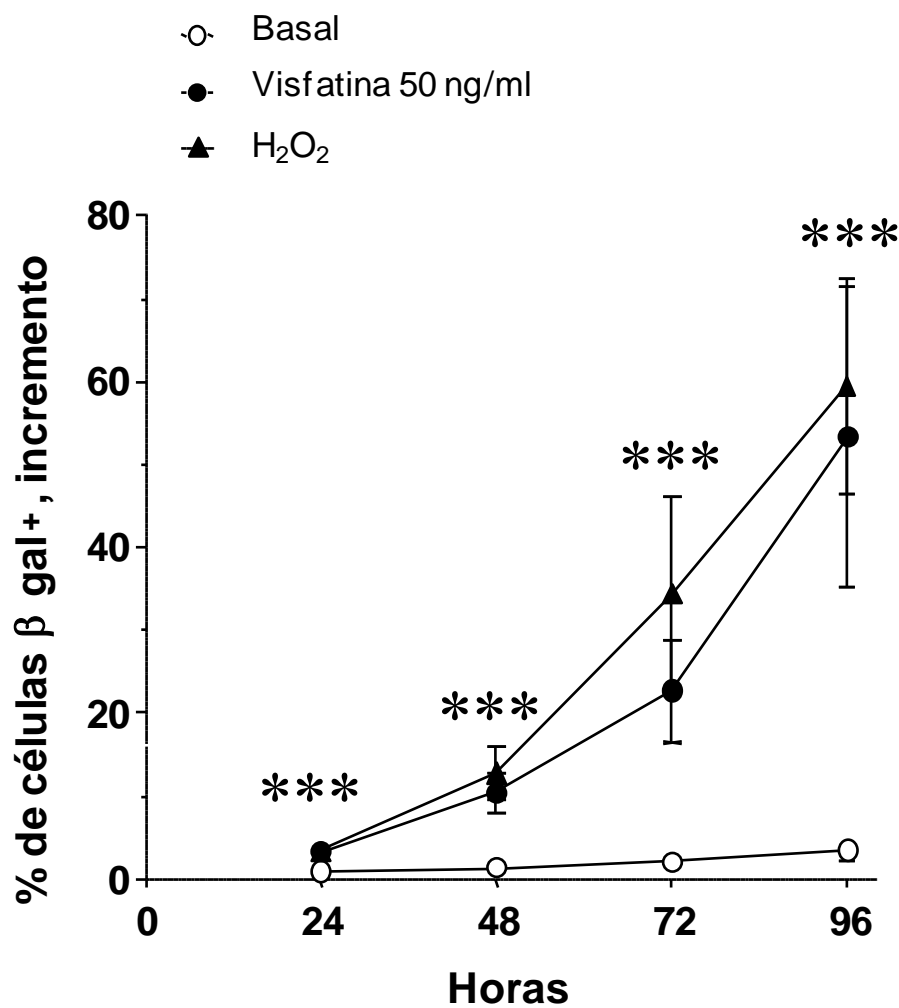


Fig. 50. La visfatina induce el número de células senescentes en cultivo de una manera dependiente del tiempo. Las células fueron tratadas con visfatina (50 ng/ml) a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 h). Posteriormente se realizó una tinción de SA-β-gal y un recuento de células senescentes. El tratamiento con H₂O₂ (50 mM) se utilizó como control positivo de la técnica. Los resultados representan la media ± EEM de cuatro experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido respecto al control (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 frente a condiciones basales).

5.2 La visfatina induce el daño en el ADN y disfunción telomérica de una manera dependiente de la concentración.

Con el fin de evaluar el daño en el ADN y la disfunción de los telómeros, como parámetros relacionados con la senescencia y el efecto de la visfatina sobre éstos, las HUVEC se estimularon con visfatina a diferentes concentraciones: 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml y 100 g/ml durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó una doble inmunofluorescencia indirecta empleando el anticuerpo frente a TRF-1 para evidenciar la presencia de los telómeros en los núcleos celulares. Además se utilizó el anticuerpo frente a γ H2AX para localizar el daño en el ADN. De acuerdo a la inmunofluorescencia, se observa que la visfatina incrementó el daño en el ADN y los puntos de daño telomérico de manera concentración dependiente, de manera semejante a lo observado en la tinción de SA- β -gal (Fig. 51A, 51B y 51C).

Cabe mencionar que para la realización de los experimentos de doble inmunofluorescencia se utilizó como control positivo de la técnica el etopósido. Se trata de un compuesto antineoplásico que produce daño en el ADN, a través de su interferencia en la actividad de la topoisomerasa II. Como era de esperar, el daño en el ADN y los puntos de disfunción telomérica fueron considerablemente mayores que los provocados por la visfatina (Fig 51A, 51B y 51C).

A

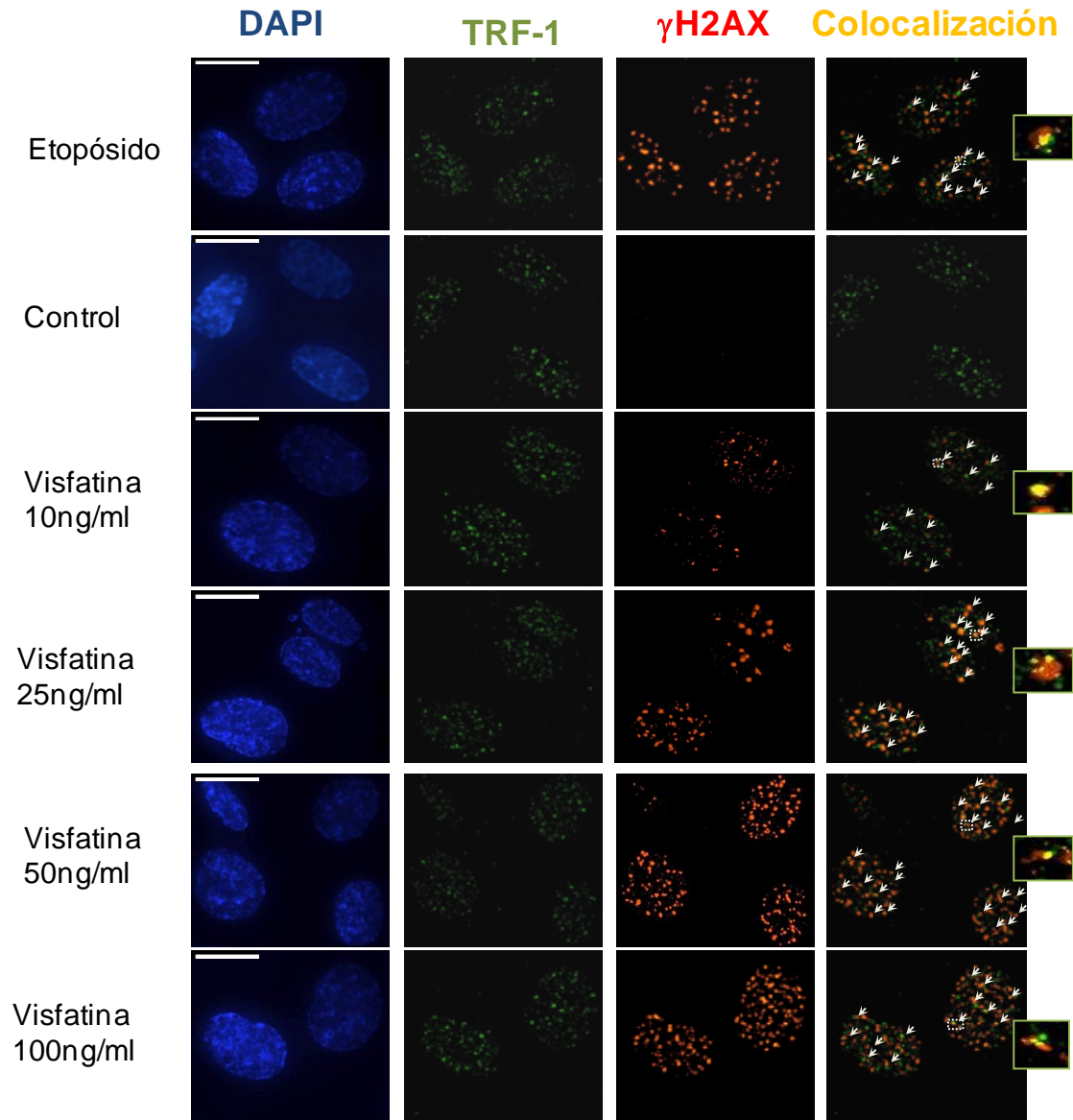


Fig. 51. La visfatina induce el daño en el ADN y disfunción telomérica de una manera dependiente de la concentración. Las HUVEC fueron incubadas con visfatina a diferentes concentraciones (10, 25, 50 y 100 ng/ml). **(A)** Tras 24 h se realizó una doble tinción de inmunofluorescencia con un anticuerpo contra γ H2AX (rojo), TRF-1 (verde) y el núcleo fue contrateñido con DAPI (azul). Las flechas en las imágenes mezcladas señalan los puntos de colocalización (TIFs). En el pequeño panel de la derecha se muestra una imagen ampliada de los puntos de colocalización. 1400X.

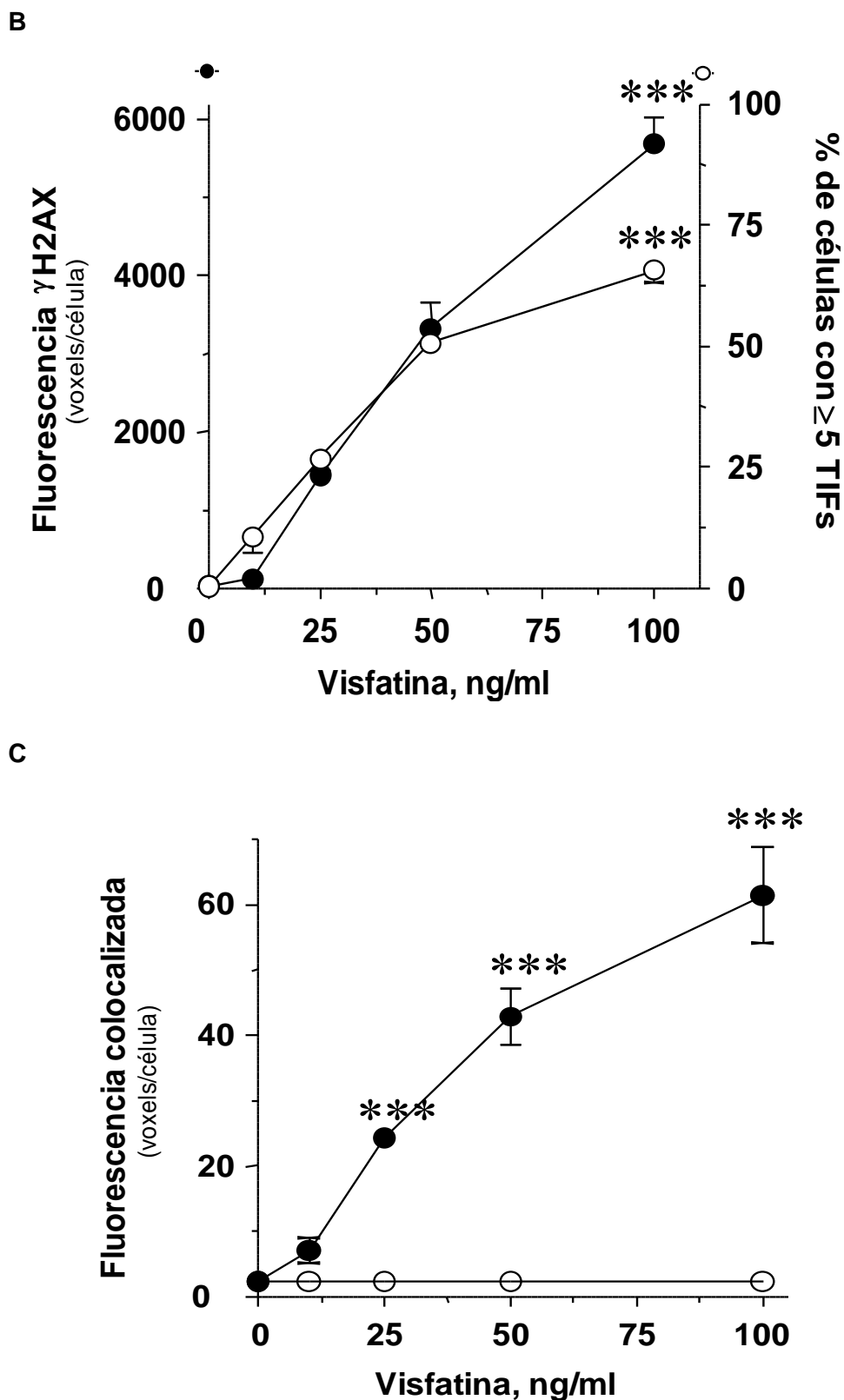


Fig. 51. (B) Cuantificación de γ H2AX y TIFs expresados como una media de la fluorescencia en voxels/ célula. **(C)** Cuantificación de TIFs expresados como el porcentaje de células con ≥ 5 TIFs/célula. Los datos representan la media de 3 experimentos con >250 células cuantificadas en cada caso (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ frente a condiciones basales).

5.3 La visfatina induce el aumento del número de células senescentes en cultivo a través de su actividad nicotinamida fosforribosil transferasa (Nampt).

Con el fin de correlacionar los datos obtenidos por inmunofluorescencia indirecta con la tinción de SA- β -gal, las HUVEC se trataron con visfatina (50 ng/ml) y NMN (100 μ M) durante 24 h. Una vez transcurrido este tiempo, se realizó la tinción y se observó que el NMN, producto de la actividad Nampt, aumentó el número de células azules en el cultivo de manera similar al efecto de la propia visfatina (Fig. 52). Por otra parte, las células fueron preincubadas con el inhibidor no competitivo específico de la actividad Nampt, el APO866 (10 μ M) durante 30 min y después estimuladas con visfatina (50 ng/ml) durante 24 h. En las células tratadas con APO866, existió una disminución significativa del número de células senescentes, que fue similar a lo observado en el tratamiento basal (Fig. 52).

5.4 La visfatina induce el daño en el ADN y disfunción telomérica a través de su actividad nicotinamida fosforribosil transferasa.

El siguiente objetivo fue determinar si la actividad enzimática Nampt era también el mecanismo responsable del daño en los telómeros y en el ADN provocado por la visfatina. De acuerdo a la figura 53A se puede observar que el NMN indujo, de una manera similar a la visfatina, el daño en el ADN y la disfunción telomérica (Fig. 53B, 53C y 53D). El etopósido incrementó considerablemente el daño en los telómeros en comparación con la visfatina y el NMN (Fig. 53A, 53B, 53C y 53D).

Las células se preincubaron con el inhibidor de la actividad Nampt, APO866 (10 μ M) durante 30 min, posteriormente las células se estimularon con visfatina (50 ng/ml) durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la doble inmunofluorescencia indirecta empleando el anticuerpo frente a TRF-1 y el anticuerpo frente a γ H2AX para localizar el daño en el ADN (Fig. 54A). De acuerdo a los resultados, se observó que la visfatina incrementó el daño en el ADN y los TIFs respecto a las condiciones basales (Fig. 54A, 54B, 54C y 54D). En presencia del inhibidor APO866 disminuyeron el daño en el ADN y los puntos de disfunción telomérica inducidos por la visfatina (Fig. 54A, 54B, 54C y 54D).

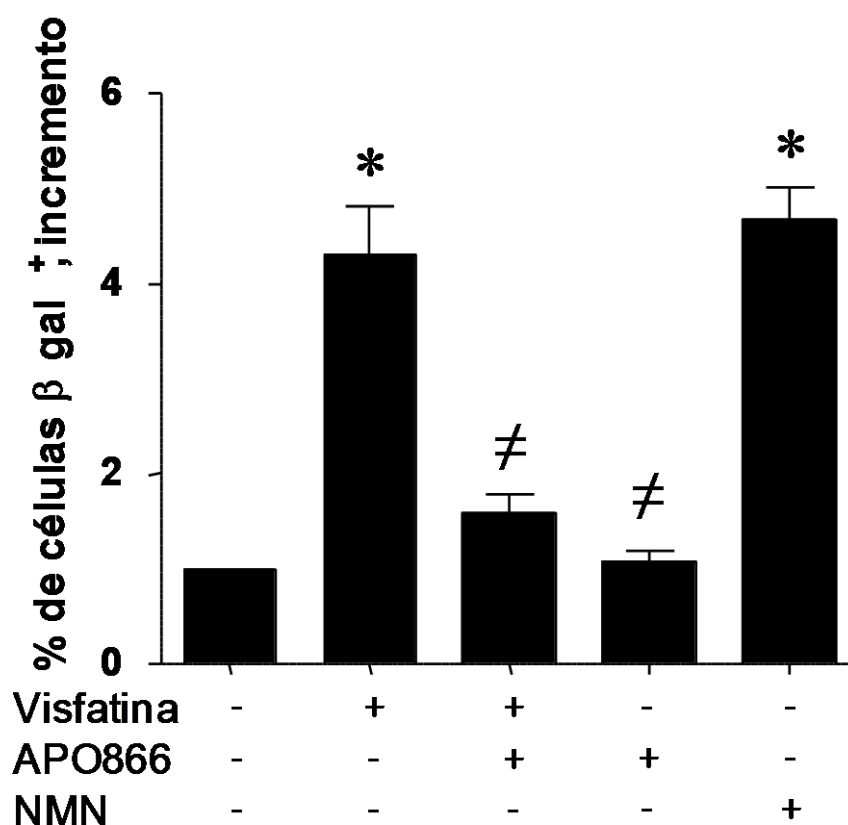


Fig. 52. La visfatina induce el número de células senescentes en cultivo a través de su actividad nicotinamida fosforribosil transferasa. Las HUVEC fueron preincubadas con APO866 (10 μ M) y estimuladas con visfatina (50 ng/ml) y NMN (100 μ M). Tras 24 h se realizó una tinción de SA- β -gal y un recuento de células senescentes. Los resultados representan la media \pm EEM tres experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido respecto al control ($\neq p < 0.05$ frente a visfatina 50 ng/ml $*p < 0.05$ frente a condiciones basales).

A

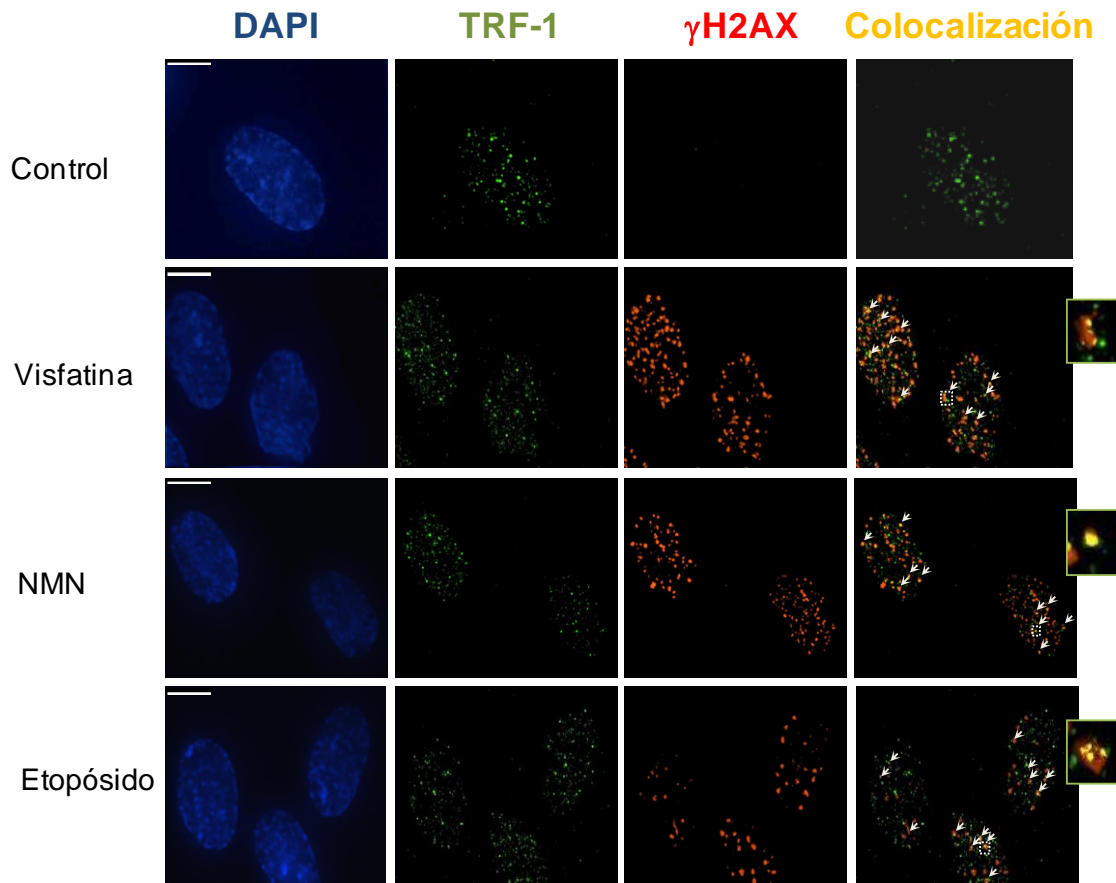


Fig. 53. La visfatina induce el daño en el ADN y disfunción telomérica a través de su actividad nicotinamida fosforribosil transferasa. Las HUVEC fueron incubadas con visfatina (50 ng/ml) y NMN (100 μ M). **(A)** Tras 24 h se realizó una doble tinción de inmunofluorescencia con un anticuerpo contra γ H2AX (rojo), TRF-1 (verde) y el núcleo fue contrateñido con DAPI (azul). Las flechas en las imágenes mezcladas señalan los puntos de colocalización (TIFs). En el pequeño panel de la derecha se muestra una imagen ampliada de los puntos de colocalización. 1400X.

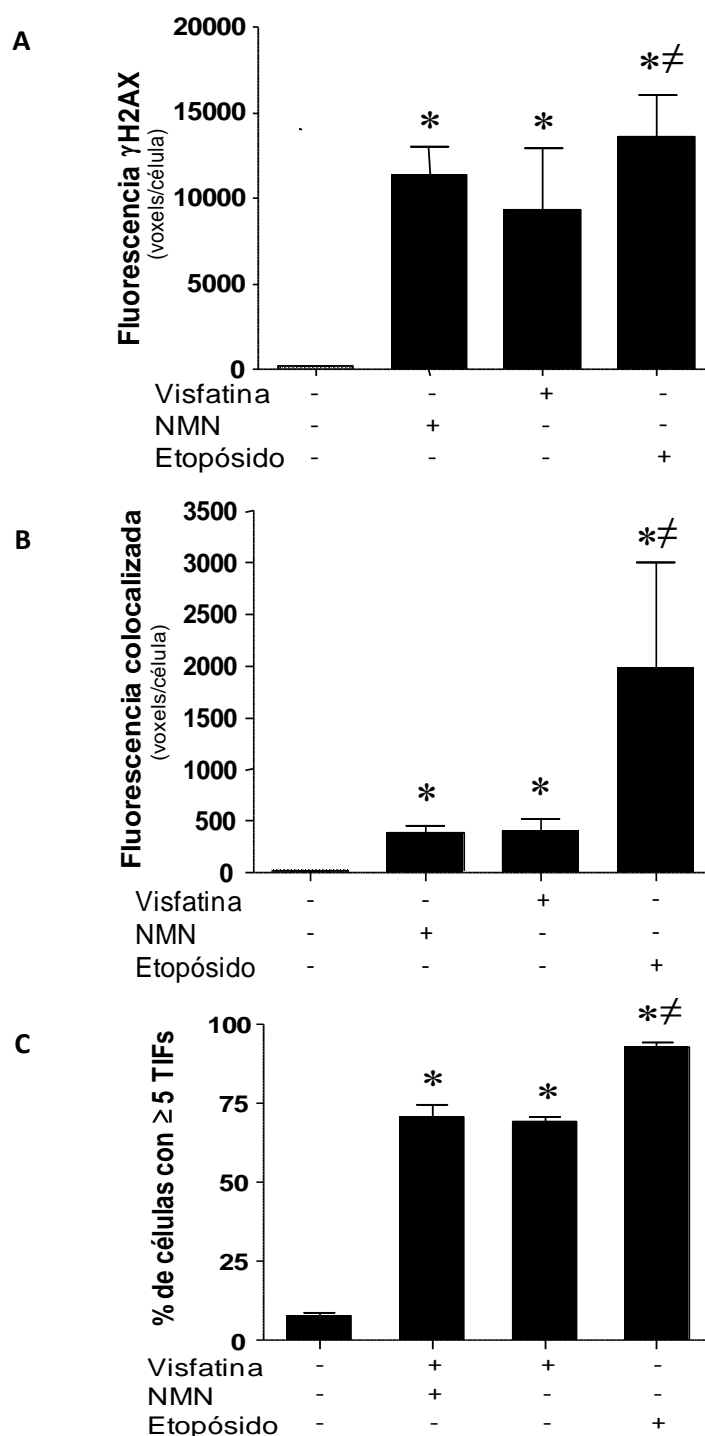


Fig. 53. (B y C) Cuantificación de γ H2AX y TIFs expresados como una media de la fluorescencia en voxels/ célula. **(D)** Cuantificación de TIFs expresados como el porcentaje de células con ≥ 5 TIFs/célula. Los datos representan la media de 3 experimentos con >250 células cuantificadas en cada caso ($\neq p < 0.05$ frente a visfatina 50 ng/ml $*p < 0.05$ frente a condiciones basales).

A

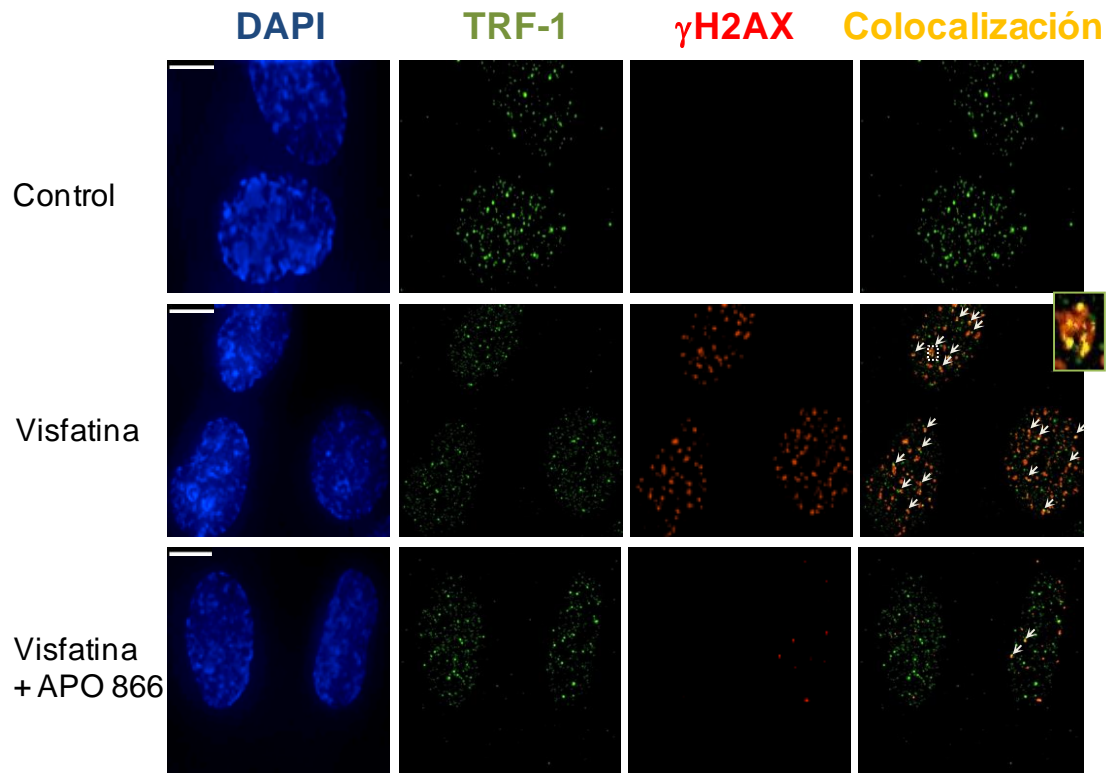


Fig. 54. El inhibidor de la actividad enzimática Nampt, el APO866, evita el daño en el ADN y la disfunción telomérica inducida por visfatina. Las HUVEC fueron preincubadas con APO866 (10 μ M) y estimuladas con visfatina (50 ng/ml) **(A)** Tras 24 h se realizó una doble tinción de inmunofluorescencia con un anticuerpo contra γ H2AX (rojo), TRF-1 (verde) y el núcleo fue contrateñido con DAPI (azul). Las flechas en las imágenes mezcladas señalan los puntos de colocalización (TIFs). En el pequeño panel de la derecha se muestra una imagen ampliada de los puntos de colocalización. 1400X.

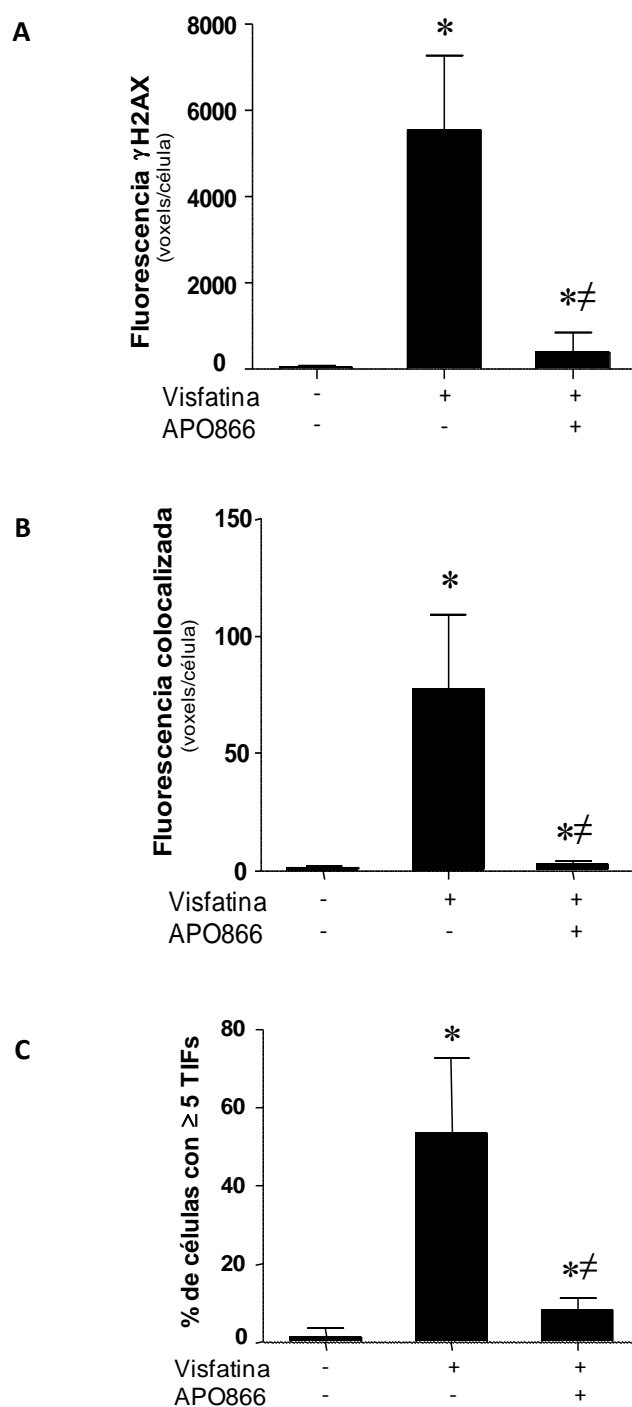


Fig. 54. (B y C) Cuantificación de γ H2AX y TIFs expresados como una media de la fluorescencia en voxels/ célula. **(D)** Cuantificación de TIFs expresados como el porcentaje de células con ≥ 5 TIFs/célula. Los datos representan la media de 3 experimentos con >250 células cuantificadas en cada caso ($\neq p < 0.05$ frente a visfatina 50 ng/ml $*p < 0.05$ frente a condiciones basales).

5.5 La visfatina induce senescencia mediante la activación del enzima NADPH oxidasa.

Después de identificar que la visfatina induce senescencia a través de su actividad Nampt, se exploró si la enzima NADPH oxidasa estaba implicada en dicho proceso. Datos previos de nuestro grupo de investigación han demostrado la capacidad de la visfatina para inducir la actividad de la NADPH oxidasa en HUVEC (Vallejo y Romacho et al, 2011). Para tal fin, se incubaron las HUVEC con el inhibidor de la NADPH oxidasa, apocinina (30 μ M), y posteriormente se estimularon con visfatina (50 ng/ml) durante 24 h. A continuación se observó que la visfatina indujo la senescencia de manera significativa respecto al cultivo basal (Fig. 55), dicho incremento se redujo significativamente cuando las células se co-incubaron con apocinina (Fig. 55). La apocinina por si misma no modificó el número de células senescentes en comparación con las condiciones basales (Fig. 55).

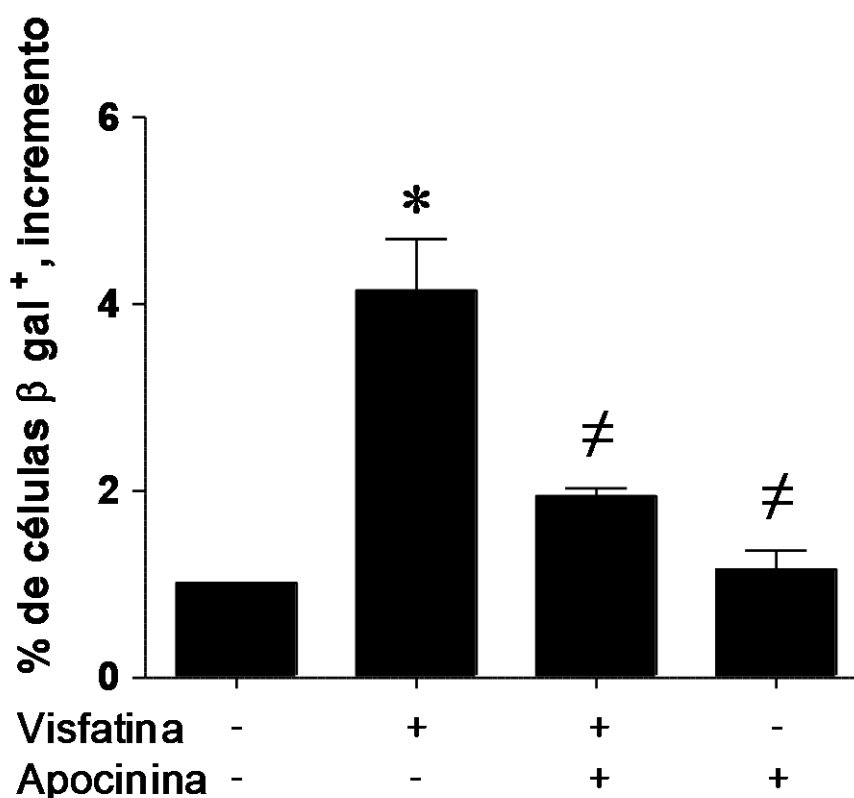


Fig. 55. La visfatina induce senescencia mediante la activación de la enzima NADPH oxidasa. Las HUVEC fueron preincubadas con apocinina (30 μ M) y estimuladas con visfatina (50 ng/ml). Tras 24 h se realizó una tinción de SA- β -gal y un recuento de células senescentes. Los resultados representan la media \pm EEM seis experimentos independientes y se expresan como porcentaje del efecto inducido respecto al control ($\neq p < 0.05$ frente a visfatina 50 ng/ml * $p < 0.05$ frente a condiciones basales).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La Ang-(1-7) es un heptapéptido del SRA que actualmente se conoce como un componente biológicamente activo de este sistema (Höcht et al., 2009) y es considerado un antagonista fisiológico de la Ang II, pudiendo contrarrestar alguna de sus acciones deletéreas. A nivel cardiovascular se han reportado múltiples acciones benéficas de la Ang-(1-7) como: la disminución del remodelado cardiaco por decremento de la hipertrofia y fibrosis (Grobe et al., 2007), un efecto antitrombótico ó un efecto antiproliferativo al inhibir el crecimiento del músculo liso vascular (Kucharewicz et al., 2000; Freeman et al., 1996). Así mismo, una de las principales acciones de la Ang-(1-7) es su efecto vasodilatador, debido a la estimulación endotelial de la liberación de NO y/o PGI₂, lo cual se ha demostrado en arterias tanto de modelos animales (Schindler et al., 2007; Feterik et al., 2000; Santos et al., 2013; Osei et al., 1993; Peiró et al., 2007; Peiró et al., 2013) como humanas (Ueda et al., 2000 y 2001) en las que se observó que redujo la vasoconstricción mediada por Ang II mejorando la disfunción endotelial (Schindler et al., 2007).

Estas acciones beneficiosas de la Ang-(1-7), se han relacionado con una reducción del depósito de lípidos y engrosamiento de la íntima de aortas en modelos de ratones deficientes en ApoE que llevó a una disminución en la progresión de lesiones ateroscleróticas asociada a un mejoramiento de la función endotelial, dichos efectos fueron abolidos por antagonistas del receptor Mas y AT₂ (Tesanovic et al., 2010). A nivel renal la Ang-(1-7) se ha relacionado con un efecto protector al revertir el daño y la disfunción endotelial renal en modelos de ratones diabéticos tipo 2 (Moon et al., 2011; Benter et al., 2008) y en ratones deficientes a ApoE (Stegbauer et al., 2011). Recientemente también se involucró la activación del eje Ang-(1-7)/receptor Mas con una disminución en la adipogénesis (Than et al., 2013), con mejora de la tolerancia a la glucosa (Liu et al., 2012) y de la disfunción endotelial asociada a la obesidad (Beyer et al., 2013) así como pérdida de peso y disminución de hipertrigliceridemia (Marcus et al., 2013). Estas observaciones también sitúan a este péptido como una agente protector en el contexto de las enfermedades metabólicas como la obesidad.

Ang-(1-7), receptor Mas e inhibición de la inducción de iNOS por estímulos inflamatorios dependientes e independientes del SRA en el músculo liso vascular humano.

Aunque existe un número relativamente importante de trabajos explorando el papel vasoactivo de la Ang-(1-7), se sabe poco sobre su capacidad para contrarrestar la acción de agentes inflamatorios a nivel vascular. Por ello, en el presente estudio se emplearon dos moléculas con propiedades inflamatorias sobre las células vasculares humanas como son la Ang II y la citoquina IL-1 β y se estudió la capacidad de la Ang-(1-7) para contrarrestar el efecto de ambas moléculas inflamatorias.

Así la Ang II se eligió por ser el principal componente del SRA, al que pertenece también la Ang-(1-7), y ser bien conocida por sus propiedades inflamatorias vasculares como hipertensión arterial o arterosclerosis, tal y como se ha mencionado con anterioridad (Sata y Fukuda, 2010). Por otra parte, se eligió la IL-1 β como una citoquina proinflamatoria independiente de SRA, con el fin de saber si la posible acción antiinflamatoria de la Ang-(1-7) podría ir más allá de este sistema y, por tanto, actuar como una molécula antiinflamatoria con carácter más general. La familia IL-1 comprende 11 miembros entre los cuales destacan la IL-1 α , IL-1 β y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra) (Sims y Smith, 2010). Tanto IL-1 α como IL-1 β se unen al receptor IL-1R tipo I (IL-1RI) asociado a la proteína accesoria del receptor IL-1 (IL-1RAcP) formando un complejo que traduce las señales responsables de mediar las acciones de IL-1, por lo que IL-1 α e IL-1 β inducen señalizaciones similares (Kopf et al., 2010). IL-1 activa una serie de acciones que permiten la fosforilación de I κ B, lo que provoca la traslocación al núcleo y la activación de NF- κ B, que modula la transcripción de genes y la expresión de quimioquinas, citoquinas proinflamatorias, moléculas de adhesión y factores estimulantes de colonias (Bujak y Frangogiannis, 2009). IL-1Ra es un inhibidor secretado endógenamente que compite con IL-1 α e IL-1 β para unirse al receptor IL-1RI, lo que imposibilita que reclute a IL-1RAcP lo que inhibe la acción de ambas citoquinas manteniendo la homeostasis de los tejidos (Dinarello, 2000). En la actualidad, se han desarrollado fármacos biológicos con acción antiinflamatoria, como en el caso de la anakinra, que es un análogo recombinante del IL-1Ra humano (Fearon y Fearon, 2008). Cabe destacar que se ha detectado una alta expresión de IL-1 β se identificó en el endotelio de vasos ateroscleróticos (Ross et al., 1999). También se han determinado niveles elevados de ARNm de IL-1 β en arterias ateroscleróticas y un decremento en los niveles de un polimorfismo conocido por

incrementar la expresión de IL-1Ra en placas ateroscleróticas humanas (Olofsson et al., 2009). En ratones deficientes a ApoE e IL-1 β se redujo el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en un 33% lo que se asoció a una disminución de la expresión de VCAM-1 y MCP-1 (Kirii et al., 2003).

Como marcador de inflamación en el músculo liso humano en cultivo, utilizamos en primer lugar la inducción de la enzima iNOS cuya sobreexpresión se relaciona con el daño vascular. Anteriormente mencionamos que el NO es sintetizado a partir de la L-arginina por las distintas isoformas de NOS: de las cuales dos son constitutivas (nNOS y eNOS) y una isoforma inducible (iNOS). Esta última isoforma se expresa en respuesta a factores inflamatorios como citoquinas y endotoxinas. El factor de transcripción NF- κ B está involucrado en la expresión de iNOS inducida por citoquinas (Forstermann et al., 1995; Alderton et al., 2001; Huang, 2009). Como hemos indicado anteriormente la producción sostenida de NO por parte de iNOS ejerce un efecto deletéreo, cuando el NO reacciona con el O₂⁻ formando ONOO⁻ (Vásquez-Vivar, 2009). Este radical difunde rápidamente y puede alterar las proteínas por nitración de los residuos de tirosina y lipoxidación de los lípidos (Koppenol et al., 1992)

La sobreexpresión de iNOS ha sido identificada en placas ateroscleróticas humanas, en tanto que en arterías coronarias con aterosclerosis, se identificó la presencia de COX-2 (en macrófagos y células espumosas) e iNOS (macrófagos y células de músculo liso), la presencia de nitrotirosina (una medida indirecta de la producción de ONOO⁻) colocalizó con iNOS y COX-2 en los macrófagos (Baker et al., 1999). Además la expresión de iNOS ha sido relacionada con la inestabilidad de la placa aterosclerótica y formación de trombos en pacientes con síndromes coronarios agudos (Depre et al., 1999). Por otra parte, los niveles TNF- α , IFN- γ , IL-1 β y la IL-6 se encuentran elevados en el tejido adiposo en ratones obesos, lo que sugiere que estos mediadores pueden en conjunto desencadenar la expresión de iNOS (Perreault y Marete, 2001). Varios estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han sugerido una relación entre la sobreexpresión de iNOS y obesidad; así, en ratones obesos se observó un incremento de la expresión de iNOS y de la producción de NO en la aorta así como un empeoramiento de la relajación a Ach, en tanto que en ratones obesos knockout para iNOS se previno la resistencia a insulina (Noronha et al., 2005). Además se ha reportado la inducción de iNOS en el tejido adiposo y esquelético en ratones obesos (Perreault y Marete, 2001), así como una expresión alta de ARNm en los islotes

pancreáticos (Shimabukuro et al., 1997) y el corazón de modelos de ratas obesas (Zhou et al., 2000).

En este trabajo de investigación, se pudo observar que las CMLAH estimuladas con Ang II ó IL-1 β presentaban una clara inducción de la iNOS. La expresión de iNOS, COX-2 y fosfolipasa A₂ son reguladas por IL-1 β (Bujak y Frangogiannis, 2009). En células de músculo liso vascular se observó que es necesaria la activación sostenida de ERK para que la IL-1 β pudiera activar persistentemente a NF- κ B y aumentar la expresión de iNOS y COX-2 (Jiang et al., 2004a). La inducción de la expresión de iNOS por Ang II se ha documentado tanto *in vivo* como *in vitro*. En HUVECs se demostró que la Ang II induce la expresión de los niveles de ARNm de iNOS a través del receptor AT₁, en un mecanismo mediado por NF- κ B (Yang et al., 2006). En modelos de ratas transgénicas que sobreexpresan Ang II, se determinó un aumento de los niveles de expresión de iNOS y de estrés oxidativo en el corazón y riñones (Theuer et al., 2005, Sun et al., 2009). En otros estudios en células de músculo liso de aorta de rata y en ratones deficientes en Apo E, se observó que la co-incubación de IL-1 β con Ang II inhibe la inducción de iNOS causada por IL-1 β , debido a que la Ang II atenúa la inducción prolongada de ERK y NF- κ B en un mecanismo que involucra a p38MAK (Jiang et al., 2004b; Xu et al., 2011).

Utilizando losartán y anakinra, se pudo comprobar que el efecto de la Ang II estaba mediado por el receptor AT₁ mientras que el efecto de la IL-1 β se debía a la activación del receptor IL-1RI, tal y como cabía de esperar en ambos casos. Además se comprobó que la Ang-(1-7) era capaz de atenuar de manera dependiente de la concentración la inducción de la iNOS así como la producción de NO por parte de la Ang II, actuando una vez mas la Ang-(1-7) como antagonista fisiológico de la Ang II. Pero además cabe resaltar que la Ang-(1-7) fue capaz de reducir significativamente, la inducción de iNOS por una molécula inflamatoria no relacionada con el SRA, como es la IL-1 β . Esta observación pone de manifiesto que la Ang-(1-7) puede comportarse como una molécula antiinflamatoria más allá del SRA.

En presencia de los antagonistas competitivos del receptor Mas, el A779 y el D-Pro⁷-Ang-(1-7), la Ang-(1-7) perdió su capacidad antiinflamatoria indicando que su acción estaba mediada por el receptor Mas. En cuanto a los receptores implicados en la acción de la Ang-(1-7), se sabe que este heptapéptido, ejerce sus acciones biológicas fundamentalmente a través de su unión al receptor metabotrópico Mas acoplado a proteína G (Kostenis et al., 2005), aunque también se ha propuesto que

puede interactuar en menor medida y afinidad con el receptor AT₁ y AT₂ (Santos et al., 2003). También existen trabajos que relacionan la respuesta mediada por Ang-(1-7) con un aumento de la producción de quininas y la consecuente estimulación del receptor de BK B₂ en células endoteliales de aorta bovina (Heitsch et al., 2001). La delección genética del receptor Mas provoca un daño en la función cardiaca y favorece un estado profibrótico (Santos et al., 2006). Conjuntamente el bloqueo de este receptor abolió los efectos antihipertróficos de la Ang-(1-7) en cardiomiocitos (Tallant et al., 2005). Por lo que se ha establecido que el receptor Mas podría tener un importante papel en la regulación de la función cardiaca (Castro et al., 2010). El bloqueo farmacológico o la delección genética del receptor Mas también abole la relajación dependiente de endotelio mediada por Ang-(1-7) (Peiró et al., 2007; Peiró et al., 2013; Lemos et al., 2005; Santos et al., 2003). No solo eso, el bloqueo del receptor Mas impide la correcta relajación vascular en respuesta a vasodilatadores independientes de SRA como la BK o la Ach, por lo que probablemente juega un papel más allá de su interacción con la Ang-(1-7), lo cual ha sido previamente demostrado por nuestro grupo de investigación (Peiró et al., 2007; Peiró et al., 2013).

Recientemente se demostró que este receptor se internaliza en vesículas intracelulares después de ser estimulado por Ang-(1-7), lo que causaría su desensibilización (Gironacci et al., 2011). La estructura química de la Ang-(1-7) incluye la siguiente secuencia de aminoácidos: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro (Schindler et al., 2007). Se han identificado dos antagonistas del receptor Mas que contrarrestan las acciones de la Ang-(1-7): el A779 (Santos et al., 1994) y el D-Pro⁷-Ang-(1-7) (Santos et al., 2003), que presentan las siguientes estructuras: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-D-Ala y Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-D-Pro, respectivamente. Lo anterior sugiere que ambos antagonistas comparten una conformación similar a la Ang-(1-7), difiriendo únicamente en el último aminoácido, por lo que se ha demostrado que ambos compuestos antagonizan selectivamente las acciones mediadas por la Ang-(1-7). A este respecto, el tratamiento con A779 revirtió el efecto antiarrítmico (Ferreira et al., 2001) y el efecto antitrombótico de la Ang-(1-7) (Kucharewicz et al., 2002). Además A779 disminuyó la vasodilatación causada por la Ang-(1-7) en el riñón, el mesenterio y la piel (Sampaio et al., 2003). Por su parte el D-Pro⁷-Ang-(1-7) abolió el efecto antidiurético y la relajación dependiente de endotelio en anillos aórticos de ratón causados por la Ang-(1-7) (Santos et al., 2003). Algunos autores defienden que cada antagonista bloquea un subtipo distinto de receptor Mas, al observarse en aorta de rata una abolición de la vasodilatación mediada por Ang-(1-7) en presencia del D-Pro⁷-Ang-(1-7) pero no del

A779 (Silva et al., 2007). Sin embargo, otros estudios, incluidos los de nuestro grupo, no parecen indicar la existencia de varios subtipos de Mas, al menos en el lecho vascular mesentérico de ratón (Peiró et al., 2013; Lemos et al., 2005). En esta investigación se demostró que el bloqueo del receptor Mas tanto por A779 como por D-Pro⁷-Ang-(1-7) abolió por completo y de manera similar, la expresión de iNOS, la liberación de nitritos y la actividad de la enzima NADPH oxidasa no solo con Ang II si no también con IL-1 β . Lo anterior nos indicó el efecto antiinflamatorio de la Ang-(1-7) en CMLAH solo está mediado por el receptor Mas, descartando la interacción de este heptapéptido con un subtipo de receptor Mas.

En concordancia con nuestros resultados, la administración de Ang-(1-7) en modelos de oclusión cerebral arterial permanente disminuyó los niveles de estrés oxidativo, de citoquinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1 β) y de la enzima COX-2 (Jiang et al., 2012) así como de los niveles de expresión de ARNm de iNOS en la corteza cerebral y de TNF- α e IL-1 β en modelos de isquemia cerebral inducidos por endotelina-1, en acciones mediadas por el receptor Mas (Mecca et al., 2011; Regenhardt et al., 2013). En modelos de artritis la Ang-(1-7) y el AVE 0991, vía receptor Mas, disminuyeron la acumulación de neutrófilos, hipernocicepción y la producción de TNF- α , IL-1 β y CXCL1 (Da silveira et al., 2010). Además en ratas que sobreexpresaban Ang-(1-7) sometidas a una dieta alta en grasas, se observó un menor peso y una disminución de los niveles de IL-1 β y COX-2 en el tejido adiposo así como un incremento de colesterol HDL (Santos et al., 2012).

En estudios recientes se ha postulado que además del eje Ang-(1-7)/Mas, la ECA 2 pueden tener una influencia protectora en la aterosclerosis La ECA 2 es la enzima que principalmente cataliza la generación de Ang-(1-7) a partir de Ang II. En este respecto, el telmisartan (ARA) activó el eje ECA 2/Ang-(1-7)/Mas y potenció sus efectos antininflamatorios, lo que generó una reducción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-6 así como un aumento de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Sukumaran et al., 2012). La activación del eje ECA 2/Ang-(1-7)/Mas atenuó la hipertensión cardiaca y pulmonar inducida por Ang II, al disminuir los niveles de ARNm de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Sriramula et al., 2011; Shenoy et al., 2010). Adicionalmente la Ang-(1-7) disminuyó la inducción de iNOS y la expresión de nitrotirosina causada por Ang II en ratones con diabetes tipo 2 (Moon et al., 2011).

Curiosamente y de manera contraria a los resultados obtenidos por otros autores, en modelos de insuficiencia renal en ratones la deficiencia del receptor Mas disminuyó el daño en tanto que la infusión de Ang-(1-7) agravó la respuesta inflamatoria. Debido a que la Ang-(1-7) aumentó el número de leucocitos, la activación del NF- κ B y la expresión de citoquinas inflamatorias (Esteban et al., 2009). Adicionalmente, en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), la infusión con Ang-(1-7) no disminuyó la expresión de iNOS pero si aumentó los niveles de expresión de eNOS (Costa et al., 2010).

Aún así, de los datos obtenidos en este estudio y de acuerdo con otros estudios podemos concluir que la Ang-(1-7) a través del receptor Mas y de manera concentración dependiente, disminuye la inflamación inducida por la Ang II y la IL-1 β . Por lo tanto, la Ang-(1-7) sería una molécula con acción antiinflamatoria vascular, que no sólo contrarrestaría la acción antiinflamatoria de la Ang II sino también de otras moléculas inflamatorias independientes del SRA. Asimismo en este trabajo de investigación se describe por primera vez el efecto de la Ang-(1-7) como antagonista de una molécula inflamatoria más allá de la Ang II.

La Ang-(1-7) previene la inducción de iNOS por estímulos inflamatorios dependientes e independientes del SRA en el músculo liso vascular humano al inhibir la activación de la NADPH oxidasa y NF- κ B.

Establecido lo anterior, se buscó identificar los mecanismo de señalización por medio del cual la Ang-(1-7) podría llevar a cabo su acción antiinflamatoria. Para ello nos centramos en la NADPH oxidasa, una enzima relacionada con la inflamación vascular que constituye la principal fuente de O₂ en la pared de los vasos sanguíneos, tal y como se ha visto con anterioridad (Griendling, 2000; Rajagopalan et al., 1996; Touyz et al., 2002; Touyz y Schiffrin, 2001). La generación de ROS por esta enzima activa una amplia variedad de señales intracelulares cuya sobreexpresión da por resultado disfunción endotelial, proliferación de células vasculares de músculo liso, expresión de genes proinflamatorios y la reconstrucción de la matriz extracelular (Cai et al., 2003). Además se ha determinado *in vivo* que una deficiencia de la isoforma Nox4 provocó un aumento de tejido adiposo, resistencia a insulina y susceptibilidad de ganancia de peso en ratones (Li et al., 2012).

En el presente trabajo, los cultivos de CMLAH se trataron con el inhibidor selectivo de la NADPH oxidasa, la apocinina. Cabe mencionar la apocinina es activada

por H₂O₂ y las metaproteinasas para formar un radical activo y su mecanismo de acción es el bloqueo de la traslocación del componente p47phox, evitando el ensamblaje del complejo enzimático (Stefanska y Pawliczak, 2008). El bloqueo con apocinina disminuyó significativamente tanto la expresión de iNOS como los niveles de nitritos del sobrenadante celular inducidos tanto por Ang II como por IL-1 β , indicando una importante participación de la NADPH oxidasa en la inducción de iNOS por ambas moléculas. De hecho, cuando se determinó la actividad de la enzima NADPH oxidasa por el método de quimioluminiscencia, se observó que tanto la Ang II y la IL-1 β aumentaron la actividad de esta enzima.

En concordancia con esta observación, Kaur y colaboradores determinaron que la IL-1 β aumentaba la actividad de la NADPH oxidasa en células de músculo liso de arterias coronarias humanas y la producción de especies reactivas de oxígeno (Kaur et al., 2002). También se ha determinado que la IL-1 β aumenta la expresión de la subunidad p22phox y la producción de anión superóxido en arterias de resistencia (Jiménez-Altayó et al., 2006). También de manera semejante a los resultados obtenidos, se ha demostrado que concentraciones fisiopatológicas relevantes de Ang II aumenta la actividad de la NADPH oxidasa en células de músculo liso vascular de rata (Griendling et al., 1994).

Por otra parte, la disminución de la inducción de iNOS por apocinina en los cultivos de CMLAH coincidió cuantitativamente con la observada cuando las células fueron tratadas con Ang-(1-7). Asimismo, se determinó que la actividad NADPH oxidasa inducida por Ang II e IL-1 β en CMLAH se redujo marcadamente en presencia de Ang-(1-7).

De con estas observaciones, se ha demostrado que la ECA 2 a través de un mecanismo implicado con la acción de la Ang-(1-7), puede atenuar la inducción de la NADPH oxidasa y por lo tanto la producción de especies reactivas de oxígeno (Lovren et al., 2008) en ratones con delección de ECA 2 y en células endoteliales. En ratones deficientes de ECA 2 se observó que la Ang II indujo un aumento de ARNm de citoquinas inflamatorias (como la IL-1 β) y quimioquinas, lo que se asoció con el aumento de peróxido producido por la NADPH oxidasa y la activación de la vía Akt-ERK-eNOS; además que se observó una reducción en plasma de los niveles de Ang-(1-7) en comparación con los controles (Jin et al., 2012).

Asimismo, en células glomerulares y mesangiales de modelos de ratones diabéticos tipo 2, la Ang-(1-7) atenuó la inducción de la NADPH oxidasa y el aumento de la subunidad p47phox causada por Ang II, en una acción mediada por el receptor Mas (Moon et al., 2011). En células endoteliales, la Ang-(1-7), vía receptor Mas, inhibió la fosforilación de c-Src y ERK 1/2 y la actividad de la NADPH oxidasa estimulada por Ang II (Sampaio et al., 2007b). Además la Ang-(1-7) disminuyó los niveles elevados de actividad de la NADPH oxidasa y atenuó la activación la expresión de ARNm de Nox4 en el riñón de ratas diabéticas SHR, mejorando la disfunción endotelial de la arteria renal (Benter et al., 2008). En adipocitos la activación del eje Ang-(1-7)/Mas disminuyó los niveles de ARNm de la NADPH oxidasa, mejoró el metabolismo de la glucosa e indujo la expresión de adiponectina (Liu et al., 2012). La delección del receptor Mas en ratones aumentó la expresión de la subunidad gp91phox de la NADPH oxidasa y la disfunción endotelial (Xu et al., 2008). En tanto que la delección de ECA 2 incrementó la expresión de Ang II y la activación de p47phox y por lo tanto de la NADPH oxidasa; mientras que la infusión de Ang-(1-7) disminuyó la actividad de la enzima (Bodiga et al., 2011). En relación a esto, en el núcleo renal la activación del eje ECA 2/Mas disminuyó la actividad de la vía Ang II/AT₁ en la generación de ROS derivadas de la NADPH oxidasa (Gwathmey et al., 2010). En un modelo de síndrome metabólico la infusión crónica de Ang-(1-7) en el tejido adiposo blanco, disminuyó la actividad de la NADPH oxidasa y mejoró la resistencia a insulina (Marcus et al., 2013); en tanto que en un modelo de obesidad, la administración de Ang-(1-7) mejoró la función endotelial y disminuyó la expresión de las subunidades p22phox y p47phox de la enzima NADPH oxidasa (Beyer et al., 2013).

En las CMLAH utilizadas en el presente estudio la inhibición de la actividad NADPH oxidasa inducida por Ang-(1-7) se abolió al antagonizar farmacológicamente el receptor Mas. Diversos autores han reportado que el efecto de la Ang-(1-7) sobre la NADPH oxidasa es mediado por el receptor Mas (Sampaio et al., 2007b; Liu et al., 2012; Xu et al., 2008; Gwathmey et al., 2010). Contrariamente a los resultados obtenidos, en aorta de rata la Ang-(1-7) bloqueó la producción de O₂ generada por Ang II, a través de un mecanismo que involucró al receptor AT₁ y no al receptor Mas ni a la enzima NADPH oxidasa (Polizio et al., 2007). Conjuntamente en un modelo de isquemia reperfundida, se observó que a concentraciones farmacológicas la Ang-(1-7) aumentó la expresión de receptores AT₁ y a través de este receptor, produjo un aumento de la actividad de NADPH oxidasa en el corazón. En tanto que en condiciones no isquémicas la Ang-(1-7) no tuvo ningún efecto sobre esta enzima

(Oudot et al., 2005). Otro estudio sugiere que la Ang-(1-7) estimula el estrés oxidativo en el riñón de rata (Gonzales et al., 2002).

Puesto que las acciones inflamatorias de Ang II e IL-1 β , están mediadas por la activación del factor de transcripción NF- κ B, se decidió explorar también el papel de la Ang-(1-7) sobre la inducción de este factor en las CMLAH. En los resultados obtenidos indicaron que el inhibidor de NF- κ B, PDTC, abolió por completo la expresión de iNOS causada por Ang II e IL-1 β , indicando la implicación de este factor de transcripción en la respuesta inflamatoria a ambas moléculas. De hecho, empleando la técnica de EMSA, se confirmó la capacidad de la Ang II e IL-1 β para inducir la translocación nuclear del factor NF- κ B y su unión a secuencias específicas de ADN. Además se comprobó que la incubación de estas moléculas con apocinina y PDTC disminuyó la activación del factor de transcripción, lo cual por una parte confirmó la validez de PDTC como inhibidor de NF- κ B y, por otra, indicó que la NADPH oxidasa es necesaria para la activación de NF- κ B tanto por Ang II como por IL-1 β en las CMLAH.

Por otra parte, la co-incubación con Ang-(1-7) demostró la capacidad de este heptapéptido para reducir la inducción de NF- κ B provocada por Ang II e IL-1 β . Este efecto de la Ang-(1-7) era dependiente de la activación del receptor Mas, ya que se abolió en presencia de antagonistas competitivos de dicho receptor. En este contexto, existen muchas evidencias que relacionan la activación de NF- κ B con la respuesta inflamatoria, el crecimiento celular y la apoptosis, lo que lo vincula con enfermedades con un contenido inflamatorio. Las citoquinas proinflamatorias y quimioquinas entre las que se incluyen el TNF- α , IL-1 (IL-1 β), IL-6, el lipopolisacárido, ROS y la Ang II son inductores de NF- κ B (Li y Zhou, 2008). En relación y concordancia con nuestros resultados, en un modelo de hipertensión severa asociada con nefropatía y resistencia a insulina en ratas, la infusión de Ang-(1-7) redujo los niveles de TNF- α e IL-6 y de NF- κ B (Giani et al., 2011). En modelos de ratas diabéticas SHR e isquemia cardiaca, la administración de Ang-(1-7) disminuyó la actividad de NF- κ B y la expresión de citoquinas como IL-6 e IL-1 β y de Ang II, lo que sugiere un efecto cardioprotector de la Ang-(1-7), lo cual fue revertido por el A779 (Al-Maghrebi et al., 2009). La activación del eje Ang-(1-7)/Mas atenuó la activación de NF- κ B y la activación de MAPK generada por Ang II en células mesangiales, disminuyendo el daño renal (Moon et al., 2011). Conjuntamente la infusión de Ang-(1-7), a través del receptor Mas, en modelos de isquemia cerebral en ratas suprimió la activación de NF- κ B, la expresión de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , y los niveles de estrés oxidativo (Jiang et al., 2012).

Por otra parte, en modelos murinos de asma el eje Ang-(1-7)/Mas, disminuyó la fosforilación de ERK1/2 e IκB-α lo que disminuyó a su vez la activación de NF-κB (El-Hashim et al., 2012). En un modelo de síndrome metabólico el tratamiento crónico con Ang-(1-7) provocó una atenuación de la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo blanco que se asoció con una reducción de los niveles de la proteína pP65 en el tejido adiposo epididimal, lo que generó una menor activación de NF-κB (Marcus et al., 2013). Por otra parte, y de manera contraria a estas evidencias, en el riñón la Ang-(1-7) exhibió propiedades proinflamatorias, vía receptor Mas, a través del estimulación de NF-κB y de la sobreexpresión de mediadores inflamatorios como MCP-1 e IL-6 (Esteban et al., 2009).

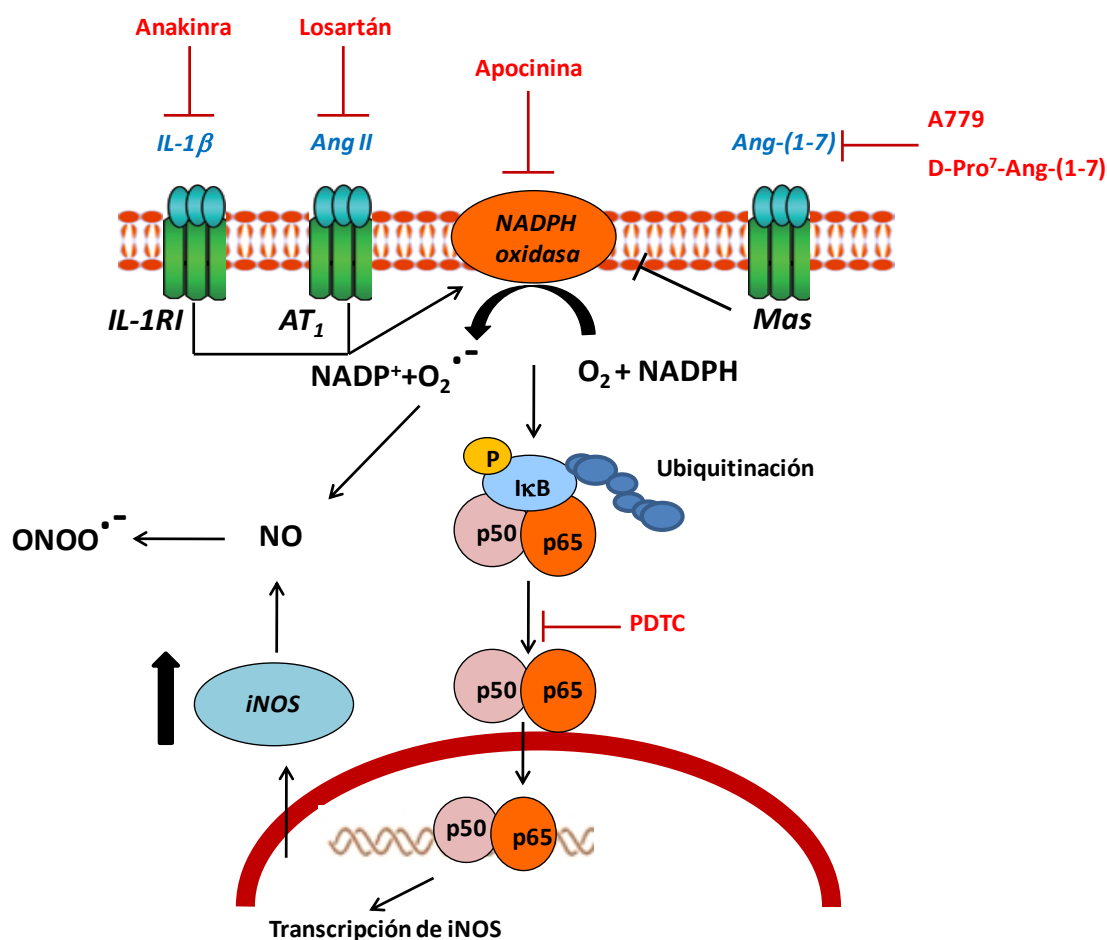


Fig. 56. Esquema resumen de la actividad antiinflamatoria de la Ang-(1-7) a través del receptor Mas sobre las CMLAH. La Ang-(1-7), a través de la unión al receptor Mas, disminuye las acciones deletéreas de la Ang II e IL-1β mediante la atenuación de la enzima NADPH oxidasa y el factor de transcripción NF-κB; lo que genera una disminución de la expresión de iNOS y la liberación de NO.

De todo lo anterior podemos concluir, que la Ang-(1-7) atenúa la activación de la NADPH oxidasa y NF- κ B y por lo tanto disminuye la expresión de iNOS y la liberación de NO inducida por Ang II e IL-1 β en CMLAH a través del receptor metabotrópico Mas. Estas acciones señalan a la Ang-(1-7) como una molécula potencialmente relevante en la modulación y prevención del estado inflamatorio vascular (Fig.56).

Ang-(1-7), receptor Mas e inhibición de la inducción de moléculas de adhesión celular por estímulos inflamatorios dependientes e independientes del SRA en el endotelio humano: papel de la NADPH oxidasa.

Una vez determinado el efecto antiinflamatorio de la Ang-(1-7) en el músculo liso vascular, quisimos comprobar si este heptapéptido era capaz de reducir la activación de las células endoteliales humanas en respuesta a estímulos relacionados directamente o no con el SRA. Para ello, se eligió como marcador de activación endotelial las moléculas de adhesión celular ICAM-1 y VCAM-1.

Tanto ICAM-1 como VCAM-1 pertenecen a la superfamilia de las inmonoglobulinas que comprenden a las moléculas de adhesión. Como hemos mencionado anteriormente, estas moléculas regulan la adhesión y la migración transendotelial de los leucocitos (Blake y Ridker, 2001). Los macrófagos y las células endoteliales producen ICAM-1 en respuesta a citoquinas inflamatorias como IL-1, TNF- α e IFN- γ (Davies et al., 1993); en tanto que VCAM-1 es producida por las células endoteliales y su expresión es regulada transcripcionalmente (Collins et al., 1995). La baja disponibilidad de NO puede llevar a la sobreexpresión de VCAM-1 en células endoteliales a través de la inducción de NF- κ B (Khan et al., 1996). También estas moléculas pueden aumentar su expresión por ROS, CRP, el ligando CD40, el receptor LOX-1 (Szmitko et al., 2003). La expresión de VCAM-1 antecede el reclutamiento de macrófagos y linfocitos-T en la placa de ateroma por lo que media el reclutamiento en las lesiones tempranas en modelos animales de aterogénesis (Cybulsky y Gimbrone, 1991). ICAM-1 se expresa en la vasculatura periférica y su expresión está implicada con lesiones ateroscleróticas maduras (Rao et al., 2007).

Una vez que la expresión de estas moléculas es activada y cumplen con su función, se liberan de la superficie de las células endoteliales y leucocitos y su nivel en plasma puede ser medido, lo que permite establecer una relación entre marcadores de

disfunción endotelial e inflamación vascular y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Puesto que estas moléculas están involucradas en las etapas iniciales de la aterogénesis, la determinación de sus valores en plasma ha ayudado a predecir el riesgo cardiovascular en pacientes sanos. Niveles elevados de VCAM-1 solubles pueden predecir el riesgo de muerte en pacientes con enfermedad arterial coronaria (Blankenberg et al., 2001) y diabetes tipo 2 (Stehouwer et al., 2002). Por otra parte los niveles de ICAM-1 en plasma de pacientes sanos predijeron el riesgo de enfermedad arterial periférica (Pradhan et al., 2002) e infarto al miocardio (Ridker et al., 1998). Además se ha observado un aumento de los niveles circulantes de VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina en pacientes obesos hipertensos y normotensos, que a su vez se relaciona con un aumento de LDL (Ferri et al., 1999). El aumento la concentración en plasma de VCAM-1 soluble también se ha correlacionado con la hipercolesterolemia en humanos (Hackman et al., 1996). En tanto que la adipocina, adiponectina conocida por su papel antiinflamatorio, disminuye la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina, atenuando la inducción de NF- κ B (Van Gaal et al., 2006).

En los resultados obtenidos en el presente estudio se observó que la Ang II estimuló la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1. Existen varios estudios que coinciden con nuestros resultados y demuestran que la Ang II, vía el receptor AT₁, induce la expresión de VCAM-1, ICAM-1 así como de E y P-selectina en células endoteliales y musculares lisas tanto *in vivo* como *in vitro* (Tummala et al., 1999; Pastore et al., 1999). En tanto que Pueyo y colaboradores, determinaron que la Ang II induce la producción de estrés oxidativo en las células endoteliales lo que estimula la degradación de I κ B y la activación de NF- κ B, que aumenta la expresión de VCAM-1 (Pueyo et al., 2000). Además se ha demostrado que la Ang II favorece el reclutamiento de leucocitos en las arteriolas y vénulas mesentéricas a través del incremento de la expresión de diferentes quimioquinas como MCP-1 (Mateo et al., 2006), mediado por la activación de TNF- α e IL-4 (Mateo et al., 2007).

Mientras que en las células estimuladas con IL-1 β también se observó un aumento de la expresión tanto de ICAM-1 como de VCAM-1 empleando el citómetro de flujo. Como es conocido la IL-1 β es una citoquina involucrada en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis. En las células de músculo liso la IL-1 β incrementó la adhesión de monocitos y neutrófilos mediante la inducción de ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina de una manera tiempo y concentración dependiente (Wang et al., 1995), dicho efecto fue inhibido por una elevación de los niveles de

AMPC, el cual puede regular factores de transcripción como NF- κ B (Braun et al., 1997). En HUVEC se determinó que la IL-1 β aumenta la expresión de estas moléculas mediante la activación de NF- κ B (Cobb et al., 1996).

Prosiguiendo con la hipótesis del trabajo las HUVEC estimuladas con Ang II e IL-1 β fueron coincubadas con Ang-(1-7), observándose una disminución de los niveles de expresión de ICAM-1 y VCAM-1. Además, el antagonista A779 abolió dicha acción de la Ang-(1-7), lo cual confirmó que también en las células endoteliales humanas la acción antiinflamatoria de la Ang-(1-7) era mediada por el receptor Mas. En concordancia con nuestros resultados, en HUVEC (línea celular EA.hy926) la Ang-(1-7), a través del receptor Mas, reguló la inducción de la expresión de VCAM-1 provocada por Ang II mediante la atenuación de la translocación al núcleo del NF- κ B (Zhang et al., 2013). Adicionalmente, en HUVECs la Ang-(1-7) inhibió la secreción de MCP-1 e ICAM-1 estimulada por Ang II, de una manera concentración dependiente (Liang et al., 2009). En otro estudio la Ang II, a través del receptor AT₁, aumentó la adhesión de monocitos en HUVECs, lo cual fue bloqueado por la Ang-(1-7) en una acción mediada por el receptor Mas (Thatcher et al., 2011).

Además se ha demostrado que una deficiencia genética de ECA 2, la enzima que convierte Ang II en Ang-(1-7), en ratones knockout para ApoE aumenta la inflamación vascular y la aterosclerosis, lo que se evidenció por un incremento de la expresión de VCAM-1, citoquinas (TNF α e IL-6) quimioquinas (MCP-1) y MMPs (Thomas et al., 2010). Puesto que una deficiencia de ECA 2 se ha relacionado con un aumento de la expresión de Ang II tanto en tejidos como en plasma, lo anterior indica que la regulación de esta enzima puede tener un papel en el desarrollo de aterosclerosis. En relación a lo anterior, en macrófagos de ratones deficientes en ECA 2 se incrementó la secreción de Ang II y se favoreció un aumento de la adhesión de monocitos a HUVEC (Thatcher et al., 2011), así como un aumento en la expresión de VCAM-1 y citoquinas como TNF- α , CCL2 e IL-6 (Thomas et al., 2010).

No hay hasta la fecha evidencias en la literatura que correlacionen la inducción de moléculas de adhesión por parte de la IL-1 β y el efecto de la Ang-(1-7). Sin embargo, se demostró que la administración de Ang-(1-7) o su análogo sintético AVE 0991, a través del receptor Mas, disminuyeron el rodamiento y la adhesión de leucocitos del endotelio microvascular a los sitios de inflamación en un modelo de artritis, lo cual a su vez se acompañó con una disminución de la expresión de IL-1 β y TNF- α (Da silveira et al., 2010). Lo que sugiere que la Ang-(1-7) podría bloquear la

expresión de la IL-1 β y por lo tanto sus acciones entre las que se encuentran el aumento de las moléculas de adhesión. En cualquier caso, los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que, también en células endoteliales, la Ang-(1-7) es una molécula capaz de regular a la baja la activación celular, actuando no sólo como antagonista fisiológico de la Ang II sino también de otras moléculas mediadoras de inflamación y no relacionadas directamente con el SRA. Esto sugiere que la Ang-(1-7) podría favorecer la disminución de la adhesión leucocitaria en la aterosclerosis posiblemente a través de la regulación de las moléculas de adhesión

En función de los resultados obtenidos, se determinó analizar el mecanismo por el cual la Ang-(1-7) podría disminuir la expresión de moléculas de adhesión celular en el endotelio humano. Hemos visto anteriormente que la NADPH oxidasa juega un importante papel en la reducción de la inflamación mediada por Ang-(1-7) en las CMLAH. Por ello, se decidió estudiar si esta enzima era también modulada por Ang-(1-7) en los cultivos de HUVEC. En este sentido, se observó en primer lugar que el inhibidor de la enzima NADPH oxidasa, apocinina, reducía la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducida tanto por Ang II como por IL-1 β . Por lo tanto se concluyó que la Ang II y la IL-1 β podrían inducir la expresión de las moléculas de adhesión por medio de la activación de la enzima NADPH oxidasa.

En efecto, la producción de ROS juega un papel importante en la regulación de la expresión de las moléculas de adhesión en la superficie celular, debido a que puede activar factores de transcripción como el NF- κ B y la sobreexpresión de ICAM-1 y VCAM-1 que contienen promotores que reconocen sitios para este factor de transcripción (Iademarco et al., 1992). Uno de esos mecanismos de producción de ROS en las células endoteliales lo constituye la enzima NADPH oxidasa que es una importante fuente intracelular de O₂⁻. De manera semejante a los resultados obtenidos, en células endoteliales de aorta humana, se determinó que el tratamiento con DPI (inhibidor de la NADPH oxidasa) inhibió la expresión de ARNm de VCAM-1 e ICAM-1 en respuesta a mediadores proinflamatorios como el TNF- α , IL-1 β y el lipopolisacárido (Tummala et al., 2000). En otros estudios en HUVECs estimuladas con TNF- α e IL-1 β , la incubación con PDTC (inhibidor de NF- κ B) y apocinina disminuyó la expresión de VCAM-1 (Weber et al., 1994; Marui et al., 1993).

Es conocido que la producción de ROS está involucrada en los efectos proinflamatorios de la Ang II en las células vasculares. En relación a esto y en concordancia con nuestros resultados, se demostró que la Ang II aumentó la actividad

de la NADPH oxidasa lo que contribuyó al aumento de la expresión de ICAM-1, filtración de leucocitos e hipertrofia vascular en ratas *in vivo*. Para ello se empleó un inhibidor de la subunidad gp91 de la NADPH oxidasa que fue coinfundido junto con la Ang II, lo que generó una reducción de la producción de $O_2^{\cdot-}$, (Liu et al., 2003). En otros experimentos el uso de apocinina por 14 días disminuyó la expresión endotelial de ICAM-1 y VCAM-1 en un modelo de remodelado arterial en conejo, además de reducir la producción de $O_2^{\cdot-}$ y mejorar la relajación dependiente de NO (Chan et al., 2007). Todo lo anterior confirma que la producción de $O_2^{\cdot-}$, por la NADPH oxidasa está involucrada en la expresión de las moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) provocada por la Ang II e IL-1 β en un mecanismo posiblemente mediado por NF- κ B, debido a que varias de las acciones mediadas por estos estímulos están relacionadas con la activación este factor de transcripción. A este respecto en estudios previos de nuestro grupo de investigación se determinó también que IL-1 β a través de la activación de eje ERK1/2/NF- κ B se incrementó la expresión de VCAM-1 pero de no ICAM-1 en HUVEC (Azcutia et al., 2010).

Por otra parte y aunque en el presente estudio no se pudo determinar directamente la inhibición de la actividad NADPH oxidasa por Ang-(1-7), existen diversos datos en la literatura científica que demuestran que este heptapéptido inhibe la generación de ROS por NADPH oxidasa en células endoteliales. Así, el eje Ang-(1-7)/receptor Mas regula negativamente al eje Ang II/AT₁ en HAEC causando una disminución de la actividad de la NADPH oxidasa y de la generación de ROS (Sampaio et al., 2007b). En base a estos estudios, cabe proponer que la Ang-(1-7) podría disminuir la inducción de moléculas de adhesión en HUVEC mediante la inhibición de la NADPH oxidasa, enzima que, como hemos visto anteriormente, es fundamental para la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducida tanto por Ang II como por IL-1 β . Son necesarios, sin embargo, algunos experimentos adicionales que demuestren en nuestros propios cultivos y condiciones experimentales que la Ang-(1-7) modula a la baja la actividad NADPH oxidasa (Fig. 57).

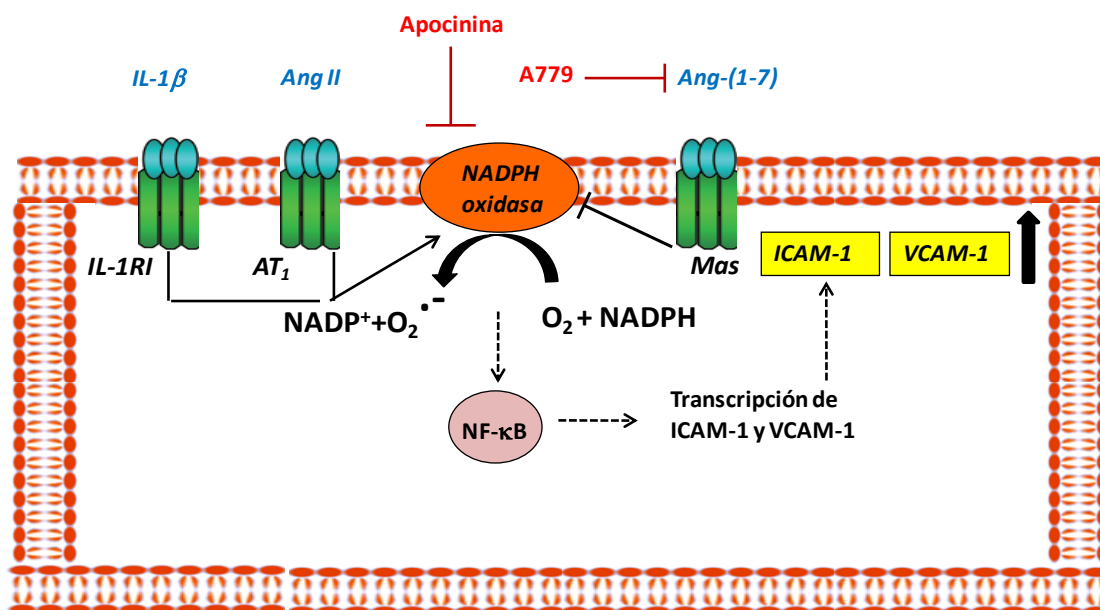


Fig. 57. Esquema resumen del mecanismo propuesto para la disminución de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 mediada por la Ang-(1-7) a través del receptor Mas sobre las HUVEC. La Ang-(1-7), a través de la unión al receptor Mas, disminuye la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 inducidas por la Ang II e IL-1β mediante la atenuación de la enzima NADPH oxidasa.

La Ang-(1-7) disminuye el daño en los telómeros y atenúa la senescencia inducida por Ang II e IL-1β a través del receptor Mas en HUVEC.

La senescencia se relaciona con una habilidad limitada de las células para dividirse que se asocia a una serie de cambios fenotípicos en la morfología y función celular además de la expresión de genes que pueden ser marcadores de dicho proceso (Campisi y D'Adda di Fagagna, 2007). Es conocido que el estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis y la producción incontrolada de ROS genera daños en las células endoteliales que pueden desencadenar senescencia (Chen y Goligorsky, 2006). Los ROS y la inflamación son factores que pueden ocasionar el acortamiento de los telómeros que se asocia a la senescencia replicativa (Allsopp et al., 1992). En tanto que la senescencia prematura inducida por diversos tipos de estrés, como el oxidativo, genera daño en el ADN de manera que puede ser independiente de los telómeros (Suzuki y Boothman, 2008). El fenotipo senescente en las células endoteliales se ha relacionado con el desarrollo de la disfunción endotelial caracterizada por una disminución de la producción de NO (Sato et al., 1993) y cambios en la expresión de eNOS (Matsushita et al., 2001). Además se ha detectado la presencia de células

endoteliales senescentes en sitios propensos al desarrollo de ateromas tanto en modelos humanos (Minamino et al., 2002 y 2003) como de animales (Fenton et al., 2001). Aunado a esto, se determinó que el aumento de la senescencia endotelial en placas ateroscleróticas es favorecido por un incremento de ROS, lo que sugiere su implicación en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares asociadas a la senescencia (Voghel et al., 2007). Como se ha mencionado la senescencia se asocia a daño en el ADN y, en relación a esto, en placas ateroscleróticas humanas se observó un aumento de daño en el ADN así como un incremento de los niveles de p53 y enzimas de reparación de daño (Martinet et al., 2002). Adicionalmente se ha relacionado el acortamiento de los telómeros con un aumento del riesgo de prematura morbilidad y mortalidad asociada a patologías cardiovasculares, lo que confiere una gran importancia al estudio de la senescencia (Cawthon et al., 2003; Brouillette et al., 2003).

Por todo esto, quisimos explorar si en las células endoteliales humanas, y además de su papel modulador de la expresión de moléculas de adhesión celular, la Ang-(1-7) podía ejercer un papel antisenescente entendido a su vez como un papel protector vascular. En los experimentos realizados en HUVEC, se observó que la Ang II inducía daño en los telómeros, lo que se demostró por un aumento de los puntos de daño asociados al ADN mediante la técnica de doble inmunofluorescencia indirecta. Este dato fue acompañado por un aumento de células positivas a la tinción de SA- β Gal provocada por este estímulo, lo que en conjunto denota un estado senescente de las células.

En varios estudios se ha relacionado la Ang II con la inducción de la senescencia en varios tipos celulares, que concuerda con lo observado en los resultados obtenidos. Como se ha explicado, la producción exagerada de ROS por agentes vasoactivos como la Ang II a través de la activación de la NADPH oxidasa, generan un estado de estrés oxidativo, lo que se ha implicado con la aparición de patologías cardiovasculares (Amanso y Griendling, 2012). A su vez, la producción de ROS puede inducir o acelerar el desarrollo de senescencia celular (Toussaint et al., 2002). A este propósito, se ha demostrado que la Ang II en células de músculo liso humanas induce senescencia de 2 maneras dependientes de daño en el ADN: por la vía de senescencia asociada a estrés mediante la formación de ROS derivada de la activación de la NADPH oxidasa y por senescencia replicativa relacionada con un desgaste en los telómeros en células expuestas a un tratamiento prolongado con Ang II (Herbet et al., 2008).

Respecto a las vías de señalización implicadas en la senescencia inducida por Ang II, se ha determinado en células mesangiales glomerulares un acortamiento del tamaño de los telómeros así como un aumento de la expresión de p53 y p21 lo que conllevó a una parada del ciclo celular que desencadenó la senescencia (Feng et al., 2011); en tanto que un modelo de ratón con aterosclerosis se observó una elevación de la expresión de p21 en células de músculo liso tratadas con Ang II (Kunieda et al., 2006). En HUVEC se observó que la Ang II produjo un aumento de senescencia a través de la inducción de ERK y una reducción de la proteína Bcl-2, la cual se ha relacionado con una inhibición de la senescencia y la apoptosis (Shan et al., 2008). En células mesangiales humanas la Ang II activó a STAT1 que es una proteína proapoptótica y antiproliferativa que induce la expresión de p21 y p27 (Jiao et al., 2012a). Por otra parte la activación de PPAR δ previno la senescencia prematura a través de la sobreexpresión de la fosfatasa y homóloga de tensina eliminada del cromosoma 10 (PTEN) y la consiguiente modulación de la ruta PI3/Akt favoreciendo la reducción de ROS en células de músculo liso (Kim et al., 2011).

En contraparte se observó que el tratamiento con losartán (Feng et al., 2011; Jiao et al., 2012b) y pioglitazona (Imanishi et al., 2008) disminuyó la senescencia causada por Ang II, lo sugiere la implicación del receptor AT₁ en este proceso. En tanto que la señalización mediada por el receptor AT₂ previno la senescencia vascular a través de dos mecanismos: estimulando la expresión de la enzima sensitiva a metil metanosulfonato-2 (MMS2) que previene el daño en el ADN y contrarrestando las acciones del receptor AT₁ (Min et al., 2007; Min et al., 2008; Min et al., 2012). El resveratrol, que es un polifenol abundante en el vino tinto, redujo la senescencia (Ichiki et al., 2012) por un aumento en la expresión de SIRT1 mediada por PPAR δ en células de músculo liso (Kim et al., 2012). Al llegar a este punto remarcaremos la importancia de la proteína SIRT1 en el proceso senescente. SIRT1 es una proteína desacetilasa tipo III dependiente de NAD⁺, que actúa como un regulador de las funciones celulares incluyendo el envejecimiento, el ciclo celular, metabolismo y apoptosis a su vez que interactúa con p53, NF- κ B, y otros factores de transcripción (Michan y Sinclair, 2007; Gallí et al., 2011). Además SIRT1 actúa como un protector vascular, mejorando la relajación dependiente de endotelio a través de la activación de la eNOS (Mattagajasingh et al., 2007) y disminuyendo la expresión de los receptores AT₁ de Ang II, lo que a su vez tiene implicaciones en la senescencia (Miyazaki et al., 2008). Adicionalmente SIRT1 está relacionada con la disminución de estrés oxidativo y senescencia a través de su sobreexpresión provocada por cilostazol (Ota et al., 2008).

En contraste, una disminución de la expresión de SIRT1 aceleró el proceso senescente inducido por alta glucosa en células endoteliales (Balestrieri et al., 2008).

También en esta investigación se observó que la IL-1 β incrementó el daño en el ADN y el número de células senescentes determinado por la técnica de SA- β Gal. La inflamación crónica mediada por la citoquina proinflamatoria IL-1 β está involucrada en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y la obesidad. En células de músculo liso y endoteliales de aorta humana, la adición de IL-1 β se tradujo en una disminución de la proliferación celular (Sawada et al., 1990). Aún no se conoce demasiado los mecanismos implicados en la inducción de senescencia por IL-1 β . Se ha determinado que IL-1 β , favoreció el aumento de senescencia en osteoblastos mediada por la activación de NF- κ B que disminuyó mediante el tratamiento con hemooxigenasa-1 (HO-1), lo que sugirió la relación con estrés oxidativo (Clérigues et al., 2012). En condrocitos humanos la IL-1 β indujo senescencia a través de la activación de la vía p53/p16/pRb así como una prolongada activación de MAPK/p38 (Dai et al., 2006).

Además de lo mencionado anteriormente, el fenotipo secretor asociado a senescencia se caracteriza por una abundante expresión por parte de las células senescentes de quimioquinas, MMPs y citoquinas como la IL-1 (IL-1 β e IL-1 α) que se implican en la respuesta inflamatoria (Rodier et al., 2009). En este contexto tanto la IL-1 β e IL-1 α son secretadas por las células senescentes en menores niveles en comparación con la IL6 e IL-8 (Lin y Karin, 2007). La IL-1 β e IL-1 α comparten ciertas acciones medidas por el mismo receptor (IL-1R1), las cuales son prevenidas por IL-1ra que también se une a IL-1R1 (Sims y Smith, 2010). En relación a esto los niveles de IL-1 α se encuentran aumentados y son regulados postranscripcionalmente en HUVEC senescentes (Garfinkel et al., 1994), es por ello que su sobreexpresión se propuso como un marcador característico de senescencia endotelial (Mariotti et al., 2006). En contraparte, en HUVEC senescentes no se encontró una alteración de los niveles de ARNm de IL-1 β (Mariotti et al., 2006). En tanto que en células sinoviales senescentes estimuladas con IL-1 β se determinó un aumento de la expresión de IL-6, IL-8, VEGF y PGE₂ así como un incremento en la expresión de receptores de IL-1 en comparación con células presenescentes (Park et al., 2012). Mientras que en fibroblastos humanos senescentes aumentaron los niveles de IL-1 β e IL-1 α , en tanto que esta última reguló la expresión de IL-6 e IL-8 a través de NF- κ B (Orjalo et al., 2009). En células senescentes de fibroblastos embrionarios de ratón se incrementó la expresión de ARNm de IL-1 β y la activación de la vía MAPK/p38 que se correlacionó con un

aumento de p16 (Uewaka et al., 2004). Estos resultados sugieren que la IL-1 (IL-1 β e IL-1 α) favorece el estado inflamatorio no solo por sí misma, si no también por inducir la expresión de otras moléculas inflamatorias o por un aumento de su expresión en las células senescentes.

En contraste, se determinó que la disminución de IL-1ra en HUVEC redujo su proliferación mientras que su sobreexpresión promovió la actividad de CDK2 y la fosforilación de pRb que permitió la transición del ciclo de la fase G₁ a la S, favoreciendo la proliferación celular (Dewberry et al., 2008). Paralelamente en fibroblastos de ratones deficientes en IL-1ra se observó un una disminución en la proliferación y aumento de la senescencia, así como una activación de la vía MAPK/p38 (Uewaka et al., 2004). Lo anterior apunta a que la inhibición de IL-1 (IL-1 β e IL-1 α) o la sobreexpresión de IL-1ra es una manera potencial de reducir la senescencia inducida por esta citoquina. Dado que la inducción de las acciones de IL-1 β involucra a NF- κ B, la inhibición de la actividad IKK/ NF- κ B redujo la senescencia celular y el daño por estrés oxidativo en el ADN; lo que vincula el estrés oxidativo con daños celulares a largo plazo (Tilsta et al., 2012). Por lo tanto la inhibición de NF- κ B, también podría reducir el efecto senescente e inflamatorio de IL-1 β o incluso de otras citoquinas que involucren la activación de este factor de transcripción. A este respecto, existen otras citoquinas proinflamatorias que han inducido senescencia como el IFN- α (Pammer et al., 2006), IFN- γ (Kim et al., 2009b) y TNF- α (Breitschopf et al., 2001).

Los datos obtenidos indican que las acciones de la Ang II e IL-1 β sobre la inducción de daño en el ADN y senescencia fueron prevenidas parcialmente cuando las HUVEC se trataron con Ang-(1-7) cuyo efecto fue revertido por el A779, lo que señala la implicación del receptor Mas en la prevención de senescencia. Existe muy poca evidencia que indique la relación entre Ang-(1-7) y senescencia sin embargo, algunos datos pueden respaldar el efecto observado (Fig. 58). El envejecimiento y la senescencia implican procesos que limitan la proliferación celular, en humanos con avanzada edad se ha detectado un aumento de células con características senescentes, a esto hay que añadir que las enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis también están relacionadas con el envejecimiento (Kong et al., 2011). Respecto a lo anterior se determinó que la vasodilatación mediada por Ang-(1-7) fue menor en el cuerpo cavernoso de ratas viejas que en jóvenes; lo que se revirtió con una preincubación con Ang-(1-7), que a través del receptor Mas, atenuó la vasoconstricción causada por Ang II en ratas viejas (Yousif et al., 2007). Por el

contrario en arterias de ratas viejas se conservó el efecto vasodilatador de Ang-(1-7) mediado por el receptor Mas y AT₂ (Bosnyak et al., 2012).

Por otra parte, la Ang-(1-7) a través del receptor Mas revierte la inducción de LOX-1 (una proteína apoptótica) provocada por Ang II y a su vez incrementa la expresión de Bcl-2 disminuida por Ang II evitando la apoptosis en HUVEC (Yang et al., 2012). Como se ha comentado el daño en el ADN induce senescencia, en relación a esto, el eje Ang-(1-7)/receptor Mas redujo el estrés oxidativo y el daño en el ADN causado por Ang II en el cuerpo cavernoso (Kilarkaje et al., 2013). De todo lo anterior podemos concluir que el efecto de la Ang-(1-7) sobre la disminución de senescencia inducida por Ang II e IL-1 β podría relacionarse con el aumento en el estrés oxidativo causado por estas moléculas, sin embargo, es necesario determinar sus acciones sobre enzimas relacionadas con la producción de ROS como la NADPH oxidasa. Respecto a esto, en células endoteliales progenitoras se identificó que la sobrerregulación de la Nox2 y Nox4 o la traslocación de Nox5 generan la producción de ROS causada por Ang II que incrementa la senescencia, lo que fue revertido con telmisartán (Li et al., 2011). En cualquier caso, cabe destacar que un hallazgo importante en este trabajo es la identificación de una nueva actividad biológica de la Ang-(1-7), concretamente como agente antisenescente. Por tanto, además de su efecto vasodilatador, antitrombótico o antiinflamatorio, la Ang-(1-7) puede actuar como una molécula beneficiosa a nivel vascular mediante una acción protectora frente a la senescencia prematura endotelial inducida por estrés.

La Nampt/PBEF/visfatina aumenta el daño telomérico y genera la inducción de senescencia a través de su actividad intrínseca Nampt e involucra la activación de la vía de p53 en HUVEC.

En contextos fisiopatológicos como es la obesidad, se ha demostrado una disminución de componentes de SRA que llevan a la producción disminuida de Ang-(1-7) (Jones et al., 1997; Santos et al., 2010). Sin embargo, se ha demostrado un aumento paralelo de otras sustancias liberadas por el tejido adiposo que podrían ser deletéreas para la pared vascular (Leal y Mafra, 2013; Ronti et al., 2006). Entre ellas, se encuentra la Nampt/PBEF/visfatina que es una enzima que cataliza la producción de NAD⁺ mediante la vía salvaje (Revollo et al., 2004). En diferentes estudios, incluidos los de nuestro grupo de investigación, se ha demostrado que la Nampt/PBEF/visfatina puede tener un impacto negativo a nivel vascular, a través de acciones inflamatorias,

proliferativas o mediante el deterioro de la relajación vascular, que son todas ellas antagónicas a las descritas para la Ang-(1-7), la Nampt/PBEF/visfatina puede activar la NADPH oxidasa endotelial (Vallejo y Romacho et al., 2011), lo que podría contribuir a un posible papel prosenescente, contrario al de la Ang-(1-7), de la Nampt/PBEF/visfatina.

De hecho, en los resultados de esta investigación se obtuvo que la Nampt/PBEF/visfatina aumentó el daño en el ADN y el número de células senescentes tanto de una manera concentración dependiente como en función del tiempo. Posteriormente elegimos la concentración de 50 ng/ml, que se ha descrito en la circulación de pacientes obesos en contraposición con sus controles sanos (Filippatos et al., 2010), para el resto de los experimentos.

Además observamos que el producto de la actividad Nampt, el NMN, mimetizó los efectos de la visfatina, lo que corroboró que sus acciones eran mediadas por esta actividad. Como hemos mencionado SIRT1 es una enzima que requiere de NAD⁺ para llevar a cabo sus funciones y genera nicotinamida, que a su vez es un inhibidor de las reacciones de desacetilación dependientes de NAD⁺, por lo que ambas vías se encuentran relacionadas (Dahl et al., 2012). En relación a esto y en contraste con nuestros resultados la sobreexpresión de Nampt aumentó la proliferación y disminuyó la senescencia en un ambiente de alta glucosa y ROS en células endoteliales (Borradaile y Pickering, 2009); a su vez que disminuyó la aparición de células poliploides característica de la senescencia endotelial (Borradaile y Pickering, 2010) y asociadas a la arterosclerosis en humanos (Sato et al., 1998; Tokuraga et al., 1989) Además la Nampt atenuó la senescencia en miocitos cardiacos (Hsu et al., 2009) y en células de músculo liso a través de la activación de SIRT1 que aumentó la degradación de p53 (Van der Veer et al., 2007). En tanto que en células de músculo liso la sobreexpresión de SIRT1 aumenta la proliferación celular solo si los niveles de Nampt están sobreexpresados, lo que genera una disminución de p21 atenuando la senescencia (Ho et al., 2009). No se tiene una explicación clara para estos resultados contradictorios sobre la relación entre visfatina y senescencia celular entre nuestros resultados y lo existente en la literatura. Sin embargo, podrían estar relacionados con la existencia de dos isoformas descritas para la visfatina: una isoforma constitutiva intracelular, de localización predominantemente nuclear y con funciones de mantenimiento celular, frente a otra isoforma secretada, extracelular, con funciones de tipo citoquina (Revollo et al., 2004 y Van der Veer et al., 2005), como ocurriría en nuestras condiciones experimentales.

Para poder profundizar en el mecanismo prosenescente de la Nampt/PBEF/visfatina, se estudió primero el posible papel de la actividad enzimática Nampt. Se observó que el APO866 o FK866, un inhibidor que compite directamente por el sustrato nicotinamida de la Nampt, abolió la inducción de daño en el ADN así como el incremento de las células positivas a SA-βGal. Además, observamos que el producto de la actividad enzimática Nampt, el NMN, mimetizó los efectos de la Nampt/PBEF/visfatina, lo que corroboró que sus acciones eran mediadas por esta actividad (Fig. 58)

En 2003 se descubrió el FK866 y se propuso como agente antitumoral puesto que indujo apoptosis por la inhibición de Nampt en células de carcinoma de hígado (Hasmann y Schemainda, 2003), más recientemente se determinó que este inhibidor aumenta la actividad del p53/p21 disminuyendo la proliferación celular (Thakur et al., 2012, Thakur et al., 2013). En concordancia con nuestros resultados, la inhibición de Nampt promovió la proliferación celular y una disminución de células positivas a la tinción SA-βGal en células tumorales y de fibroblastos humanos. Lo que coincidió con un aumento de la expresión de la reparación de daño en el ADN mediada por recombinación homóloga (esencial para mantener el genoma) y una disminución de la mediada por uniones finales no homólogas (reparación de mutaciones) (Zhu et al., 2012).

Posteriormente se decidió investigar el mecanismo por el cual la visfatina induce la senescencia. Por lo tanto, se exploró el papel de la NADPH oxidasa, para ello se empleó la apocinina (inhibidor de la enzima) y se determinó que la inducción de SA-βGal generada por la visfatina fue abolida por este inhibidor. Esto sugirió que la visfatina podría inducir la NADPH oxidasa que genera ROS y daño en el ADN lo que desencadenaría la senescencia inducida por estrés (Fig. 58). Lo anterior se relaciona con que la visfatina, mediante su actividad Nampt, indujo la actividad de la enzima NADPH oxidasa en HUVEC lo que empeoró la relajación dependiente de endotelio en vasos de rata y de humano (Vallejo y Romacho et al., 2011). Así mismo una dieta alta en calorías aumentó la producción de ROS elevando la expresión de p53 que a través de NF-κB provocó un aumento de adipoquinas proinflamatorias en el tejido adiposo lo condujo a la resistencia a insulina y diabetes en ratones (Minamino et al., 2009). Más específicamente en HUVEC la supresión de la expresión de Nox4 y Nox1, causó un aumento de la proliferación celular y una disminución de daño en el ADN generado por estrés oxidativo (Lener et al., 2009); lo que sugiere una implicación de la NADPH oxidasa en la inducción de la senescencia endotelial (Schilder et al., 2009). La

expresión de Nox4 se implicó en la respuesta de daño en el ADN inducida por el oncogen H-Ras (Weyemi et al., 2012) y en una aceleración de la senescencia en fibroblastos (Geiszt et al., 2000). Sin embargo, es necesario explorar más a fondo el papel de esta enzima en la inducción de senescencia causada por visfatina.

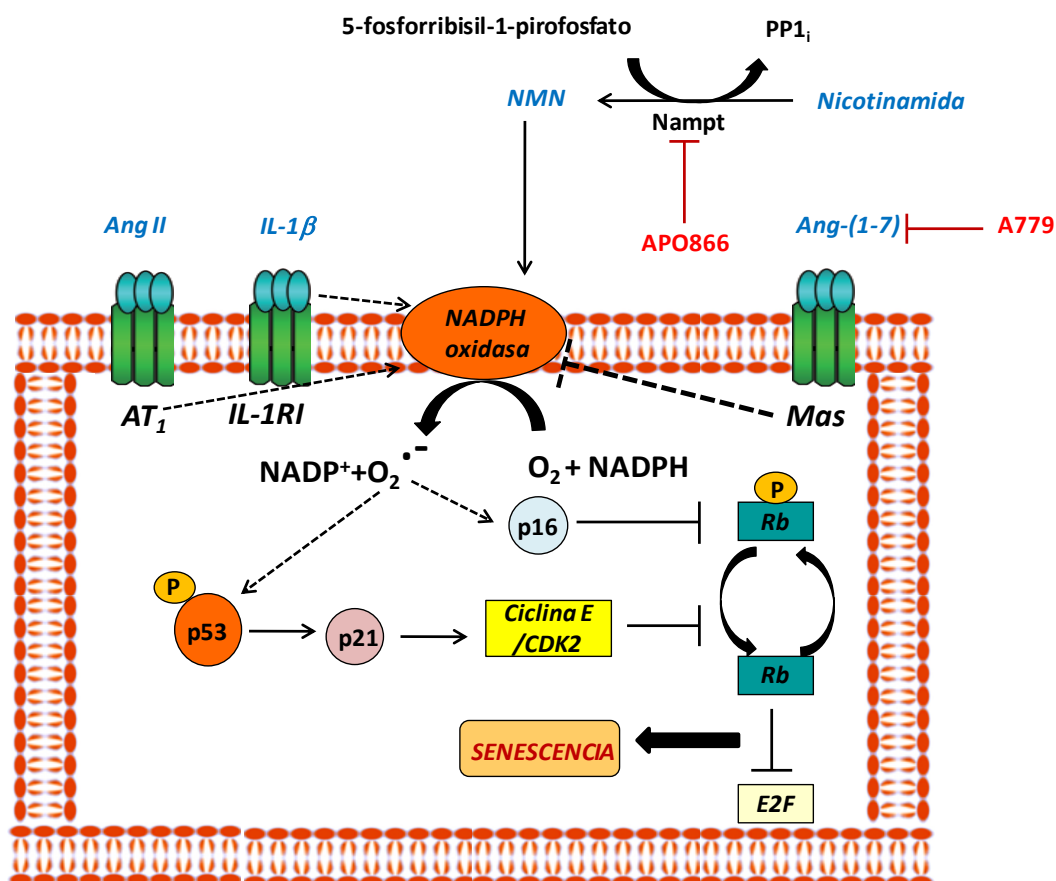


Fig. 58. Esquema representativo del mecanismo de la implicación en senescencia de la Ang-(1-7) y la Nampt/PBEF/visfatina. La Ang-(1-7), a través de la unión al receptor Mas, disminuye el número de células senescentes y el daño telomérico inducidos por Ang II e IL-1β, mediante un mecanismo que aún queda por esclarecer. En tanto que la visfatina, a través de su actividad Nampt, produce un aumento de ROS mediante la inducción de la enzima NADPH oxidasa, lo que podría inducir la parada del ciclo celular y senescencia. Lo que se evidenció por un aumento de células positivas a la tinción SA-βGal y de daño en los telómeros.

Pretendemos que los hallazgos del presente estudio relacionados con los mecanismos prosenescentes de la Nampt/PBEF/visfatina, nos ayuden a esclarecer los mecanismos por los que la Ang-(1-7) ejerce un efecto antagónico antisenescente. Así, pretendemos en un futuro próximo esclarecer si el papel antisenescente endotelial de la Ang-(1-7) depende de una disminución tanto de los niveles de p53 por una

inhibición de la actividad NADPH oxidasa, además de explorar otras posibles proteínas implicadas como p21 ó p16 entre otras.

Consideraciones finales.

Para finalizar, podemos decir que este estudio pone de relieve a la Ang-(1-7) como una molécula con capacidad antiinflamatoria tanto en el músculo liso vascular como en el endotelio humano. Cabe destacar el hallazgo de que, a nivel de inflamación, la Ang-(1-7) es capaz de actuar no sólo como un antagonista fisiológico de la Ang II sino también de otras moléculas inflamatorias independientes del SRA, como puede ser la citoquina IL-1 β . Podemos pensar además que, al inhibir rutas generales de señalización asociadas a la inflamación como pueden ser la activación de la NADPH oxidasa o el factor de transcripción NF- κ B, la Ang-(1-7) podría tener una capacidad antiinflamatoria frente a un gran espectro de agentes inflamatorios.

Además de la acción antiinflamatoria de la Ang-(1-7), el estudio también identifica por primera vez a este péptido del SRA como un agente antisenescente endotelial capaz de contrarrestar el daño telomérico inducido por sustancias relacionadas o no con el SRA. Por tanto, queda identificado un nuevo mecanismo por el cual la Ang-(1-7) puede actuar como un protector vascular.

Tanto los efectos antiinflamatorios como antisenescentes atribuidos a la Ang-(1-7) en el presente estudio están mediados por la activación del receptor Mas. Por tanto, la modulación de dichos receptores emerge como una posibilidad terapéutica futura para regular diferentes aspectos de la función vascular. Así, cabe proponer que la activación del receptor Mas permitirá contrarrestar, al menos parcialmente, la disfunción endotelial observada en diferentes situaciones fisiopatológicas, como puede ser, entre muchas otras, el daño vascular producido por un desequilibrio en la producción de adipoquinas por el tejido adiposo en relación con enfermedades del metabolismo. De una manera global el eje Ang-(1-7)/receptor Mas emerge como una potencial y prometedora diana terapéutica para prevenir o mejorar la función vascular en situaciones fisiopatológicas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

De este trabajo de investigación se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1.- La Ang-(1-7) ejerce una acción antiinflamatoria, medida en términos de inducción de la iNOS, en las CMLAH en cultivo estimuladas tanto con Ang II como con otras moléculas independientes del SRA, como puede ser la IL-1 β .

2.- El efecto antiinflamatorio de la Ang-(1-7) en las CMLAH en cultivo es dependiente de la concentración y está mediado por un efecto inhibitorio de la activación consecutiva de la enzima NADPH oxidasa y del factor de transcripción NF- κ B inducida tanto por Ang II como por IL-1 β .

3.- La Ang-(1-7) ejerce su efecto antiinflamatorio en las CMLAH a través de su unión al receptor metabotrópico Mas. Parece existir un único subtipo de receptor Mas en las CMLAH.

4.- La Ang-(1-7) reduce también la activación de otro tipo celular vascular como es la célula endotelial. Así, la Ang-(1-7) reduce la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 en HUVEC a través de la activación del receptor Mas.

5.- Las moléculas inflamatorias Ang II e IL-1 β pueden inducir daño telomérico y entrada en senescencia en HUVEC. Este efecto senescente es parcialmente contrarrestado por la Ang-(1-7), en un efecto mediado por su unión al receptor Mas.

6.- La adipoquina Nampt/PBEF/visfatina, cuyos niveles están aumentados en situaciones como la obesidad en las que se ha descrito una disminución paralela de Ang-(1-7), induce por el contrario la entrada en senescencia de las células endoteliales y el daño telomérico de una manera dependiente de la concentración y el tiempo, por medio de su actividad Nampt. En el mecanismo prosenescente de la Nampt/PBEF/visfatina también está involucrada la activación de la NADPH oxidasa.

En resumen, la activación del eje Ang-(1-7)/Mas podría constituir una potencial y prometedor diana terapéutica como atenuador de la inflamación y la senescencia vascular inducidas por un amplio número de moléculas, relacionadas o no con el SRA, y cuya sobreexpresión se ha relacionado con el daño vascular asociado a enfermedades como aterosclerosis o a desórdenes metabólicos como la obesidad.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

The main conclusions obtained from this work are the following:

- 1.- Ang-(1-7) exerts an anti-inflammatory action, measured by the induction of iNOS in cultured HASMC induced not only by Ang II, but also by RAS-independent pro-inflammatory molecules, such as the cytokine IL-1 β .
- 2.- The antiinflammatory effect of Ang-(1-7) is a concentration dependent and is mediated through the inhibition of NADPH oxidase and NF- κ B activation by either Ang II or IL-1 β .
- 3.- Ang-(1-7) exerts its anti-inflammatory effect in HASMC through binding to the metabotropic Mas receptor. The results suggest the presence of a single subtype of Ang-(1-7) receptor in HASMC.
- 4.- The activation of Ang-(1-7)/Mas receptor axis decreases the expression of the adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in HUVEC.
- 5.- The inflammatory molecules, Ang II and IL-1 β , can induce telomere damage and senescence in HUVEC. Ang-(1-7), acting through Mas receptor, can partially attenuate this prosenescent effect.
- 6.- On the contrary, the adipokine Nampt/PBEF/visfatin, whose circulating levels, opposite to Ang-(1-7), are enhanced in pathological contexts like obesity, induces senescence and DNA damage in a concentration and time dependent-manner. This prosenescent effect relies Nampt enzymatic activity and involves NADPH oxidase activity.

In summary, the Ang-(1-7)/Mas receptor axis could represent a potential novel therapeutic target for attenuating vascular inflammation and senescence induced by those RAS-dependent or -independent molecules whose over-expression is associated with vascular damage in the context of atherosclerosis or metabolic disorders such as obesity.

***REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta JC, O'Loghlen A, Banito A, Raguz S, Gil J. (2008) Control of senescence by CXCR2 and its ligands. *Cell Cycle*. 7:2956-2959.
- Admiraal PJ, Derkx FH, Danser AH, Pieterman H, Schalekamp MA. (1990) Metabolism and production of angiotensin I in different vascular beds in subjects with hypertension. *Hypertension*. 15:44-55.
- Aksoy MO, Mras S, Kamm KE, Murphy RA. (1983) Ca²⁺, cAMP, and changes in myosin phosphorylation during contraction of smooth muscle. *Am J Physiol*. 245:C255-270.
- Al-Maghrebi M, Benter IF, Diz DI. (2009) Endogenous angiotensin-(1-7) reduces cardiac ischemia-induced dysfunction in diabetic hypertensive rats. *Pharmacological research*. 59:263-268.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 357:593-615.
- Allred A, Diz D, Ferrario C, Chappell M. (2000) Pathways for angiotensin-(1-7) metabolism in pulmonary and renal tissues. *Am J Physiol Renal Physiol*. 279:F841-F850.
- Allshire RC, Dempster M, Hastie ND. (1989) Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic acids research*. 17:4611-4627.
- Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. (1992) Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89:10114-10118.
- Amanso AM, y Griendling KK. (2012) Differential roles of NADPH oxidases in vascular physiology and pathophysiology. *Front Biosci*. 4:1044-1064.
- Andrew PJ, y Mayer B. (1999) Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res*. 43:521-531.
- Ardanaz N, y Pagano PJ. (2006) Hydrogen peroxide as a paracrine vascular mediator: regulation and signaling leading to dysfunction. *Exp Biol Med*. 231:237-251.
- Averill DB, Diz DI. (1999) Angiotensin peptides and the baroreflex control Campagnole-Santos MJ, Santos RAS. Angiotensin peptides acting at of sympathetic outflow: pathways and mechanisms of the medulla the rostral ventrolateral medulla contribute to the hypertension of oblongata. *Brain Res Bull*. 51:119-128.
- Avogaro A y Kreuzengerg SV. (2005) Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. *Clinica Chimica Acta*. 360:9-26.
- Azcutia V, Abu-Taha M, Romacho T, Vázquez-Bella M, Matesanz N, Luscinskas FW, Rodríguez-Mañas L, Sanz MJ, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C (2010) Inflammation determines the pro-adhesive properties of high extracellular d-glucose in human endothelial cells in vitro and rat microvessels in vivo. *PLoS One*. 5:e10091.
- Bader M, Peters J, Baltatu O, Müller D, Luft F, Ganten D. (2001) Tissue rennin-angiotensin system: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J. Mol. Med*. 79:76-102.
- Bader M, y Ganten D. (2008) Update on tissue rennin-angiotensin systems. *J. Mol. Med*. 86: 615-621.
- Bader M. (2013) ACE2, angiotensin-(1-7), and Mas: the other side of the coin. *Eur J Physiol*. 465:79-85.
- Balestrieri ML, Rienzo M, Felice F, Rossiello R, Grimaldi V, Milone L, Casamassimi A, Servillo L, Farzati B, Giovane A, Napoli C. (2008) High glucose downregulates endothelial progenitor cell number via SIRT1. *Biochim Biophys Acta*. 1784:936-945
- Bedard K, y Krause KH. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 87:245-313.
- Baker CS, Hall RJ, Evans TJ, Pomerance A, Maclouf J, Creminon C, Yacoub MH, Polak JM. (1999) Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19:646-655.
- Ben-Porath I, y Weinberg R. (2005) The signals and pathways activating cellular senescence. *The international journal of biochemistry and cell biology*. 37:961-976.
- Benter IF, Yousif MH, Anim JT, Cojocel C, Diz DI. (2006) Angiotensin-(1-7) prevents development of severe hypertension and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats treated with L-NAME. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 290: H684-H691.
- Benter IF, Yousif MH, Dhaunsi GS, Kaur J, Chappell MC, Diz DI. (2008) Angiotensin-(1-7) prevents activation of NADPH oxidase and renal vascular dysfunction in diabetic hypertensive rats. *Am J Nephrol*. 28:25-33.
- Berk BC. (1999) Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: pathways activated by specific tyrosine kinases. *J Am Soc Nephrol*. 10: S62-S68.
- Berlett BS, y Stadtman ER. (1997) Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*. 272:20313-20316.
- Bernstein K, Ong F, Blackwell W, Shah K, Giani J.F, Gonzalez-Villalobos RA, Shen X.Z, Fuchs S. (2013) A modern understanding of the traditional and nontraditional biological functions of angiotensin-converting enzyme. *Pharmacological reviews*. 65:1-46.
- Beyer AM, Guo DF, Rahmouni K. (2013) Prolonged treatment with angiotensin 1-7 improves endothelial

- function in diet-induced obesity. *J Hypertens.* 31:730-738.
- Blackburn E. (2001) Switching and signaling at the telomere. *Cell.* 106:661-673.
- Blake GJ. y Ridker PM. (2001) Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ Res.* 89:763-771.
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L, Meyer J. (2001) Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 104: 1336– 1342.
- Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW. (1997) Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell.* 91:25-34.
- Boden G. (2008) Obesity and free Fatty acids. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 37:635-646.
- Bodiga S, Zhong JC, Wang W, Basu R, Lo J, Liu GC, Guo D, Holland SM, Scholey JW, Penninger JM, Kassiri Z, Oudit GY. (2011) Enhanced susceptibility to biomechanical stress in ACE2 null mice is prevented by loss of the p47(phox) NADPH oxidase subunit. *Cardiovasc Res.* 91:151-161.
- Borradaile NC. y Pickering JG. (2009) Nicotinamide phosphoribosyltransferase imparts human endothelial cells with extended replicative lifespan and enhanced angiogenic capacity in a high glucose environment. *Aging cell.* 8:100-112.
- Borradaile NC. y Pickering JG. (2010) Polyploidy impairs human aortic endothelial cell function and is prevented by nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Am J Physiol Cell Physiol.* 298: C66–C74.
- Bosnyak S, Widdop RE, Denton KM, Jones ES. (2012) Differential mechanisms of Ang(1-7)-mediated vasopressor effect in adult and aged candesartan-treated rats. *International journal of hypertension.* 2012: 192567.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Brake DK y Smith CW. (2008) Flow cytometry on the stromal-vascular fraction of white adipose tissue. *Methods Mol Biol,* 56: 221-229.
- Brandes R. y Kreuzer J. (2005) Vascular NADPH oxidase: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res.* 65:16-27.
- Brandes RP. y Schröder K. (2008) Differential vascular functions of Nox family NADPH oxidases. *Curr Opin Lipidol.* 19:513–518.
- Brasier A, Recinos A, Eledrisi S. (2002) Vascular Inflammation and the Renin-Angiotensin System. *Arteriosclerosis, Trombosis and Vascular Biology.* 22: 1257-1266.
- Braun M, Pietsch P, Zepp A, Schrör K, Baumann G, Felix SB. (1997) Regulation of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1-beta-induced induced adhesion molecule expression in human vascular smooth muscle cells by cAMP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17:2568-2575.
- Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. (2001) Pro-atherogenic factors induce telomerase inactivation in endothelial cells through an Akt-dependent mechanism. *FEBS Lett* 493: 21–25.
- Bridger JM, Boyle S, Kill IR, Bickmore WA. (2000) Remodelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts. *Cell.*10:149-152.
- Briones A. y Touyz R. (2010) Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Curr Hypertens.* 12: 135-142.
- Brouillette S, Singh RK, Thompson JR, Goodall AH, Samani NJ. (2003) White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:842–846.
- Bujak M. y Frangogiannis NG. (2009) The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch. Immunol. Ther.Exp.* 57:165-176.
- Busse R. y Mülsch A. (1990) Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 275: 87-90.
- Buttery LD, Springall DR, Chester AH, Evans TJ, Standfield EN, Parums DV, Yacoub MH, Polak JM. (1996) Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest.* 75(1):77-85.
- Cai H, Griendling KK, Harrison DG. (2003) The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *TRENDS in Pharmacological Sciences.* 24:471-478.
- Campagnole-Santos MJ, Diz DI, Santos RAS, Khosla MC, Brosnihan KB & Ferrario CM (1989). Cardiovascular effects of angiotensin-(1–7) injected into the dorsal medulla of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 257: H324–H329.
- Campagnole-Santos MJ, Heringer SB, Batista EN, Khosla MC, Santos RA. (1992) Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am J Physiol.* 263:R89-94.
- Campisi J. (1996) Replicative senescence: An old lives tale?. *Cell.* 84:497-500.
- Campisi J. (1997) The biology of replicative senescence. *European journal of cancer.* 33:703-709.
- Campisi J (2001) Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* 11:S27–S31.

- Campisi J. y D'Adda di Fagagna F. (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature*. 8: 729-740.
- Cannon B, Nedergaard J. (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev*. 84:277-359.
- Cardus A, Uryga AK, Walters G, Erusalimsky JD. (2012) SIRT6 protects human endothelial cells from DNA damage, telomere dysfunction, and senescence. *Cardiovasc Res*. 97:571-579.
- Cassis LA, Police SB, Yiannikouris F, Thatcher SE. (2008) Local adipose tissue renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep*. 2008;10:93-98.
- Castro CH, Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP. (2005) Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension*.46:937-942.
- Castro PH, Höcherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C. (2010) Physiology of kidney renin. *Physiol Rev*. 90:607-673.
- Castro-Chaves P, Cerqueira R, Pintahao M, Leite-Moreira A. (2010) New pathways of the renin-angiotensin system: the role of ACE2 in cardiovascular pathophysiology and therapy. *Expert Opin. Ther. Targets*. 14: 485-496.
- Cau SB, Guimaraes DA, Rizzi E, Ceron CS, Souza LL, Tirapelli CR, Gerlach RF, Tanus-Santos JE. (2011) Pyrrolidine dithiocarbamate down-regulates vascular matrix metalloproteinases and ameliorates vascular dysfunction and remodelling in renovascular hypertension. *Br J Pharmacol*.164: 372-381.
- Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. (2003) Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet*. 361:393-395.
- Chan EC, Datla SR, Dilley R, Hickey H, Drummond GR, Dusting GJ. (2007) Adventitious application of the NADPH oxidase inhibitor apocynin in vivo reduces neointima formation and endothelial dysfunction in rabbits. *Cardiovascular research*. 75:710-718.
- Chang YH, Chang DM, Lin KC, Shin SJ, Lee YJ. (2011) Visfatin in overweight/obesity type 2 diabetes mellitus insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systematic review. *Diabetes Metab Res Rev*. 27:515-527.
- Chappell MC, Pirro NT, Sykes A, Ferrario CM. (1994) Metabolism of 3 [H]norepinephrine from rat atria. *Hypertension*. 24:457-460.
- Chappell M, Allred A, Ferrario C. (2001) Pathways of angiotensin-(1-7) metabolism in the kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 16(Suppl 1):22-26.
- Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. (1995) Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92: 4337-4341.
- Chen XL, Tummala PE, Olbrych MT et al (1998) Angiotensin II induces monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 83: 952-959.
- Chen QM, Prowse KR, Tu VC, Purdom S, Linskens MH. (2001) Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Exp Cell Res*. 265:294-303.
- Chen Y, Panda K, Stuehr DJ. (2002a) Control of nitric oxide synthase dimer assembly by a heme- NO-dependent mechanism. *Biochemistry*.41:4618-4625.
- Chen J, Brodsky SV, Goligorsky DM, Hampel DJ, Li H, Gross SS, Goligorsky MS. (2002b) Glycated collagen I induces premature senescence-like phenotypic changes in endothelial cells. *Circ Res*. 90:1290-1298.
- Chen J. y Goligorsky MS. (2006) Premature senescence of endothelial cells: Methusaleh's dilemma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 290:H1729-H1739.
- Cheng J Z. Vapaatalo H, Mervaala E. (2005) Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit*. 11:194-205.
- Chua CC, Hamdy RC, Chua BH. (1998) Upregulation of vascular endothelial growth factor by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1401: 187-194
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 91:3527-3561.
- Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS. (2005) Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res*. 46: 2347-2355.
- Clark MA, Tallant EA, Tommasi E, Bosch S, Diz DI. (2003) Angiotensin-(1-7) reduces renal angiotensin II receptors through a cyclooxygenase-dependent mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol*. 41:276-283.
- Classon M. y Harlow E. (2002) The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2: 910-917.
- Clérigues V, Guillén MI, Castejón MA, Gomar F, Mirabet V, Alcaraz MJ. (2012) Heme oxygenase-1 mediates protective effects on inflammatory, catabolic and senescence responses induced by interleukin-1 β in osteoarthritic osteoblasts. *Biochem Pharmacol*. 83:395-405.
- Cobb RR, Felts KA, Parry GC, Mackman N. (1996) Proteasome inhibitors block VCAM-1 and ICAM-1 gene expression in endothelial cells without affecting nuclear

- translocation of nuclear factor-kappa B. *Eur J Immunol.* 26:839-845.
- Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. (1995) Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NFkappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* 9: 899–909.
- Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. (2000) P-selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM-1) deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Exp. Med.* 191:189–194.
- Collins C. y Tzima E. (2011) Hemodynamic forces in endothelial dysfunction and vascular aging. *Exp. Gerontol.* 46:185–188.
- Comi P, Chiamonte R, Maier JA. (1995) Senescence-dependent regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor in human vascular endothelial cells. *Exp Cell Res.* 219: 304–308.
- Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. (2010) The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 5:99-118.
- Costa MA, Lopez Verrilli MA, Gomez KA, Nakagawa P, Peña C, Arranz C, Gironacci MM. (2010) Angiotensin-(1-7) upregulates cardiac nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 299:H1205-1211.
- Couffinhal T, Duplaa C, Moreau C, Lamaziere JM, Bonnet J. (1994) Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 74: 225–234.
- Craig DH, Chapman SK, Daff S. (2002) Calmodulin activates electron transfer through neuronal nitric-oxide synthase reductase domain by releasing an NADPH-dependent conformational lock. *J Biol Chem.* 277:33987-33994.
- Crowley SD. y Coffman TM. (2012) Recent advances involving the rennin-angiotensin system. *Experimental cell research.* 318:1049-1056.
- Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science.* 251:788 –791.
- D'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature.* 426:194-198.
- D'Azzo A, Hoogeveen A, Reuser AJJ, Robinson D, Galjaard H. (1982) Molecular defect in combined β -galactosidase and neuraminidase deficiency in man. *Proc. Natl. Acad.Sci.USA.* 79:4535-4539.
- Da Silveira KD, Coelho FM, Vieira AT, Sachs D, Barroso LC, Costa VV, Bretas TL, Bader M, de Sousa LP, da Silva TA, dos Santos RA, Simões e Silva AC, Teixeira MM. (2010) Anti-inflammatory effects of the activation of the angiotensin-(1-7) receptor, MAS, in experimental models of arthritis. *J Immunol.* 185:5569-5576.
- Dahl TB, Yndestad A, Skjelland M, Øie E, Dahl A, Michelsen A, Damås JK, Tunheim SH, Ueland T, Smith C, Bendz B, Tonstad S, Gullestad L, Frøland SS, Krohg-Sørensen K, Russell D, Aukrust P, Halvorsen B. (2007) Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization. *Circulation.* 115:972-980.
- Dahl TB, Holm S, Aukrust P, Halvorsen B. (2012) Visfatin/NAMPT: a multifaceted molecule with diverse roles in physiology and pathophysiology. *Annu Rev Nutr.* 32:229-243.
- Dai SM, Shan ZZ, Nakamura H, Masuko-Hongo K, Kato T, Nishioka K, Yudoh K. (2006) Catabolic stress induces features of chondrocyte senescence through overexpression of caveolin 1: possible involvement of caveolin 1-induced down-regulation of articular chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 54:818-831.
- Dandona P, Mohanty P, Ghanim H, Aljada A, Browne R, Hamouda W, Prabhala A, Afzal A, Garg R. (2001) The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. 86: 355–362.
- Dandona P, Kumar V, Aljada A et al. (2003) Angiotensin II receptor blocker valsartan suppresses reactive oxygen species generation in leukocytes, nuclear factor-kappa B, in mononuclear cells of normal subjects: evidence of an antiinflammatory action. *J Clin Endocrinol Metab.* 88: 4496–4501.
- Davalos AR, Coppe JP, Campisi J, Desprez PY. (2010) Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 29:273-283.
- Davi G, Guagnano MT, Ciabattini G, Basili S, Falco A, Marinopicolli M, Nutini M, Sensi S, Patrono C. (2002) Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. *JAMA.* 288:2008-2014.
- Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. (1993) The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol.* 171:223–229.
- Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. (2007) Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.* 115:1285-1295.
- Dejardin E. (2006) The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochem Pharmacol.* 72:1161-1179.
- DelliPizzi AM, Hilchey SD, Bell-Quilley CP (1994). Natriuretic action of angiotensin(1 -- 7). *Br J Pharmacol.*

111:1-3

Depre C, Havaux X, Renkin J, Vanoverschelde JL, Wijns W. (1999) Expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary atherosclerotic plaque. *Cardiovascular research*. 41: 465-472.

Deo R, Khera A, McGuire D, Murphy S, Meo Neto J, Morrow D, De Lemos J.A. (2004) Association among plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1, traditional cardiovascular risk factors, and subclinical atherosclerosis. *Journal of the American college of cardiology*. 44: 1812-1818.

Dewberry RM, King AR, Crossman DC, Francis SE. (2008) Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) modulates endothelial cell proliferation. *FEBS Lett*. 582:886-890.

Dias-Peixoto MF, Santos RA, Gomes ER, Alves MN, Almeida PW, Greco L, Rosa M, Fauler B, Bader M, Alenina N et al. (2008) Molecular mechanisms involved in the angiotensin-(1-7)/Mas signaling pathway in cardiomyocytes. *Hypertension*. 52: 542-548.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*. 399:601-605.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:9363-9367.

Dinarello CA. (2000) The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N Engl J Med*. 343:732-734

Dorresteyn JAN, Visseren FLJ, Spiering W. (2012) Mechanisms linking obesity to hypertension. *Obes Rev*. 13:17-26.

Doughan A.K, Harrison D.G, Dikalov, S.I. (2008) Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ. Res*. 102: 488-496.

Drexler H. y Hornig B. (1999) Endothelial dysfunction in human disease. *J Mol Cell Cardiol*. 31:51-60.

Dubey R.K, Roy A, Overbeck H.W. (1992) Culture of renal arteriolar smooth muscle cells. Mitogenic responses to angiotensin II. *Circ Res*. 71: 1143-1152.

Ducut Sigala JL, Bottero V, Young DB, Shevchenko A, Mercurio F, Verma IM. (2004) Activation of transcription factor NF-kappaB requires ELKS, an IkappaB kinase regulatory subunit. *Science*. 304:1963-1967.

Durik M, Van Veghel R, Kuipers A, Rink R, Haas Jimoh Akanbi M, Moll G, Danser AHJ, Roks AJM. (2012) The effect of the thioether-bridged, stabilized Angiotensin-(1-7) analogue cyclic Ang-(1-7) on cardiac remodeling and

endothelial function in rats with myocardial infarction. *Int J of Hypertension*. 2012:1-8.

El-Hashim AZ, Renno WM, Raghupathy R, Abduo HT, Akhtar S, Benter IF. (2012) Angiotensin-(1-7) inhibits allergic inflammation, via the MAS1 receptor, through suppression of ERK1/2- and NF-kB-dependent pathways. *Br J Pharmacol*. 166:1964-1976.

Elizalde M, Rydén M, Van Harmelen V, Eneroth P, Gyllenhammar H, Holm C, Ramel S, Ölund A, Arner P, Andersson K. (2000) *Journal of lipid research*. 41: 1244-1251.

Endemann D. y Schifflin E. (2004) Endothelial dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrology*. 15: 1983-1992.

Engeli S, Böhnke J, Gorzelnik K, Janke J, Schling P, Bader M, Luft FC, Sharma AM. (2005) Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension*. 45:356-362.

Erusalimsky JD. y Kurz DJ. (2006) Endothelial cell senescence. *Handb Exp Pharmacol*. (176 Pt 2):213-48.

Erusalimsky JD. (2008) Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *J Appl Physiol*. 106:326-332.

Esteban V, Heringer-Walther S, Sterner-Kock A, Bruin R, Van den Engel S, Wang Y, Mezzano S, Egido J, Schultheiss H, Ortega-Ruiz M, Walther T. (2009) Angiotensin-(1-7) and the G-Protein-Coupled Receptor Mas are key players in renal inflammation. *PLoS ONE*. 4: e5406.

Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. (2004) Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 145:2273-82.

Fearon WF. y Fearon DT. (2008) Inflammation and cardiovascular disease: Role of the interleukin-1 receptor antagonist. *Circulation*. 117:2577-2579.

Feng X, Wang L, Li Y. (2011) Change of telomere length in angiotensin II-induced human glomerular mesangial cell senescence and the protective role of losartan. *Molecular medicina reports*. 4:255-260.

Fenton M, Barker S, Kurz DJ, Erusalimsky J. (2001) Cellular senescence after single and repeated balloon catheter denudations of rabbit carotid arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 21:220-226.

Fernandes L, Fortes ZB, Casarini DE, Nigro D, Tostes RC, Santos RA, de Carvalho MH. (2005) Role of PGI2 and effects of ACE inhibition on the bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) in resistance vessels of SHR. *Regul. Pept.*, 127:183-189.

Ferreira AJ, Santos RA, Almeida AP. (2001) Angiotensin-(1-7): cardioprotective effect in myocardial ischemia/reperfusion. *Hypertension*. 38: 665-668.

- Ferreira AJ, Jacoby BA, Araujo CA, Macedo FA, Silva GA, Almeida AP, Caliaro MV, Santos RA. (2007a) The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 292: H1113-H1119.
- Ferreira AJ, Oliveira TL, Castro MC, Almeida AP, Castro CH, Caliaro MV, Gava E, Kitten GT, Santos RA. (2007b) Isoproterenol-induced impairment of heart function and remodeling are attenuated by the nonpeptide angiotensin-(1-7) analogue AVE 0991. *Life Sciences*. 81: 916-923.
- Ferreira AJ, Shenoy V, Yamazato Y, Sriramula S, Francis J, Yuan L, Castellano RK, Ostrov DA, Oh SP, Katovich MJ, Raizada MK. (2009) Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 179:1048-1054.
- Ferrario CM, Martell N, Yunis C, Flack JM, Chappell MC, Brosnihan KB, Dean RH, Fernandez A, Novikov SV, Pinillas C, Luque M. (1998) Characterization of angiotensin-(1-7) in the urine of normal and essential hypertensive subjects. *Am J Hypertens*. 11:137-146.
- Ferrario CM. (2006) Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension*. 47: 515-521.
- Ferri C, Desideri G, Valenti M, Bellini C, Pasin M, Santucci A, De Mattia G. (1999) Early upregulation of endothelial adhesion molecules in obese hypertensive men. *Hypertension*. 34:568-573.
- Feterik K, Smith L, Katusic Z. (2000) Angiotensin-(1-7) causes endothelium-dependent relaxation in canine middle cerebral artery. *Brain research*. 873:75-82.
- Filippatos TD, Randevo HS, Derdemezis CS, Elisaf MS, Mikhailidis DP. (2010) Visfatin/PBEF and atherosclerosis-related diseases. *Curr Vasc Pharmacol*. 8:12-28.
- Fisher FM, McTernan PG, Valsamakis G, Chetty R, Harte AL, et al. (2002) Differences in adiponectin protein expression: effect of fat depots and type 2 diabetic status. *Horm Metab Res*. 34: 650-654.
- Forstermann U, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Kleinert H. (1995) Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochem Pharmacol*. 50:1321-1332.
- Forsyth NR, Wright WE, Shay JW. (2002) Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation*. 69:188-197.
- Fraga-Silva RA, Costa-Fraga FP, De Sousa FB, Alenina N, Bader M, Sinisterra RD, Santos RAS. (2011) An orally active formulation of angiotensin-(1-7) produces an antithrombotic effect. *Clinics (Sao Paulo)*. 66: 837-841.
- Frank P. y Lisanti M. (2008) ICAM-1: role in inflammation and in the regulation of vascular permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 295:H926-H927.
- Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM, Tallant A. (1996) Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension*. 28:104-108.
- Freund A, Orjalo AV, Desprez PY, Campisi J. (2010) Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med*. 16:238-46.
- Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. (2005) Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*. 07:426-430.
- Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K, Matsuki Y, Murakami M, Ichisaka T, Murakami H, Watanabe E, Takagi T, Akiyoshi M, Ohtsubo T, Kihara S, Yamashita S, Makishima M, Funahashi T, Yamanaka S, Hiramatsu R, Matsuzawa Y, Shimomura I. (2007) Retraction of Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*. 318:565.
- Furchgott RF y Zawadzki JV. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 288:373-376.
- Furumoto K, Inoue E, Nagao N, Hiyama E & Miwa N (1998). Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. *Life Sci*. 63: 935-948.
- Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. (2010) Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*. 316:129-139.
- Galkina E. y Ley K. (2007) Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 27: 1-10.
- Gallí M, Van Gool F, Leo O. (2011) Sirtuins and inflammation: friends or foes? *Biochemical pharmacology*. 81:569-576.
- Gálvez-Prieto B, Bolbrinker J, Stucchi P, de Las Heras AI, Merino B, Arribas S, Ruiz-Gayo M, Huber M, Wehland M, Kreutz R, Fernandez-Alfonso MS. (2008) Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. *J Endocrinol*. 197:55-64.
- Gao YT, Roman LJ, Martásek P, et al. (2007) Oxygen metabolism by endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 282:28557-28565.
- Garfinkel S, Brown S, Wessendorf JHM, Maciag T. (1994) Post-transcriptional regulation of interleukin 1 α in various strains of young and senescent human umbilical vein endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:1559-1563.

- Garrido A. y Griendling K. (2009) NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 302:148-158.
- Gava E, de Castro CH, Ferreira AJ, Colleta H, Melo MB, Alenina N, Bader M, Oliveira LA, Santos RA, Kitten GT. (2012) Angiotensin-(1-7) receptor Mas is an essential modulator of extracellular matrix protein expression in the heart. *Regulatory Peptides*. 175: 30-42.
- Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL. (2000) Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97:8010-8014.
- Ghosh DK, Abu-Soud HM, Stuehr DJ. (1996) Domains of macrophage N(O) synthase have divergent roles in forming and stabilizing the active dimeric enzyme. *Biochemistry*. 35:1444-1449.
- Ghosh S. y Karin M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, 109:S81-96.
- Giancchetti G, Sechi L, Rilli S, Carey R. (2005) The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolims and diabetes. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 16(3):120:126.
- Giani JF, Muñoz MC, Pons RA, Cao G, Toblli JE, Turyn D, Dominici FP. (2011) Angiotensin-(1-7) reduces proteinuria and diminishes structural damage in renal tissue of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 300:F272-F282.
- Gilmore TD y Temin HM. (1986) Different localization of the product of the v-rel oncogene in chicken fibroblasts and spleen cells correlates with transformation by REV-T. *Cell*. 44:791-800.
- Gilmore TD. (2006) Introduction to NF-kB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 25:6680-6684.
- Gironacci MM, Coba MP, Pena C. (1999) Angiotensin-(1-7) binds at the type 1 angiotensin II receptors in rat renal cortex. *Regulatory Peptides*. 84: 51-54.
- Gironacci M, Adamo P, Corradi G, Santos RA, Ortiz P, Carretero O. (2011) Angiotensin-(1-7) induces Mas receptor internalization. *Hypertension*. 58:176-181.
- Glass C. y Witztum J. (2001) Atherosclerosis: The road ahead. *Cell*. 104: 503-516.
- Gomes ER, Lara AA, Almeida PW, Guimaraes D, Resende RR, Campagnole, Santos MJ, Bader M, Santos RA, Guatimosim S. (2010) Angiotensin-(1-7) prevents cardiomyocyte pathological remodeling through a nitric oxide/guanosine 30,50-cyclic monophosphate-dependent pathway. *Hypertension* . 55: 153-160.
- Gonzales S, Noriega GO, Tomaro ML. (2002) Angiotensin-(1-7) stimulates oxidative stress in rat kidney. *Regulatory peptides*. 106:67-70.
- Gorlach A, Brandes R, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A. (2000) gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res*. 87:26-32.
- Gregor M. y Hotamisligil G. (2011) Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology*. 29: 415-445.
- Green L.C, Wagner D.A, Glogowski J, Skipper P.L, Wishnok J.S, Tannenbaum S.R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 126: 131-138.
- Green DR. y Evan G I. (2002) A matter of life and death. *Cancer Cell*. 1:19-30.
- Griendling K, Minieri C, Ollerenshaw J, Alexander R. (1994) Angiotensin II stimulates NADH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulating Research*. 74; 1141-1148.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 86:494-501.
- Griffith J, Comeau L, Rosenfield S, Stansel R, Bianchi A, Moss H, De Lange T. (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. 97:503-514.
- Grobe JL, Mecca AP, Lingis M, Shenoy V, Bolton TA, Machado JM, Speth RC, Raizada MK, Katovich MJ. (2007) Prevention of angiotensin II-induced cardiac remodeling by angiotensin-(1-7). *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 292:H736-42.
- Guzik T, Chen W, Gongora, M, Guzik, B, Lob, H, Mangalat, D, Hoch N, Dikalov S, Rudzinski, P, Kapelak, B, Sadowski J, and Harrison D. (2008) Calcium-dependent NOX5 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase contributes to vascular oxidative stress in human coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 52:1803-1809.
- Gwathmey TM, Pendergrass KD, Reid SD, Rose JC, Diz DI, Chappell MC. (2010) Angiotensin-(1-7)-angiotensin-converting enzyme 2 attenuates reactive oxygen species formation to angiotensin II within the cell nucleus. *Hypertension*. 55:166-171.
- Habib FM, Springall DR, Davies GJ, Oakley CM, Yacoub MH, Polak JM. (1996) Tumour necrosis factor and inducible nitric oxide synthase in dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 347: 1151-1155.
- Hackman A, Abe Y, Insull W, Pownall H, Smith L, Dunn K, Gotto AM, Ballantyne CM (1996). Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation*. 93:1334-1338.
- Harman D. (1994) .Free-radical theory of aging. Increasing the functional life span. *Ann N Y Acad Sci*. 717:1-15.
- Harmer D, Gilbert M, Borman R, Clark KL. (2002) Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Letters*. 532:107-110.

- Harvey E. y Ramji D. (2005) Interferon- γ and atherosclerosis: Pro-or anti-atherogenic? *Cardiovascular research*. 67: 11-20.
- Hasmann M. y Schemainda I. (2003) FK866, a highly specific noncompetitive inhibitor of nicotinamide phosphoribosyltransferase, represents a novel mechanism for induction of tumor cell apoptosis. *Cancer Res*. 63: 7436-7442.
- Hayflick L. y Moorhead PS. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 25:585-621.
- Hayflick L. (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1965.37:614-636.
- Hayden MS. y Ghosh S. (2008) Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell*.132:344-362.
- Heilbronn LK. y Campbell, LV. (2008) Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr Pharm Des*.14: 1225-1230.
- Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G. (2001) Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. *Hypertension*. 37:72-76.
- Heitzer T, Wenzel U, Hink U, Krollner D, Skatchkov M, Stahl R.A, MacHarzina R, Brasen J.H, Meinertz T, Munzel T. (1999) Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int*. 55: 252-260.
- Herbert KE, Mistry Y, Hastings R, Poolman T, Niklason L, Williams B. (2008) Angiotensin II-mediated oxidative DNA damage accelerates cellular senescence in cultured human vascular smooth muscle cells via telomere-dependent and independent pathways. *Circ Res*.102:201-208.
- Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. (2004) Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell*. 14:501-513.
- Heringer-Walther S, Batista EN, Walther T, Khosla MC, Santos R.A, Campagnole-Santos MJ. (2001) Baroreflex improvement in SHR after ACEinhibition involves angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 37: 1309-1314.
- Hernández Prada JA, Ferreira AJ, Katovich MJ, Shenoy V, Qi Y, Santos RA, Castellano RK, Lampkins AJ, Gubala V, Ostrov DA, Raizada MK. (2008) Structure-based identification of small-molecule angiotensin-converting enzyme 2 activators as novel antihypertensive agents. *Hypertension*. 51:1312-7.
- Ho C, Van der Veer E, Akawi O, Pickering JG. (2009) SIRT1 markedly extends replicative lifespan if the NAD⁺ salvage pathway is enhanced. *FEBS Letters*. 583:3081-3085.
- Höcht C, Gironacci MM, Mayer MA, Schuman M, Bertera FM, Taira CA. (2008) Involvement of angiotensin-(1-7) in the hypothalamic hypotensive effect of captopril in sinoaortic denervated rats. *Regul Pept*. 146:58-66.
- Höcht C, Mayer M, Taira C. (2009) Therapeutic Perspectives of Angiotensin-(1-7) in the Treatment of Cardiovascular Disease. *The Open Pharmacology Journal*. 3:21-31.
- Hoeksema HL, Van Diggelen OP, Galjaard H. (1979) Intergenic complementation after fusion of fibroblasts from different patients with β -galactosidase deficiency. *Biochimica et biophysica acta*. 566:72-79.
- Hollenberg, NK, Fisher ND, Price DA. (1998) Pathway for angiotensin II generation in intact human tissue. Evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension*. 32: 387-392.
- Hoogeveen AT, Verheijen FW, Galjaard H. (1983) The relation between human lysosomal β -galactosidase and its protective protein. *The journal of biological chemistry*. 258:12143-12146.
- Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. (1999) Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension*. 33: 613-621.
- Hsu CP, Oka S, Shao D, Hariharan N, Sadoshima J. (2009) Nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates cell survival through NAD⁺ synthesis in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2009. 105:481-491.
- Huang, PL. (2009) eNOS, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 20:295-302.
- Iademarco MF, McQuillan JJ, Rosen GD, Dean DC. (1992) Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *Journal of biological chemistry*. 267:16323-16329.
- Ibrahim MM. (2009) Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity reviews*. 11: 11-18.
- Ichiki T, Miyazaki R, Kamiharaguchi A, Hashimoto T, Matsuura H, Kitamoto S, Tokunou T, Sunagawa K. (2012) Resveratrol attenuates angiotensin II-induced senescence of vascular smooth muscle cells. *Regul Pept*. 177:35-39.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:9265-9269.
- Inagami T. (1999) Molecular biology and signaling of angiotensin receptors: an overview. *J Am Soc Nephrol*.10: S2-S7.
- Innocente SA, Abrahamson JL, Cogswell JP, y Lee JM (1999) p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 2147-2152.
- Imanishi T, Hano T, Nishio I. (2005) Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence

- through induction of oxidative stress. *J Hypertens*. 23:97-104.
- Imanishi T, Kobayashi K, Kuroi A, Ikejima H, Akasaka T. (2008) Pioglitazone inhibits angiotensin II-induced senescence of endothelial progenitor cell. *Hypertens Res*. 31:757-765.
- Inoue T, Croce K, Morooka T, Sukuma M, Node K, Simons D. (2011) Vascular inflammation and repair. *JACC: Cardiovascular interventions*. 4: 1057-1066.
- Itahana K, Dimri G, Campisi J. (2001) Regulation of cellular senescence by p53. *Eur.J. Biochem*. 268:2784-2791.
- Ito T, Ikeda U, Yamamoto K, Shimada K (2002) Regulation of interleukin-8 expression by HMG-CoA reductase inhibitors in human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 165: 51–55.
- Iwata M, Cowling RT, Gurantz D, Moore C, Zhang S, Yuan JX, Greenberg BH. (2005) Angiotensin-(1–7) binds to specific receptors on cardiac fibroblasts to initiate antifibrotic and antitrophic effects. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 289: H2356–H2363.
- Jackson JG. y Pereira-Smith OM. (2006) p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and GADD45 during replicative senescence of normal human fibroblasts. *Cancer Res*. 66:8356–8360.
- Javaid K, Rahman A, Anwar KN, Frey RS, Minshall RD, Malik AB. (2003) Tumor necrosis factor-alpha induces early-onset endothelial adhesivity by protein kinase Czeta-dependent activation of intercellular adhesion molecule. *Circ Res* 92: 1089–1097.
- Jawien J, Toton-Zuranska J, Kus K, Pawlowska M, Olszanecki R, Korbut R. (2012) The effect of AVE 0991, nebivolol and doxycycline on inflammatory mediators in an apoE-knockout mouse model of atherosclerosis. *Med Sci Monit*. 18:BR389-393
- Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM, and Corvol P. (1992) Molecular basis of human hypertension: Role of angiotensinogen. *Cell* .71: 169-180.
- Jiang B, Xu S, Hou X, Pimentel DR, Brecher P, Cohen RA. (2004a) Temporal control of NF-kappaB activation by ERK differentially regulates interleukin-1beta-induced gene expression. *J Biol Chem*. 279:1323-1329.
- Jiang B, Xu S, Hou X, Pimentel DR, Cohen RA. (2004b) Angiotensin II differentially regulates interleukin-1-beta-inducible NO synthase (iNOS) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression: role of p38 MAPK. *J Biol Chem*. 279:20363-20368.
- Jiang F, Lim HK, Morris MJ, Prior L, Velkoska E, Wu X, Dusting GJ. (2011) Systemic upregulation of NADPH oxidase in diet-induced obesity in rats. *Redox Rep*.16:223-229.
- Jiang T, Gao L, Guo J, Lu J, Wang Y, Zhang Y. (2012) Suppressing inflammation by inhibiting the NF-kB pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischaemia. *British journal of pharmacology*. 167:1520-1532.
- Jiao S, Meng F, Zhang J, Yang X, Zheng X, Wang L. (2012a) STAT1 mediates cellular senescence induced by angiotensin II and H₂O₂ in human glomerular mesangial cells. *Mol Cell Biochem*.365:9-17.
- Jiao S, Zheng X, Yang X, Zhang J, Wang L. (2012b) Losartan inhibits STAT1 activation and protects human glomerular mesangial cells from angiotensin II induced premature senescence. *Can J Physiol Pharmacol*. 90:89-98.
- Jiménez-Altayó F, Briones A, Giraldo J, Planas A, Salaices M, Vila E. (2006) Increased superoxide anion production by interleukin-1 β impairs nitric oxide-mediated relaxation in resistance arteries. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 316:42-52.
- Jin H-Y, Song B, Oudit GY, Davidge ST, Yu H-M, Jiang Y-Y, Gao P-J, Zhu D-L, Guang N, Kassiri Z, Penninger JM, Zhong J-C. (2012) ACE2 Deficiency Enhances Angiotensin II-Mediated Aortic Profilin-1 Expression, Inflammation and Peroxynitrite Product. *PLoS ONE* 7(6): e38502.
- Jones BH, Standridge MK, Moustaid N. (1997) Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology*. 138: 1512–1519.
- Juge-Aubry CE, Henrichot E, Meier CA. (2005) Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 9:547- 566.
- Kalupahana NS y Moustaid-Moussa N. (2012) The adipose tissue reninangiotensin system and metabolic disorders: a review of molecular mechanisms. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 47:379-390.
- Kamino H, Hiratsuka M, Toda T, Nishigaki R, Osaki M, Ito H, Inoue T, Oshimura M. (2003) Searching for genes involved in arteriosclerosis: proteomic analysis of cultured human umbilical vein endothelial cells undergoing replicative senescence. *Cell Struct Funct*. 28: 495–503.
- Karin M. y Ben-Neriah Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol*.18: 621–663.
- Kaur J, Dhaunsi G, Tuner R, (2002) Interleukin-1 and nitric oxide increase NADPH oxidase activity in human coronary artery smooth muscle cells. *Med Princ Pract*.13:26-29.
- Kawakami A, Aikawa M, Alcaide P, Luscinskas FW, Libby P, Sacks FM. (2006) Apolipoprotein CIII induces expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vascular endothelial cells and increases adhesion of monocytic cells. *Circulation*. 114:681– 687.

- Khan BV, Parthasarathy SS, Alexander RW, Medford RM. (1995) Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 95:1262–1270.
- Khan B, Harrison D, Olbrych R, Alexander W, Medford R. (1996) Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 9114-9119.
- Kempe S, Kestler H, Lasar A, Wirth T. (2005) NF- κ B controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program. *Nucleic acids research.* 33:5308-5319.
- Kilarkaje N, Yousif MH, El-Hashim AZ, Makki B, Akhtar S, Benter IF. (2013) Role of angiotensin II and angiotensin-(1-7) in diabetes-induced oxidative DNA damage in the corpus cavernosum. *Fertil Steril.* 2013:1-8.
- Kim SR, Bae YH, Bae SK, Choi KS, Yoon KH, Koo TH, Jang HO, Yun I, Kim KW, Kwon YG, Yoo MA, Bae MK. (2008) Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 1783:886-895.
- Kim JH, Yu YS, Cho CS, Kim KW. (2009a) Blockade of angiotensin II attenuates VEGF-mediated blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *Journal of cerebral blood flow and metabolism.* 29: 621-628.
- Kim KS, Kang KW, Seu YB, Baek SH, Kim JR. (2009b) Interferon- γ induces cellular senescence through p53-dependent DNA damage signaling in human endothelial cells. *Mechanisms of Ageing and Development.* 130:179–188.
- Kim HJ, Ham SA, Kim MY, Hwang JS, Lee H, Kang ES, Yoo T, Woo IS, Yabe-Nishimura C, Paek KS, Kim JH, Seo HG. (2011) PPAR δ coordinates angiotensin II-induced senescence in vascular smooth muscle cells through PTEN-mediated inhibition of superoxide generation. *J Biol Chem.* 286:44585-44593.
- Kim MY, Kang ES, Ham SA, Hwang JS, Yoo TS, Lee H, Paek KS, Park C, Lee HT, Kim JH, Han CW, Seo HG. (2012) The PPAR δ -mediated inhibition of angiotensin II-induced premature senescence in human endothelial cells is SIRT1-dependent. *Biochem Pharmacol.* 84:1627-1634.
- Kirii H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y, Asano M, Moriwaki H, Seishima M. (2003) Lack of interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:656-60.
- Kirkland J. (2010) Minireview: Poly ADP-ribose polymerase-1 and health. *Exp Biology and Medicine.* 235:661-668.
- Kitamoto S, Ishibashi M et al. (2004) Monocyte chemoattractant protein- 1 is an essential inflammatory mediator in angiotensin II-induced progression of established atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 24: 534–39.
- Klusens LD, Nelemans SA, Rink R, de Vries L, Meter-Arkema A, Wang Y, Walther T, Kuipers A, Moll GN, Haas M. (2009) Angiotensin-(1-7) with thioether bridge: an angiotensin-converting enzyme-resistant, potent angiotensin-(1-7) analog. *J Pharmacol Exp Ther.* 328:849-854.
- Knowles RG. y Moncada S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 298:249–258.
- Kolb H. y Mandrup-Poulsen T. (2005) An immune origin of type 2 diabetes? *Diabetologia.* 48:1038–1050.
- Kong Y, Cui H, Ramkumar C, Zhang H. (2011) Regulation of senescence in cancer and aging. *Journal of aging research.* 2011:1-15.
- Kopf M, Bachmann MF, Marsland BJ. (2010) Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nature reviews drug discovery.* 9:703-718.
- Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS. (1992) Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol* 5: 834–842.
- Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R. (2006) Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol.* 8:877-884.
- Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, Gembardt F, Kellett E, Martini L, Vanderheyden P, Schultheiss HP, Walther T. (2005) G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation.* 111:1806-1813.
- Kranzhöfer R, Schmidt J, Pfeiffer C, Hagl S, Libby P, Kübler W. (1999) Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19: 1623-1629.
- Kröncke K, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. (1998) Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol.* 113: 147-156.
- Krouwer VJ, Hekking LH, Langelaar-Makkinje M, Regan-Klapisz E, Post JA. (2012) Endothelial cell senescence is associated with disrupted cell-cell junctions and increased monolayer permeability. *Vasc Cell.* 4:12.
- Kucharewicz I, Chabielska E, Pawlak D, Matys T, Rólkowski R, Buczek W. (2000) The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) closely resembles that of losartan. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 1:268-272.
- Kucharewicz I, Pawlak R, Matys T, Pawlak D, Buczek W. (2002) Antithrombotic effect of captopril and losartan

- is mediated by angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 40: 774-779.
- Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LCW, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peeper DS (2008) Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell*.133:1019-103.
- Kunieda T, Minamino T, Nishi J, Tateno K, Oyama T, Katsuno T, Miyauchi H, Orimo M, Okada S, Takamura M, Nagai T, Kaneko S, Komuro I. (2006) Angiotensin II induces premature senescence of vascular smooth muscle cells and accelerates the development of atherosclerosis via a p21-dependent pathway. *Circulation*. 114:953-960.
- Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. (2000) Senescence-associated β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of cell science*. 113:3613-3222.
- Kurz DJ, Decay S, Hong Y, Trivier E, Akhmedov A, Erusalimsky J. (2004) Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *Journal of cell science*. 117: 2417-2426.
- Lafuente N, Matesanz N, Azcutia V, Romacho T, Nevado J (2008) The deleterious effect of high concentrations of D-glucose requires pro-inflammatory preconditioning. *J Hypertens*. 26:478-485.
- Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H. (2002) Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: Role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation*. 106: 3073-3078.
- Landmesser U, Hornig B, Drexler H. (2004) Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*. 109:1127-33.
- Lane DP. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 358: 15-16.
- Lansdrop P. (1995)Telomere length and proliferation potential of hematopoietic stem cells. *Journal of cell science*.108:1-6.
- Lassègue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant S.L, Lambeth J.D, Griending K.K. (2001). Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ. Res*. 88: 888-894.
- Lassègue B. y Clempus R. (2003) Vascular NAD(P)H oxidases:specific features, expression and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 285: R277-R297.
- Lavoie J. y Sigmund C. (2003) Minireview: Overview of the Renin-Angiotensin System-An Endocrine and Paracrine System. *Endocrinology*. 144:2179-2183.
- Leal Oliveira V y Mafrá D. (2013) Adipokines in obesity. *Clinica chimica acta*. 419: 87-94.
- Lee RM, Lu C, Su LY, Gao YJ. (2009) Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue. *J Hypertension*. 27:782-790.
- Lee RM, Bader M, Alenina N, Santos RA, Gao YJ, Lu C. (2011) Mas receptors in modulating relaxation induced by perivascular adipose tissue. *Life Sci*. 89:467-472.
- Lemos VS, Silva DM, Walther T, Alenina N, Bader M, Santos RA. (2005) The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 46: 274-279.
- Lener B, Kozielec R, Pircher H, Hütter E, Greussing R, Herndlner-Brandstetter D, Hermann M, Unterluggauer H, Jansen-Dürr P. (2009) The NADPH oxidase Nox4 restricts the replicative lifespan of human endothelial cells. *Biochem J*. 423:363-74.
- Lerman A y Zeiher A. (2005) Endothelial function: cardiac events. *Circulation*. 111:363-368.
- Levy M, Allsopp R, Futcher B, Greider C, Harley CB. (1992) Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol. Biol*. 225: 951-960.
- Li Y, Zhang Y, Dorweilwe B, Wang T, Woo CW, Brunkan CS, Wolberger C, Imai S, Tabas I. (2008) Extracellular Nalp1 promotes macrophage survival via a nonenzymatic interleukin-6/STAT3 signaling mechanism. *J Biol Chem*. 283:34833-34843.
- Li XC. y Zhuo JL. (2008) Nuclear factor-kB as a hormonal intracellular signaling molecule: focus on angiotensin II-induced cardiovascular and renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens*.17:37-43.
- Li H, Liu Q, Wang N, Xu J. (2011) Correlation of Different NADPH Oxidase Homologues with Late Endothelial Progenitor Cell Senescence Induced by Angiotensin II: Effect of Telmisartan. *Intern Med*. 50:1631-1642.
- Li Y, Mouche S, Sajic T, Veyrat-Durebex C, Supale R, Pierroz D, Ferrari S, Negro F, Hasler U, Feraille E, Moll S, Meda P, Deffert C, Montet X, Krause KH, Szanto I (2012). Deficiency in the NADPH oxidase 4 predisposes towards diet-induced obesity. *Int J Obes*. 36:1503-1513.
- Liang B, Yang Z-M, Zhang N-N, Yang H-Y, Kang Y-M, Xiao C-S. (2009) Influence of angiotensin-(1-7) on the secretion of MCP-1 and ICAM-1 in cultured human umbilical vein cells induced by angiotensin II. *Chin J Pathophysiol*. 25: 1319-1324.
- Libby P. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-874.
- Libby P, Ridker P, Hansson G. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 473:317-325.

- Lima CV, Paula RD, Resende FL, Khosla MC, Santos RAS. (1997) Potentiation of the hypotensive effect of bradykinin by short-term infusion of angiotensin-(1-7) in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 30:542-548.
- Lin WW. y Karin M. (2007) A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 117:1175-1183.
- Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. (1997) Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*. 276:561-567.
- Liu J, Yang F, Yang XP, Jankowski M, Pagano PJ. (2003) NAD(P)H oxidase mediates angiotensin II-induced vascular macrophage infiltration and medial hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23:776-82.
- Liu SW, Qiao SB, Yuan JS, Liu DQ. (2009) Visfatin stimulates production of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-6 in human vein umbilical endothelial cells. *Horm Metab Res*. 41:281-286.
- Liu C, Lv XH, Li HX, Cao X, Zhang F, Wang L, Yu M, Yang JK. (2012) Angiotensin-(1-7) suppresses oxidative stress and improves glucose uptake via Mas receptor in adipocytes. *Acta Diabetol*. 49:291-299.
- Linzer DI y Levine AJ. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. 17: 43-52.
- Lovren F, Pan Y, Quan A, Teoh H, Wang G, Shukla P, Levitt K, Oudit G, Al-Omran M, Stewart D, Slutsky A, Peterson M, Backx P, Penninger J, Verma S. (2008) Angiotensin converting enzyme-2 confers endothelial protection and attenuates atherosclerosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 295, H1377-H1384.
- Lu C, Zhao AX, Gao YJ, Lee RM. (2011) Modulation of vein function by perivascular adipose tissue. *Eur J Pharmacol*. 657:111-116.
- Lu T. y Finkel T. (2008). Free radicals and senescence. *Exp Cell Res*. 314: 1918-1922.
- Lusis A. (2010) *Atherosclerosis*. *Nature*. 407:233-241.
- Maciag T, Hoover GA, Stemerman MB, Weinstein R. (1981) Serial propagation of human endothelial cells in vitro. *J Cell Biol*. 91:420-426.
- Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Mizuno K, Matsuzawa Y, Matsubara K. (1997) Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene*. 190:227-235.
- Magaldi AJ, Cesar KR, de Araújo M, Simões e Silva AC, Santos RA. (2003) Angiotensin-(1-7) stimulates water transport in rat inner medullary collecting duct: evidence for involvement of vasopressin V2 receptors. *Pflugers Arch*. 447:223-230.
- Marchesi C, Paradis P, Schiffrin E. (2008) Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences*. 29:7.
- Marcus Y, Shefer G, Sasson K, Kohen F, Limor R, Pappo O, Nevo N, Biton I, Bach M, Berkutzki T, Fridkin M, Benayahu D, Shechter Y, Stern N. (2013) Angiotensin 1-7 as means to prevent the metabolic syndrome: lessons from the fructose-fed rat model. *Diabetes*. 62:1121-1130.
- Marcotte R, Lacelle C, Wang E. (2004) Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. *Mech. Ageing Dev*. 125: 777-783.
- Mariman EC. y Wang P. (2010) Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci*. 67:1277-1292.
- Mariotti M, Castiglioni S, Bernardini D, Maier JAM. (2006) Interleukin 1 alpha is a marker of endothelial cellular senescent. *Immunity and ageing*. 3:4.
- Marques FD, Ferreira AJ, Sinisterra RD, Jacoby BA, Sousa FB, Caliani MV, Silva GA, Melo MB, Nadu AP, Souza LE et al. (2011) An oral formulation of angiotensin-(1-7) produces cardioprotective effects in infarcted and isoproterenol-treated rats. *Hypertension*. 57: 477-483.
- Martin G, Dol F, Mares AM et al. (2004) Lesion progression in apoE-deficient mice: implication of chemokines and effect of the AT1 angiotensin II receptor antagonist irbesartan. *J Cardiovasc Pharmacol*. 43: 191-99.
- Martinet W, Knaapen MWM, De Meyer GRY, Herman AG, Kockx MM. (2002) Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerosis plaques. *Circulation*. 106:927-932.
- Marui N, Offermann MK, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM (1993). Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest*. 92:1866-1874.
- Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, Brooks MW, Kaneko S, Murakami S, DeCaprio JA, Weinberg RA, Stewart SA, Hahn WC. (2003) Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell*. 114:241-253.
- Mateo T, Abu Nabah YN, Abu Taha M, Mata M, Cerdá-Nicolás M, Proudfoot AE, Stahl RA, Issekutz AC, Cortijo J, Morcillo EJ, Jose PJ, Sanz MJ. (2006) Angiotensin II-induced mononuclear leukocyte interactions with arteriolar and venular endothelium are mediated by the release of different CC chemokines. *J Immunol*. 176:5577-5586.
- Mateo T, Naim Abu Nabah Y, Losada M, Estellés R, Company C, Bedrina B, Cerdá-Nicolás JM, Poole S, Jose PJ, Cortijo J, Morcillo EJ, Sanz MJ. (2007) A critical role for TNFalpha in the selective attachment of

- mononuclear leukocytes to angiotensin-II-stimulated arterioles. *Blood*. 110:1895-1902.
- Matsushita H, Chang E, Glassford AJ, Cooke JP, Chiu CP, Tsao PS. (2001) eNOS activity is reduced in senescent human endothelial cells: Preservation by hTERT immortalization. *Circ Res*. 89: 793–798.
- Mattagajasingh I, Kim CS, Naqvi A, Yamamori T, Hoffman TA, Jung SB, DeRicco J, Kasuno K, Irani K. (2007) SIRT1 promotes endothelium-dependent vascular relaxation by activating endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:14855–14860.
- Matthys K. y Bult H. (1997) Nitric oxide function in atherosclerosis. *Mediators of inflammation*. 6:3-21.
- McCullum LT, Gallagher E, Tallant EA. (2008) Angiotensin-(1-7) Attenuates Cardiac Fibrosis and Vascular Hypertrophy in a Model of Angiotensin II-Dependent Hypertension. *Hypertension*. 52:e34.
- McEachern MJ, Krauskopf A, Blackburn EH. (2000) Telomeres and their control. *Annu Rev Genet*. 34:331-358.
- Meaburn KJ, Cabuy E, Bonne G, Levy N, Morris GE, Novelli G, Kill IR, Bridger JM. (2007) Primary laminopathy fibroblasts display altered genome organization and apoptosis. *Aging Cell*. 6:139-153.
- Mecca AP, Regenhardt RW, O'connor TE, Joshep JP, Raizada MK, Katovich MJ, Sumners C. (2011) Cerebroprotection by angiotensin (1-7) in endothelin-1 induced ischemic stroke. *Exp Physiol*. 96:1084-96.
- Meek DW. (2004) The p53 response to DNA damage. *DNA repair (Amst)*. 3:1049-56.
- Mercure C, Yogi A, Callera G, Aranha A, Bader M, Ferreira A, Santos R, Walther T, Touyz R, Reudelhuber T. (2008) Angiotensin (1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. *Circ.Res*. 103:1319-1326.
- Mehta IS, Figgitt M, Clements CS, Kill IR, Bridger JM. Ann NY. (2007) Alterations to nuclear architecture and genome behavior in senescent cells. *Acad Sci*. 1100:250-263.
- Michan S. y Sinclair D. (2007) Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*. 404:1–13.
- Miller FJ Jr, Filali M, Huss GJ, Stanic B, Chamseddine A, Barna TJ, Lamb FS. (2007) Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and C1C-3. *Circ Res*. 101:663-671.
- Min LJ, Mogi M, Iwanami J, Li JM, Sakata A, Fujita T, Tsukuda K, Iwai M, Horiuchi M. (2007) Cross-talk between aldosterone and angiotensin II in vascular smooth muscle cell senescence. *Cardiovasc Res*. 76:506-516.
- Min LJ, Mogi M, Iwanami J, Li JM, Sakata A, Fujita T, Tsukuda K, Iwai M, Horiuchi M. (2008) Angiotensin II type 2 receptor deletion enhances vascular senescence by methyl methanesulfonate sensitive 2 inhibition. *Hypertension*. 51:1339-1344.
- Min LJ, Mogi M, Iwanami J, Jing F, Tsukuda K, Ohshima K, Horiuchi M. (2012) Angiotensin II type 2 receptor-interacting protein prevents vascular senescence. *J Am Soc Hypertens*. 6:179-184.
- Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I. (2002) Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation*. 105:1541-1544.
- Minamino T, Yoshida T, Tateno K, Miyauchi H, Zou Y, Toko H, Komuro I. (2003) Ras induces vascular smooth muscle cell senescence and inflammation in human atherosclerosis. *Circulation*. 108:2264–2269.
- Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, Nojima A, Nabetani A, Oike Y, Matsubara H, Ishikawa F, Komuro I. (2009) A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat. Med*. 15:1082–1087.
- Miura S, Karnik S, Saku K. (2011) Angiotensin II type 1 receptor blockers: class effects versus molecular effects. *Journal of Renin-angiotensin-Aldosterone System*. 12:1-7
- Miyauchi H, Minamino T, Tateno K, Kunieda T, Toko H, Komuro I. (2004) Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway. *EMBO J*. 23:212–220.
- Miyazaki R, Ichiki T, Hashimoto T, Inanaga K, Imayama I, Sadoshima J, Sunagawa K. (2008) SIRT1, a longevity gene, downregulates angiotensin II type 1 receptor expression in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 28:1263-1269.
- Moiseeva O, Mallette FA, Mukhopadhyay UK, Moores A, Ferbeyre G. (2006) DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged β -interferon stimulation. *Mol. Biol. Cell* 17:1583-1592.
- Moon JY, Tanimoto M, Gohda T, Hagiwara S, Yamazaki T, Ohara I, Murakoshi M, Aoki T, Ishikawa Y, Lee SH, Jeong KH, Lee TW, Ihm CG, Lim SJ, Tomino Y. (2011) Attenuating effect of angiotensin-(1-7) on angiotensin II-mediated NAD(P)H oxidase activation in type 2 diabetic nephropathy of KK-A(y)/Ta mice. *Am J Physiol Renal Physiol*. 300:F1271-1282.
- Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, Tilg H. (2007) Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J. Immunol*. 178: 1748–1758.
- Muller DN, Dechend R, Mervaala EM, Park JK, Schmidt F, Fiebeler A, Theuer J, Breu V, Ganten D, Haller H, Luft FC. (2000) NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension*. 35(1 Pt 2):193-201.

- Muller DN, Heissmeyer V, Dechend R, Hampich F, Park JK, Fiebeler A, Shagdarsuren E, Theuer J, Elger M, Pilz B, Breu V, Schroer K, Ganten D, Dietz R, Haller H, Scheidereit C, Luft FC. (2001) Aspirin inhibits NF-kappaB and protects from angiotensin II-induced organ damage. *FASEB J.* 15:1822-1824.
- Murata Y, Wakoh T, Uekawa N, Sugimoto M, Asai A, Miyazaki T, Maruyama M. (2006) Death-associated protein 3 regulates cellular senescence through oxidative stress response. *FEBS Lett.* 580:6093–6099.
- Nakajima M, Hashimoto M, Wang F, Yamanaga K, Nakamura N, Uchida T, Yamanouchi K. (1997) Aging decreases the production of PGI2 in rat aortic endothelial cells. *Exp Gerontol.* 32:685– 693.
- Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. (1998) Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18: 842–851.
- Narita M, Núñez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW. (2003) Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 113:703–716.
- Nguyen Dih Cat A, Montezano AC, Buger D, Touyz R. (2012) Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature. *Antioxidants and redox signaling.*
- Nishida M, Kitajima N, Saiki S, Nakaya M, Kurose H. (2011) Regulation of Angiotensin II receptor signaling by cysteine modification of NF-kB. *Nitric Oxide.* 25:112–117.
- Norden AGW, Tennant LL, O'Brien O. (1974) G_{M1} ganglioside β-galactosidase A. *The journal of biological chemistry.* 249:7969-7976.
- Noronha BT, Li J-M, Wheatcroft SB, Shah AM, Kearney MT. (2005) Inducible nitric oxide synthase has divergent effects on vascular and metabolic functions in obesity. *Diabetes.* 54:1082-1089.
- Ntaios G, Gatselis N, Makaritsis K, Delekos G. (2013) Adipoquines as mediators of endothelial function and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 227: 216-221.
- Oeckinghaus A, Hayden M. y Ghosh S. (2011) Crosstalk in NF-κB signaling pathways. *Nature immunology.* 12: 695-708.
- Ohtani N, Yamakoshi K, Takahashi A, Hara E. (2004) The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. *J Med Invest.* 51:146-153.
- Olofsson PS, Sheikine Y, Jatta K, Ghaderi M, Samnegård A, Eriksson P, Sirsjö A (2009). A functional interleukin-1 receptor antagonist polymorphism influences atherosclerosis development. The interleukin-1beta:interleukin-1 receptor antagonist balance in atherosclerosis. *Circ J.* 73:1531-1536.
- Olovnikov AM. (1996) Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp Gerontol.* 31:443-448.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2011). http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Glob al_Obesity_BothSexes_2008.png.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2012). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>.
- Orjalo AV, Bhaumik D, Gengler BK, Scott GK, Campisi J. (2009) Cell surface-bound IL-1 is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:17031-17036.
- Osei S, Ahima R, Minkes R, Weaver J, Khosla M, Kadowitz P. (1993) Differential responses to angiotensin –(1-7) in the feline mesenteric and hindquarters vascular beds. *European Journal of Pharmacology.* 234:35-42.
- Ota H, Eto M, Kano MR, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y. (2008) Cilostazol inhibits oxidative stress-induced premature senescence via upregulation of Sirt1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:1634–1639.
- Oudot A, Vergely C, Ecartot-Laubriet A, Rochette L. (2005) Pharmacological concentration of angiotensin-(1-7) activates NADPH oxidase after ischemia-reperfusion in rat heart through AT₁ receptor stimulation. *Regulatory peptides.* 127:101-110.
- Pahl HL. (1999) Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 18:6853–6866.
- Pammer J, Reinisch C, Birner P, Pogoda K, Sturzl M, Tschachler E. (2006). Interferon-alpha prevents apoptosis of endothelial cells after short-term exposure but induces replicative senescence after continuous stimulation. *Lab. Invest.* 86, 997–1007.
- Pan Q, Yang X.H, Cheng X. (2009) Angiotensin II stimulates MCP-1 production in rat glomerular endothelial cells via NADPH oxidase-dependent nuclear factor-kappa B signaling. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 42: 531-536.
- Pang JH. y Chen KY. (1994) Global change of gene expression at late G1/S boundary may occur in human IMR-90 diploid fibroblasts during senescence. *J. Cell Physiol.* 160: 531–538.
- Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE Jr, Epstein SE (1990) Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med.* 323: 22–27.
- Park JB, Charbonneau F, Schiffrin EL. (2001) Correlation of endothelial function in large and small arteries in human essential hypertension. *J Hypertens.* 19: 415–420.
- Park J, Choi HM, Yang H-I, Yoo MC, Kim KS. (2012) Increased expression of IL-1 receptors in response to IL-1β may produce more IL-6, IL-8, VEGF, and PGE2 in senescent synovial cells induced in vitro than in presenescent cells. *Rheumatol Int.* 32:2005–2010.

- Pastore L, Tessitore A, Martinotti S, Toniato E, Alesse E, Bravi MC, Ferri C, Desideri G, Gulino A, Santucci A. (1999) Angiotensin II stimulates intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human vascular endothelial cells and increases soluble ICAM-1 release in vivo. *Circulation*. 100:1646-1652.
- Paula RD, Lima CV, Khosla MC, Santos RA. (1995) Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension*. 26:1154-1159.
- Peiró C, Matesanz N, Nevado J, Lafuente N, Cercas E, Azcutia V, Vallejo S, Rodríguez-Manas L, Sanchez-Ferrer CF. (2003) Glycosylated human oxyhaemoglobin activates nuclear factor-kappaB and activator protein-1 in cultured human aortic smooth muscle. *Br J Pharmacol*. 140:681-690.
- Peiró C, Vallejo S, Gembardt F, Azcutia V, Heringer-Walther S, Rodríguez-Mañas L, Schultheiss H-P, Sanchez-Ferrer CF, Walther T. (2007) Endothelial dysfunction through genetic deletion or inhibition of the G protein-coupled receptor Mas-a new target to improve endothelial function. *Journal of Hypertension*. 25:2421-2425.
- Peiró C, Romacho T, Carraro R, Sánchez-Ferrer CF. (2010) Visatin/PBEF/Nampt: A new cardiovascular target? *Frontiers pharmacol*. 1:1-7.
- Peiró C, Vallejo S, Gembardt F, Palacios E, Novella S, Azcutia V, Rodríguez-Mañas L, Hermenegildo C, Sánchez-Ferrer CF, Walther T. (2013) Complete blockade of the vasorelaxant effects of angiotensin-(1-7) and bradykinin in murine microvessels by antagonists of the receptor Mas. *J Physiol*. 1:2275-2285.
- Perreault M. y Marette A. (2001) Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nature medicine*. 7:1138-1143.
- Pickup JC. (2004) Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27:813-823.
- Pinheiro SV, Simoes e Silva AC, Sampaio WO, de Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED, Pesquero JB, Walther T, Alenina N, Bader M et al. (2004) Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension*. 44: 490-496.
- Polizio H, Gironacci M, Tomaro M, Peña C. (2007) Angiotensin-(1-7) blocks the angiotensin II-stimulated superoxide production. *Pharmacological Research*. 56:86-90.
- Pradhan AD, Rifai N, Ridker PM. (2002) Soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble vascular adhesion molecule-1, and the development of symptomatic peripheral arterial disease in men. *Circulation*. 106: 820-825.
- Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, Savoie F, Arnal JF, Michel JB. (2000) Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappaB activation induced by intracellular oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 20:645-651.
- Rabelo LA, Xu P, Todiras M, Sampaio WO, Buttgerit J, Bader M, Santos RA, Alenina N. (2008) Ablation of angiotensin (1-7) receptor Mas in C57Bl/6 mice causes endothelial dysfunction. *J Am Soc Hypertens*. 2:418-424.
- Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 97:1916-1923.
- Ramirez RD, Morales CP, Herbert BS, Rohde JM, Passons C, Shay JW, Wright WE. (2001). Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev*. 15: 398-403.
- Rao RM, Yang L, García-Cadena G, Lusinskas FW. (2007) Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ. Res*. 101:234-247.
- Regenhardt RW, Desland F, Mecca AP, Pioquinto DJ, Afzal A, Mocco J, Sumners C. (2013) Anti-inflammatory effects of angiotensin-(1-7) in ischemic stroke. *Neuropharmacology*. 71C:154-163.
- Ren Y, Garvin JL, Carretero OA. (2002) Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension*. 39:799-802.
- Revollo JR, Grimm AA, Imai S. (2004) The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem*. 279:50754-50763.
- Revollo JR, Körner A, Mills KF, Satoh A, Wang T, Garten A, Dasgupta B, Sasaki Y, Wolberger C, Townsend RR, Milbrandt J, Kiess W, Imai S. (2007) Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab*. 6:363-375.
- Rey FE, Li XC, Carretero OA, Garvin JL, Pagano PJ. (2002) Perivascular superoxide anion contributes to impairment of endothelium-dependent relaxation: role of gp91(phox). *Circulation*. 106:2497-502.
- Rheinwald JG, Hahn WC, Ramsey MR, Wu JY, Guo Z, Tsao H, De Luca M, Catricala C, O'Toole KM. (2002). A two-stage, p16(INK4A)- and p53-dependent keratinocyte senescence mechanism that limits replicative potential independent of telomere status. *Mol Cell Biol*. 22:5157-5172.
- Ribeiro-Oliveira A, Nogueira R, Vilas W, Souza R, Simoes A. (2008) The rennin-angiotensin system and diabetes: An update. *Vascular Health and Risk Management*. 4: 787-803.
- Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. (1998) Plasma concentration of

soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 351: 88–92.

Rodier F, Coppe J-P, Paril CK, Hoeijmakers WAM, Munoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J. (2009) Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 11:973-979.

Romacho T, Azcutia V, Vázquez-Bella M, Matesanz N, Cercas E, Nevado J, Carraro R, Rodríguez-Mañas L, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C. (2009) Extracellular PBEF/NAMPT/visfatin activates pro-inflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity *Diabetologia*. 52:2455-2463.

Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. (2006) The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clinical endocrinology*. 64: 355-365.

Ross R. (1999) Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am. Heart J.* 138: S419–S420.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Egido J. (2000) Angiotensin II increases MCP-1 and activates NF-kappaB and AP-1 in cultured mesangial and mononuclear cells. *Kidney Int.* 57: 2285–2298

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Esteban V, Suzuki Y, Mezzano S, Plaza J.J, Egido J. (2001) Role of the Renin-Angiotensin System in Vascular Diseases: Expanding the Field. *Hipertensión*. 38: 1382-1387.

Russell ME, Wallace AF, Wyner LR et al. (1995) Upregulation and modulation of inducible nitric oxide synthase in a rat cardiac allograft with chronic rejection. *Circulation*. 92:457-464.

Russell R. (1999) Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 340:115-126.

Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. (2003) Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res*. 93:280-291.

Sabin RJ. y Anderson RM. (2011) Cellular senescence-its role in cancer and the response to ionizing radiation. *Genome Integr*. 2011; 2-7.

Salminen A, Ojala J, Kaamiranta K, Haapasalo A, Hiltunen M, Soininen H. (2011) Astrocytes in the aging brain express characteristics of senescence-associated secretory phenotype. *Eur J Neurosci*. 34:3–11.

Samal B, Sun Y, Stearns G, Xie C, Suggs S, McNiece I. (1994) Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol Cell Biol*. 14:1431-1437.

Sampaio WO, Nascimento AA, Santos RA. (2003) Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1–7) in rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 284: H1985–H1994.

Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM (2007a) Angiotensin-(1–7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension*. 49: 185–192.

Sampaio WO, De Castro CH, Santos RA, Schiffrin EL, Touyz RM. (2007b) Angiotensin-(1-7) contrarregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. *Hypertension*. 50:1093-1098.

Santos RA, Brosnihan KB, Chappell MC, Pesquero J, Chernicky CL, Greene LJ, Ferrario CM. (1988) Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem. *Hypertension*. 11:153-157.

Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Baracho NCV, Fontes MAP, Silva LCS, Neves LAA, Oliveira DR, Caligiorne SM, Rodrigues ARV, Gropen C Jr, Carvalho WS, Simões e Silva AC, Khosla MC. (1994) Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1–7): evidence that the actions of angiotensin-(1–7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull*. 35:293–298.

Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP. (2000) Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*. 91:45-62.

Santos RA, Simões e Silva AC, Magaldi AJ, Khosla MC, Cesar KR, Passaglio KT, Baracho NC. (1996) Evidence for a physiological role of angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. *Hypertension*. 27:875-884.

Santos RA. Simoes A, Maric C, Silva D, Machado R, Burh I, Heringer-Walther S, Veloso S, Lopes M., Bader M, Mendes E, Soares V, Campagnole-Santos M, Schultheiss H, Speth R, Walther T. (2003) Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(14): 8258-8263.

Santos RA, Ferreira A, Pinheiro S, Sampaio W, Touyz R, Campagnole, Santos M. (2005a) Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. *Expert Opin. Investig. Drugs*. 14(8): 1019-1031.

Santos RA, Frézard F, Ferreira A. (2005b) Angiotensin-(1-7): Blood, Heart and Blood vessels. *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents*. 3:383-391.

Santos RA. y Ferreira AJ. (2006) Pharmacological Effects of AVE 0991, a Nonpeptide Angiotensin-(1-7) Receptor Agonist. *Cardiovascular Drug Reviews*. 24(3-4): 239-246.

Santos RA, Castro CH, Gava E, Pinheiro SV, Almeida AP, Paula RD, Cruz JS, Ramos AS, Rosa KT, Irigoyen MC et al. (2006) Impairment of in vitro and in vivo heart function in angiotensin-(1–7) receptor MAS knockout mice. *Hypertension*. 47:996–1002.

Santos RA, Ferreira AJ, Simoes E Silva AC. (2008a) Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol*.93:519-527.

- Santos SH, Fernandes LR, Mario EG, Ferreira AV, Porto LC, Alvarez-Leite JI, Botion LM, Bader M, Alenina N, Santos RA. (2008b) Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes*.57:340–347.
- Santos SH, Braga JF, Mario EG, Porto LC, Rodrigues-Machado Mda G, Murari A, Botion LM, Alenina N, Bader M, Santos RA (2010) Improved lipid and glucose metabolism in transgenic rats with increased circulating angiotensin-(1–7). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 30:953–961.
- Santos SH, Fernandes LR, Pereira CS, Guimarães AL, de Paula AM, Campagnole-Santos MJ, Alvarez-Leite JI, Bader M, Santos RA. (2012) Increased circulating angiotensin-(1-7) protects white adipose tissue against development of a proinflammatory state stimulated by a high-fat diet. *Regul Pept*. 178:64-70.
- Santos RA, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. (2013) Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *J Endocrinol*. 216:R1-R17.
- Sata M. y Fukuda D. (2010) Crucial role of renin-angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Journal of Medical Investigation*. 57:12-25.
- Sato I, Morita I, Kaji K, Ikeda M, Nagao M, Murota S. (1993) Reduction of nitric oxide producing activity associated with in vitro aging in cultured human umbilical vein endothelial cell. *Biochem Biophys Res Commun*. 195:1070-1076.
- Satoh T, Sasatomi E, Yamasaki F, Ishida H, Wu L, Tokunaga O. (1998) Multinucleated variant endothelial cells (MVECs) of human aorta: expression of tumor suppressor gene p53 and relationship to atherosclerosis and aging. *Endothelium*. 6: 123–132.
- Satoh M, Ishikawa Y, Takahashi Y, Itoh T, Minami Y, y Nakamura M. (2008) Association between oxidative DNA damage and telomere shortening in circulating endothelial progenitor cells obtained from metabolic syndrome patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 198.347–353.
- Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, Tabuchi T, Itoh T, Nakamura M. (2009) Effect of intensive lipid-lowering therapy on telomere erosion in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Clin Sci (Lond)*. 116:827– 835.
- Savergnini SQ, Beiman M, Lautner RQ, de Paula-Carvalho V, Allahdadi K, Pessoa DC, Costa-Fraga FP, Fraga-Silva RA, Cojocarú G, Cohen Y et al. (2010) Vascular relaxation, antihypertensive effect, and cardioprotection of a novel peptide agonist of the MAS receptor. *Hypertension*. 56: 112–120.
- Savoia C. y Schiffrin E. (2007) Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. 112: 375-384.
- Savoia C, Sasa L, Zezza L, Pucci L, Lauri FM, Befani A, Alonzo A, Volpe M. (2011) Vascular inflammation and endothelial dysfunction in experimental hypertension. *International Journal of Hypertension*. 2011: 1-8.
- Sawada, H., Kan, M. and McKeethan, W.L. (1990) Opposite effects of monokines (interleukin-1 and tumor necrosis factor) on proliferation and heparin-binding (fibroblast) growth factor binding to human aortic endothelial and smooth muscle cells. *In Vitro Cell Dev. Biol*. 26: 213–216.
- Scandalios, J.G. (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38: 995-1014.
- Schiavone MT, Santos RAS, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM (1988). Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1–7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85: 4095–4098.
- Schiffrin EL. (2001) A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 38: S3–S6.
- Schilder YD, Heiss EH, Schachner D, Ziegler J, Reznicek G, Sorescu D, Dirsch VM. (2009) NADPH oxidases 1 and 4 mediate cellular senescence induced by resveratrol in human endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 46:1598-606.
- Schindler C, Bramlage P, Kirch W, Ferrario CM. (2007) Role of the vasodilator peptide angiotensin-(1-7) in cardiovascular drug therapy. *Vascular health and risk management*. 3:125-137.
- Schleicher M, Shepherd BJ, Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Yu J, Pan Y, Acevedo LM, Shadel GS, Sessa WC. (2008) Prohibitin-1 maintains the angiogenic capacity of endothelial cells by regulating mitochondrial function and senescence. *J Cell Biol*.180: 101–112.
- Schling P, Mallow H, Trindl A, Loffler G (1999) Evidence for a local renin angiotensin system in primary cultured human preadipocytes. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 23: 336–341.
- Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K et al. (2000) Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature* 404:197- 201.
- Schlossmann J, Feil R, Hofmann F. (2003) Signaling through NO and cGMP-dependent protein kinases. *Ann Med* 35:21-27.
- Schmaier AH. (2003) The kallikrein–kinin and the renin–angiotensin systems have a multilayered interaction. *Am. J. Physiol*. 285:R1-R13.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 88: 593-602.

- Seshadri T. y Campisi J. (1990) Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science*. 247:205–209.
- Sevá Pessôa B, Van der Lubbe N, Vendork K, Roks A, Hoorn E, Jan Danser A.H. (2013) Key developments in renin-angiotensin-aldosterone system inhibition. *Nature*. 9:26-36
- Sha. A. (2000) Inducible nitric oxide synthase and cardiovascular disease. *Cardiovascular research*. 45: 148-155.
- Shan HY, Bai XJ, Chen XM. (2008) Angiotensin II induces endothelial cell senescence via the activation of mitogen-activated protein kinases. *Cell Biochem Funct*. 26:459-466.
- Sheehan AL, Carrell S, Johnson B, Stanic B, Banfi B, Miller FJ Jr. (2011) Role for Nox1 NADPH oxidase in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 216:321-326.
- Shemesh R, Toporik A, Levine Z, Hecht I, Rotman G, Wool A, Dahary D, Gofer E, Kliger Y, Soffer MA, Rosenberg A, Eshel D, Cohen Y. (2008) Discovery and validation of novel peptide agonists for G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem*. 283:34643-34649.
- Shenoy V, Ferreira A, Qi Y, Fraga-Silva R, Freire C, Dooies A, Yun J, Sriramula S, Mariappan N, Pourang D, Venugopal C, Francis J, Reudelhuber T, Santos R, Patel J, Raizada M, Katovich M. (2010) The ACE2/Ang-(1-7)/Mas Axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 182:1065-1072.
- Shi L, Mao C, Xu Z, Zhang L. (2010) Angiotensin – converting enzymes and drug discovery in cardiovascular diseases. *Drug Discovery Today*. 15(9/10): 332-341.
- Shimabukuro M, Ohneda M, Lee Y, Unger RH. (1997) Role of nitric oxide in obesity-induced β cell disease. *J Clin Invest*. 100:290-295.
- Shimizu A, Yamagata T, Tatsuno H et al. (1998) Radio-frequency catheter ablation therapy in elderly patients with supraventricular tachycardia. *Nippon Ronen Igakkai Zassh.* ; 35: 451–457.
- Shindler C, Bramlage P, Kirch W, Ferrario C.M. (2007) Role of the vasodilatador peptide angiotensin-(1-7) in cardiovascular drug therapy.. *Vascular heart and risk management*. 3(1) 125-137.
- Silva-Barcellos NM, Frézard F, Caligiorne S, Santos RA. (2001) Long-lasting cardiovascular effects of liposome-entrapped angiotensin-(1-7) at the rostral ventrolateral medulla. *Hypertension*. 38:1266-1271.
- Silva DM, Vianna HR, Cortes SF, Campagnole-Santos MJ, Santos RA, Lemos VS. (2007) Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats. *Peptides*. 228:702-707.
- Sims JE. y Smith DE. (2010) The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature review immunology*.10:89-102.
- Singh V, Baker K, Kumar R. (2006) Novel Aspects of the Cardiac Renin-Angiotensin System. *The Local Cardiac Renin-Angiotensin Aldosterone System*. Capítulo 8. Ed. Frohlich, R.N.Re. pp 75-89.
- Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, de Lange T. (2000) Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol*. 20:1659-1668.
- Soccio M, Toniato E, Evangelista V, Carluccio M, De Caterina R. (2005) Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD(P)H oxidase and its genetic variants. *European Journal of Clinical Investigation*. 35,305-314.
- Soejima H, Ogawa H, Yasue H et al. (1999) Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor levels in patients with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 34: 983–988.
- Sommer G, Garten A, Petzold S, Beck-Sickingler AG, Blüher M, Stumvoll M, Fasshauer M. (2008) Visfatin/PBEF/Nampt: structure, regulation and potential function of a novel adipokine. *Clin Sci (Lond)*.115:13-23.
- Soussi T. y May P. (1996). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J Mol Biol*. 260: 623-637.
- Spyridopoulos I, Haendeler J, Urbich C, Brummendorf TH, Oh H, Schneider MD, Zeiher AM, Dimmeler S. (2004) Statins enhance migratory capacity by upregulation of the telomere repeat-binding factor TRF2 in endothelial progenitor cells. *Circulation*. 110:3136-42.
- Sriramula S, Cardinale JP, Lazartigues E, Francis J. (2011) ACE2 overexpression in the paraventricular nucleus attenuates angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovascular research*. 92:401-408.
- Stefanska J. y Pawliczak R. (2008) Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators Inflammation*. 2008:106507.
- Stegbauer J, Potthoff SA, Quack I, Mergia E, Clasen T, Friedrich S, Vonend O, Woznowski M, Königshausen E, Sellin L, Rump LC. (2011) Chronic treatment with angiotensin-(1-7) improves renal endothelial dysfunction in apolipoproteinE-deficient mice. *Br J Pharmacol*. 163:974-983.
- Stehouwer CD, Gall MA, Twisk JW, Knudsen E, Emeis JJ, Parving HH. (2002) Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: Progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. *Diabetes*. 51: 1157–1165.
- Stein GH, Drullinger LF, Robetorye RS, Pereira-Smith OM, Smith JR. (1991) Senescent cells fail to express CDC2, CYCA, and CYCB in response to mitogen stimulation. *Proc. Natl Acad. Sci USA*. 88: 11012–11016.
- Stephens JM, Vidal-Puig AJ. (2006) An update on visfatin/pre-b cell colonyenhancing factor, an

ubiquitously expressed, illusive cytokine that is regulated in obesity. *Curr Opin Lipidol*.17:128-131.

Strawn WB, Ferrario CM, Tallant EA. (1999) Angiotensin-(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury. *Hypertension*. 33:207-211.

Su Z, Zimpelmann J, Burns KD. (2006) Angiotensin-(1-7) inhibits angiotensin II-stimulated phosphorylation of MAP kinases in proximal tubular cells. *Kidney Int*. 69:2212-2218.

Sucu N, Unlu A, Tamer L, Aytacoglu B, Ercan B, Dikmengil M, Atik U. (2003) 3-Nitrotyrosine in atherosclerotic blood vessels. *Clin Chem Lab Med*.41:23-25.

Sukumaran V, Veeraveedu PT, Gurusamy N, Lakshmanan AP, Yamaguchi K, Ma M, Suzuki K, Kodama M, Watanabe K. (2012) Telmisartan acts through the modulation of ACE-2/ANG 1-7/mas receptor in rats with dilated cardiomyopathy induced by experimental autoimmune myocarditis. *Life Sci*. 90:289-300.

Sun SC. y Ley SC. (2008) New insights into NF-kappaB regulation and function. *Trends Immunol*. 29:469-478.

Sun Y, Carretero OA, Xu J, Rhaleb NE, Yang JJ, Pagano PJ, Yang XP. (2009) Deletion of inducible nitric oxide synthase provides cardioprotection in mice with 2-kidney, 1-clip hypertension. *Hypertension*. 53:49-56.

Sun SC. (2011) Non-canonical NF-κB signaling pathway. *Cell research*. 21: 71-85.

Suzuki M. y Boothman DA. (2008). Stress-induced premature senescence (SIPS)-influence of SIPS on radiotherapy. *J Radiat Res (Tokyo)*. 49:105-112.

Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. (2003) New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation*. 108: 1917–1923.

Tabas, I. (2010) Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nature Rev Immunol*. 10: 36–46.

Takeya, R. y Sumimoto, H. (2006) Regulation of novel superoxide-producing NAD(P)H oxidases. *Antioxidants & Redox Signaling*. 8:1523-1532.

Tallant EA. y Clark MA. (2003) Molecular mechanisms of inhibition of vascular growth by angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 42:574-579.

Tallant E., Ferrario C., Gallagher P. (2005) Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am. J Physiol Heart Circ Physiol*. 289:1560-1566.

Taylor WR, DePrimo SE, Agarwal A, Agarwal ML, Schonthal AH, Katula KS, y Stark GR. (1999) Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol Biol Cell*. 10: 3607-3622.

Tchkonia T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scrable H, Khosla S, Jensen MD, Kirkland JL. (2010) Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*. 9:667-684.

Tesanovic S, Vinh A, Gaspari TA, Casley D, Widdop RE. (2010) Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1-7) in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30:1606-1613.

Thakur BK, Dittrich T, Chandra P, Becker A, Lippka Y, Selvakumar D, Klusmann JH, Reinhardt D, Welte K. (2012) Inhibition of NAMPT pathway by FK866 activates the function of p53 in HEK293T cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 424:371-377.

Thakur BK, Dittrich T, Chandra P, Becker A, Kuehnau W, Klusmann JH, Reinhardt D, Welte K. (2013) Involvement of p53 in the cytotoxic activity of the NAMPT inhibitor FK866 in myeloid leukemic cells. *Int J Cancer*. 132:766-774.

Than A, Leow MK, Chen P. (2013) Control of adipogenesis by the autocrine interplays between angiotensin-(1-7)/Mas receptor and angiotensin II/AT₁ receptor signaling pathways. *J Biol Chem*. 2013:1-25.

Thatcher SE, Zhang X, Howatt DW, Lu H, Gurley SB, Daugherty A, Cassis LA. (2011). ACE2 Deficiency in Whole Body or Bone Marrow-Derived Cells Increases Atherosclerosis in LDL Receptor $-/-$ Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 31: 758–765.

Theuer J, Shagdarsuren E, Muller DN, Kargel E, Honeck H, Park JK, Fiebeler A, Dechend R, Haller H, Luft FC, Schunck WH. (2005) Inducible NOS inhibition, eicosapentaenoic acid supplementation, and angiotensin II-induced renal damage. *Kidney Int*. 67:248-258.

Thomas MC, Pickering RJ, Tzorotes D, Koitka A, Sheehy K, Bernardi S, Toffoli B, Nguyen-Huu TP, Head GA, Fu Y, Chin- Dusting J, Cooper ME, Tikellis C. (2010) Genetic Ace2 deficiency accentuates vascular inflammation and atherosclerosis in the ApoE knockout mouse. *Circ Res*. 107:888–897.

Tilstra JS, Robinson AR, Wang J, Gregg SQ, Clauson CL, Reay DP, Nasto LA, St Croix CM, Usas A, Vo N, Huard J, Clemens PR, Stolz DB, Guttridge DC, Watkins SC, Garinis GA, Wang Y, Niedernhofer LJ, Robbins PD. (2012) NF-κB inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *J Clin Invest*. 122:2601-2612.

Tokunaga O, Fan JL, Watanabe T. (1989) Atherosclerosis- and age-related multinucleated variant endothelial cells in primary culture from human aorta. *Am J Pathol*. 135: 967–976.

Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T. (2000) Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol*. 35:927-945.

Toussaint O, Remacle J, Dierick JF, Pascal T, Fripiat C, Zdanov S, Magalhaes JP, Royer V, Chainiaux F.

- (2002). From the Hayflick mosaic to the mosaics of ageing. Role of stress-induced premature senescence in human ageing. *Int J Biochem Cell Biol.* 34: 1415-1429.
- Touyz R.y Schiffrin E. (2000) Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II Vascular Smooth Muscle Cells. *Pharmacological Reviews.* 54: 639-672.
- Touyz RM. y Schiffrin EL. (2001) Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens.*19:1245– 1254.
- Touyz RM, Chen X, Tabet F, 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. *Circ Res.* 90:1205–1213.
- Trayhurn P. y Wood IS. (2005) Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem Soc Trans.* 33:1078-1081.
- Tsiotra PC y Tsigos C. (2006) Stress, the endoplasmic reticulum, and insulin resistance. *Ann N Y Acad Sci,* 1083: 63-76.
- Tummala PE, Chen XL, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM. (1999) Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: A potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation.*100:1223-1229.
- Tummala PE, Chen XL, Medford RM. (2000) NF- κ B independent suppression of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular adhesion molecule-1 gene expression by inhibition of flavin binding proteins and superoxide production. *J Mol Cell Cardiol.* 32:1499-1508.
- Tzfati Y, Fulton T, Roy J, Blackburn E. (2000) Template boundary in a yeast telomerase specified by RNA structure. *Science.* 288: 863-867.
- Ueda S, Masumori S, Ashino K.. (2000) Angiotensin $-(1-7)$ attenuates vasoconstriction evoked by angiotensin II but no by adrenaline in man. *Hypertension.* 35:998-1001.
- Ueda S, Masumori S, Wada A. (2001) Angiotensin-(1-7) potentiates bradykinin-induced vasodilatation man. *J. Hipertens.* 19:2001-2009.
- Uekawa N, Nishikimi A, Isobe K, Iwakura Y, Maruyama M. (2004) Involvement of IL-1 family proteins in p38 linked cellular senescence of mouse embryonic fibroblasts. *FEBS Lett.* 575:30-34.
- Uemura H, Ishiguro H, Kubota Y. (2008) Pharmacology and new perspectives of angiotensin II receptor blocker in prostate cancer treatment. *Int J Urol.*15:19-26.
- Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK. (1996) p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 271:23317-23321.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M.T.D, Mazur M, Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 39:44-84.
- Vallejo S, Romacho T, Angulo J, Villalobos LA, Cercas E, Leivas A, Bermejo E, Carraro R, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C. (2011) Visfatin impairs endothelium-dependent relaxation in rat and human mesenteric microvessels through nicotinamide phosphoribosyltransferase activity. *PLoS ONE* 6(11): e27299. doi:10.1371/journal.pone.0027299.
- Van der Loo B, Fenton MJ, Erusalimsky JD. (1998) Cytochemical detection of a senescence-associated β -galactosidase in endothelial and smooth muscle cells from human and rabbit blood vessels. *Experimental cell research.* 241:309-315.
- Van der Veer E, Nong Z, O'Neil C, Urquhart B, Freeman D, Pickering JG. (2005) Pre-B-cell colony-enhancing factor regulates NAD⁺-dependent protein deacetylase activity and promotes vascular smooth muscle cell maturation. *Circ. Res.* 97: 25–34.
- Van der Veer E, Ho C, O'Neil C, Barbosa N, Scott R, Cregan SP, Pickering JG. (2007) Extension of human cell lifespan by nicotinamide phosphoribosyltransferase. *J Biol Chem.* 282:10841-10845.
- Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. (2006) Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature insight review.* 444:875-880.
- Van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, Thörne A, Hoffstedt J, Lönnqvist F, et al. (1998) Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes.*47:913-917.
- Van Steensel B. y De Lange T. (1997) Control of telomere length by the human telomeric protein TRF-1. *Nature.* 385: 740-743.
- Vasa M, Breitschopf K, Zeiher AM, Dimmeler S. (2000). Nitric oxide activates telomerase and delays endothelial cell senescence. *Circ Res.* 87:540-542.
- Vasile E, Tomita Y, Brown LF, Kocher O, Dvorak HF. (2001) Differential expression of thymosin beta-10 by early passage and senescent vascular endothelium is modulated by VPF/VEGF: evidence for senescent endothelial cells in vivo at sites of atherosclerosis. *FASEB J.* 15: 458–466.
- Vásquez-Vivar J. (2009) Tetrahydrobiopterin, superoxide, and vascular dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 47:1108–1119.

- Verma S. y Anderson TJ. (2002) Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation*.105:546–549.
- Victorino GP, Newton CR, Curran B. (2002) Effect of angiotensin II on microvascular permeability. *J Surg Res*. 104: 77–81.
- Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Nguyen A, Villeneuve L, Mamarbachi AM, Fortier A, Perrault LP, Carrier M, Thorin E.(2007) Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech Ageing Dev*. 128:662–671.
- Von Bohlen und Halbach O, Walther T, Bader M, Albrecht D. (2000) Interaction between Mas and the angiotensin AT1 receptor in the amygdala. *J Neurophysiol*. 83:2012-2021.
- Von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, d'Adda di Fagagna F, Jackson SP. (2005) Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev*. 126:111-7.
- Wadhwa R, Sugihara T, Taira K, Kaul SC. (2004) The ARF-p53 senescence pathway in mouse and human cells. *Histology and histopathology*. 19:311-316.
- Wagner M, Hampel B, Bernhard D, Hala M, Zwerschke W, Jansen-Durr P. (2001) Replicative senescence of human endothelial cells in vitro involves G1 arrest, polyploidization and senescence-associated apoptosis. *Exp Gerontol*. 36:1327–1347.
- Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. (2008) Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7. *Cell*. 132:363-374.
- Wajchenberg BL. (2000) Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews*. 21: 697-738.
- Walters PE, Gaspari TA, Widdop RE. (2005) Angiotensin-(1–7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats. *Hypertension*. 45: 960–966.
- Wang X, Feuerstein GZ, Gu JL, Lysko PG, Yue TL. (1995) Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 115:89-98.
- Wang P, Xu TY, Guan YF, Su DF, Fan GR, Miao CY. (2009) Perivascular adipose tissue-derived visfatin is a vascular smooth muscle cell growth factor: role of nicotinamide mononucleotide. *Cardiovasc Res*. 81:370–380.
- Weber C, Erl W, Pietsch A, Ströbel M, Ziegler-Heitbrock HW, Weber PC. (1994) Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor-kappa B mobilization and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 14:1665-1673.
- Weyemi U, Lagente-Chevallier O, Boufraqueh M, Prenois F, Courtin F, Caillou B, Talbot M, Dardalhon M, Al Ghuzlan A, Bidart JM, Schlumberger M, Dupuy C. (2012) ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence. *Oncogene*. 31:1117-1129.
- Whitehart DR, Register SJ, Chang Q, Montgomery B. (2000) Relationship of telomeres and p53 in aging bovine corneal endothelial cell cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 41:1070–1075.
- Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R. (2009) Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet*. 373:1083-1096.
- Wiemer G, Dobrucki L, Louka F, Malinsky T, Heitsch H. (2002) AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angiotensin-(1-7) on the endothelium. *Hypertension*. 40: 847-852.
- Williams IL, Wheatcroft SB, Shah AM, Kearney MT. (2002) Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium: mechanisms of reduced nitric oxide bioavailability in obese humans. *International Journal of Obesity*. 26:754-764.
- Wolny A, Clozel JP, Rein J, Mory P, Vogt P, Turino M, Kiowski W, and Fischli W. (1997) Functional and biochemical analysis of angiotensin II-forming pathways in the human heart. *Circ Res*. 80: 219-227.
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. (1996) Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental genetics*. 18:173-179.
- Wu L, Iwai M, Nakagami H et al: (2001) Roles of angiotensin II type 2 receptor stimulation associated with selective angiotensin II type 1 receptor blockade with valsartan in the improvement of inflammation-induced vascular injury. *Circulation*. 104: 2716–2721.
- Xu P, Goncalves ACC, Todiras M, Rabelo LA, Sampaio WO, Moura MM, Santos SS, Luft FC, Bader M, Gross V, Alenina N, Santos RA. (2008) Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in Mas gene-deleted mice. *Hypertension* 51:574–580.
- Xu S, Zhi H, Hou X, Jiang B. (2011) Angiotensin II modulates interleukin-1 β -induced inflammatory gene expression in vascular smooth muscle cells via interfering with ERK-NF- κ B crosstalk. *Biochemical and biophysical research communications*. 410:543-548.
- Yamada K, Iyer SN, Chappell MC, Ganten D, Ferrario CM. (1998) Converting enzyme determines plasma clearance of angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 32:496-502.

Yang LX, Guo RW, Shi YK, Qi F, Guo CM, Wei L, Wang Y. (2006) Angiotensin II up-regulates expression of inducible nitric oxide synthase in human umbilical endothelial cells: roles of AT1 and AT2. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 34:647–650.

Yang HY, Bian YF, Zhang HP, Gao F, Xiao CS, Liang B, Li J, Zhang NN, Yang ZM. (2012) Angiotensin-(1-7) treatment Ameliorates Angiotensin II-Induced HUVEC Apoptosis. *Clinical and Exp Pharmacology and Physiology*. 39: 1004–1010.

Yoshida K. y Miki Y. (2010) The cell death machinery governed by the p53 tumor supresor in response to DNA damage. *Cancer Sci*.101:831-835.

Yousif MHM, Kehinde EO, Benter IF. (2007) Different responses to angiotensin-81-7) in young aged and diabetic rabbit corpus cavernosum. *Pharmacological research*. 56:209-216.

Zahorska-MarkiewiczB, Olszanecka-Glinianowicz M, JanowskaJ, Kocelak P, Semik-Grabarczyk E, Holecki M, Dabrowski P, Skorupa A. (2007) Serum concentration of visfatin in obese women. *Metabolism*. 6:3095–100.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) . Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 372:425-432.

Zhang C, Zhao YX, Zhang YH, Zhu L, Deng BP, Zhou ZL, Li SY, Lu XT, Song LL, Lei XM, Tang WB, Wang N, Pan CM, Song HD, Liu CX, Dong B, Zhang Y, Cao Y. (2010) Angiotensin converting enzyme 2 attenuates atherosclerotic lesions by targeting vascular cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:15886–1589.

Zhang F, Ren J, Chan K, Chen H. (2013) Angiotensin-(1-7) regulates angiotensin II-induced VCAM-1 expression on vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 430:642-646.

Zhong M, Than HW, Gong HP, Wang SF, Zhang Y, Zhang W. (2008) Increased serum visfatin in patients with metabolic syndrome and carotid atherosclerosis. *Clin Endocrinol*. 69:878–884.

Zhou YT, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, Orci L, Unger RH. (2000) Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 15:1784-1789.

Zhu Z, Zhong J, Zhu S, Liu D, Van Der Giet M, TepelM (2002)Angiotensin-(1–7) inhibits angiotensin II-induced signal transduction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 40: 693–700.

Zhu B, Deng X, Sun Y, Bai L, Xiahou Z, Cong Y, Xu X. (2012) Nampt is involved in DNA double-strand break repair. *Chin J Cancer*. 31:392-398.

Zisman L, Keller R, Weaver B, Lin Q, Speth R, Bristow M, Canver C. (2003) Increased angiotensin-(1-7)-forming activity in failing human heart ventricles:

evidence for upregulation of the angiotensin-converting enzyme homologue ACE2. *Circulating*. 108;1707-1712.

Zohn I, Symons M, Chrzanowska M, Westwick J, Der C. (1998) Mas oncogene signaling and transformation require the small GTP-binding protein rac. *Mol Cel Biol*. 18:1225-1235.