



**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN FISIOLÓGIA**

**Tesis Doctoral, presentada por:**

**Cristina Rueda Muñoz**

**EFFECTOS VASCULARES DE LAS NANOPARTÍCULAS  
DE ÓXIDO DE CERIO EN LA VENA SAFENA HUMANA**

Dirigida por:

María Dolores Mauricio Aviñó

Solanye Guerra Ojeda

Marina Juez López

Valencia, septiembre 2022



Dña. **María Dolores Mauricio Aviñó**, Profesora Titular del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València,

Dña. **Solanye Guerra Ojeda**, Investigadora Posdoctoral “Margarita Salas” del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València,

Dña. **Marina Juez López**, Médico Adjunto del Servicio de Cirugía Cardiovascular del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia,

**CERTIFICAN:**

Que la presente memoria, titulada **“Efectos vasculares de las nanopartículas de óxido de cerio en la vena safena humana”**, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por **Dña. Cristina Rueda Muñoz**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 5 de septiembre de 2022.

Fdo.

María Dolores Mauricio Aviñó

Fdo.

Solanye Guerra Ojeda

Fdo.

Marina Juez López



## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera expresar mi agradecimiento a todos los miembros del departamento de fisiología, que desde el primer momento me acogieron con los brazos abiertos y me ofrecieron todas las facilidades para formar parte de su programa de doctorado. Especialmente a la Dra. M<sup>a</sup> Dolores Mauricio, co-directora de esta tesis, por compartir conmigo sus conocimientos, por su trabajo de coordinación e investigación y por tutorizar de forma tan cercana este trabajo. A Solanye Guerra, también co-directora, por su inmenso esfuerzo en el trabajo de laboratorio junto con Patricia, Andrea y Begoña. También por sus correcciones y por su ayuda en la maquetación de este trabajo. Al Dr. José María Vila, por hacer que me sintiera una más del equipo y guiarme en los inicios del estudio, y por acudir a recoger las muestras a la hora que fuese.

Gracias también a todos mis compañeros, que de forma totalmente desinteresada han donado los segmentos sobrantes de vena safena de sus pacientes: Dr. Amores, Dr. Martín, Dra. Fletcher, Dr. Otero, Dr. Martínez León, Dra. Campos, Dr. Pascual, Dr. Taylor, Dra. Bueno, Dr. García-Fuster, Dr. Gil, Dr. Sirgo...A las enfermeras y auxiliares de quirófano, siempre dispuestas a colaborar en lo que necesitemos. Con especial cariño quisiera agradecer a la Dra. Marina Juez, profesora, compañera, amiga y co-directora de esta tesis, su apoyo en este trabajo y en todos los aspectos de mi vida.

No puedo olvidar a los pacientes, que también de forma desinteresada han dado su consentimiento para el uso de las muestras con el fin de que podamos ampliar nuestro conocimiento científico. En general, gracias a todos los pacientes que día a día me recuerdan, en un mundo tan competitivo, el verdadero motivo por el que decidí estudiar medicina.

Por último, a mi familia. Gracias a mis padres, Amparo y Paco, por la educación que me han dado y por haber cuidado de mis hijos con infinito amor mientras yo realizaba este trabajo. Sin ellos esta tesis no hubiera sido posible. A José, por darme a mis hijos, Laila, Alejandro y Jesús que viene de camino, quienes me han regalado el mayor amor y alegría que se puede sentir.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
AAS	Ácido acetilsalicílico
ACE	Enzima convertidora de la angiotensina
ACE2	Enzima convertidora de la angiotensina 2
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ATR1	Receptor de la angiotensina II tipo 1
ATR2	Receptor de la angiotensina II tipo 2
BKca	Canales de potasio activados por calcio de alta conductancia
B1R	Receptor de bradiquinina tipo 1
B2R	Receptor de bradiquinina tipo 2
BSA	Seroalbúmina bovina
CeO <sub>2</sub> NPs	Nanopartículas de óxido de cerio
COX	Ciclooxigenasa
DDAHs	Dimetilarginina dimetilaminohidrolasas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDH	Hiperpolarización derivada del endotelio
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado de endotelio
EET	Ácido epoxieicosatrienoico
EOX	Epoxigenasa
ET-1	Endotelina-1
ETA y ETB	Receptores A y B de la endotelina-1
GCs	Guanilato ciclasa soluble
GMPc	Guanosín 3',5' cíclico monofosfato

GTP	Guanosín-5-trifosfato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HRP	Peroxidasa de rábano picante
Kca	Canales de potasio activados por calcio
L-NMMA	N <sup>G</sup> -monometil-L-arginina
L-NAME	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina metil éster
LOX	Lipoxigenasa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NE	Norepinefrina
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOX	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa o NADPH oxidasa
·O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
·OH	Radical hidroxilo
·ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
peNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial fosforilada
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RONS	Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno
SDMA	Dimetilarginina simétrica
SOD	Superóxido dismutasa
TEA	Cloruro de tetraetilamonio
TP	Receptores del tromboxano A <sub>2</sub>
TXA <sub>2</sub>	Tromboxano A <sub>2</sub>
VEFG	Factor de crecimiento endotelial vascular



VSMC

Célula muscular lisa vascular

XO

Xantina oxidasa



# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
1. Cardiopatía isquémica y cirugía de <i>bypass</i> coronario .....	3
1.1. Papel de la vena safena interna en la cirugía coronaria .....	3
1.2. Enfermedad del injerto de <i>bypass</i> coronario con vena safena .....	5
1.3. Prevención de la enfermedad del injerto.....	6
2. Función del endotelio en la homeostasis vascular .....	7
2.1. Rol de la célula endotelial en el tono vascular .....	9
2.1.1. Óxido nítrico .....	9
2.1.2. Prostaciclina y tromboxano A <sub>2</sub> .....	11
2.1.3. Factor hiperpolarizante derivado del endotelio .....	12
2.1.4. Endotelinas.....	13
2.1.5. Angiotensina II.....	13
2.2. Disfunción endotelial, estrés oxidativo y arteriosclerosis .....	14
3. Nanociencia y nanotecnología.....	21
3.1. Nanopartículas .....	22
3.2. Nanopartículas de óxido de cerio.....	24
3.3. Sistema vascular y nanopartículas de óxido de cerio .....	27
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS.....	33
MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
1. Grupo de estudio .....	39
2. Obtención de las muestras de vena safena interna.....	40
3. Preparación de las muestras .....	40
4. Tensión pasiva óptima .....	42
5. Curvas concentración-respuesta .....	43
5.1. Nitroprusiato sódico .....	43
5.2. Bradiquinina y acetilcolina .....	44
5.3. Norepinefrina .....	44
5.4. Tromboxano A <sub>2</sub> .....	44
5.5. Endotelina-1 .....	45
5.6. Angiotensina II .....	45
6. Fármacos y soluciones .....	45
7. Análisis de la expresión proteica mediante Western-Blot.....	46
7.1. Incubación de los segmentos de venosos .....	46
7.2. Extracción y cuantificación de proteínas.....	46

7.3. Separación y transferencia de proteínas .....	47
7.4. Inmunodetección.....	47
8. Análisis estadístico .....	49
RESULTADOS .....	51
1. Efecto de las nanopartículas de óxido de cerio sobre la respuesta al nitroprusiato sódico.....	53
1.1. Participación del anión superóxido en la respuesta al nitroprusiato sódico.....	54
2. Efecto de las nanopartículas de óxido de cerio sobre la respuesta a la bradiquinina.....	56
2.1. Mecanismos implicados en respuesta a la bradiquinina en la vena safena humana .....	58
2.2. Participación del anión superóxido en la respuesta a la braquinina .....	60
3. Efecto de las nanopartículas de óxido de cerio sobre la respuesta a la acetilcolina .....	61
4. Efecto de las nanopartículas de óxido de cerio sobre la expresión proteica de las enzimas relacionadas con la vasodilatación .....	62
5. Efecto de las nanopartículas de óxido de cerio sobre la expresión proteica de los principales sistemas prooxidantes y antioxidantes .....	64
6. Efecto de las nanopartículas de óxido de cerio sobre la contracción inducida por diferentes agonistas contráctiles .....	65
6.1. Niveles proteicos de los receptores ATR1 y ATR2 en respuesta a las nanopartículas de óxido de cerio .....	68
6.2. Participación del anión superóxido en la respuesta a la angiotensina II.....	69
6.3. Efecto de las nanopartículas de óxido de cerio sobre la expresión proteica de la ACE2 .....	70
DISCUSIÓN .....	73
1. Ventajas y limitaciones del estudio .....	75
2. Efecto de las nanopartículas de óxido de cerio sobre la vasodilatación .....	77
3. Efecto de las nanopartículas de óxido de cerio sobre la vasoconstricción .....	82
4. Consideraciones finales.....	86
CONCLUSIONES .....	89

BIBLIOGRAFÍA..... 93



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de las principales sustancias endoteliales vasodilatadoras que regulan el tono vascular. ....	10
Figura 2. Efectos vasculares de la NOX4.....	18
Figura 3. Principales fuentes de anión superóxido a nivel vascular. ....	20
Figura 4. Tipos de nanopartículas según su composición química. ....	24
Figura 5. Baño de órganos y sistema para el registro de la tensión isométrica. ....	41
Figura 6. Determinación de la expresión proteica mediante Western-Blot.	49
Figura 7. Curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$ M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO <sub>2</sub> NPs (10, 20 y 40 µg/ml). ....	53
Figura 8. Curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$ M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia tempol ( $10^{-3}$ M).....	55
Figura 9. Curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$ M) en segmentos de vena safena en presencia de CeO <sub>2</sub> NPs (20 µg/ml) y tempol ( $10^{-3}$ M).....	56
Figura 10. Curvas concentración-respuesta a la bradiquinina ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$ M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO <sub>2</sub> NPs (10, 20 y 40 µg/ml). ....	57
Figura 11. Respuesta a la bradiquinina ( $10^{-6}$ M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y presencia de indometacina ( $10^{-5}$ M), L-NAME ( $10^{-4}$ M) y TEA ( $10^{-3}$ M). ....	59
Figura 12. Curvas concentración-respuesta a la bradiquinina ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$ M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia tempol ( $10^{-3}$ M). ....	60
Figura 13. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$ M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y presencia de CeO <sub>2</sub> NPs (20 µg/ml). ....	61

Figura 14. Cuantificación de la expresión proteica de las enzimas eNOS y peNOS en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO <sub>2</sub> NPs (20 µg/ml). .....	63
Figura 15. Cuantificación de la expresión proteica de los canales BKca y de la enzima GCs en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO <sub>2</sub> NPs (20 µg/ml). .....	63
Figura 16. Cuantificación de la expresión proteica de las enzimas SOD1, SOD2 y NOX4 en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO <sub>2</sub> NPs (20 µg/ml). .....	64
Figura 17. Curvas concentración-respuesta a la NE (10 <sup>-9</sup> - 10 <sup>-4</sup> M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO <sub>2</sub> NPs (20 µg/ml). .....	65
Figura 18. Curvas concentración-respuesta al U46619 (10 <sup>-10</sup> - 10 <sup>-6</sup> M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO <sub>2</sub> NPs (20 µg/ml). .....	66
Figura 19. Curvas concentración-respuesta a la ET-1 (10 <sup>-11</sup> - 10 <sup>-6</sup> M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO <sub>2</sub> NPs (20 µg/ml). .....	66
Figura 20. Curvas concentración-respuesta a la Ang II (10 <sup>-11</sup> - 3x10 <sup>-7</sup> M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO <sub>2</sub> NPs (20 µg/ml). .....	67
Figura 21. Cuantificación de la expresión proteica de los receptores de la Ang II (ATR1 y ATR2) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO <sub>2</sub> NPs (20 µg/ml). .....	69
Figura 22. Curvas concentración-respuesta a la Ang II (10 <sup>-11</sup> - 3x10 <sup>-7</sup> M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y presencia de tempol (10 <sup>-3</sup> M). .....	70
Figura 23. Cuantificación de la expresión proteica de la ACE2 en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO <sub>2</sub> NPs (20 µg/ml). .....	71



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes.....	39
Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados para la determinación de la expresión proteica por Western-Blot. ....	48
Tabla 3. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta al nitroprusiato sódico en segmentos de vena safena en las diferentes condiciones experimentales.....	54
Tabla 4. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta a la bradiquinina en segmentos de vena safena en las diferentes condiciones experimentales.....	57
Tabla 5. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta a la acetilcolina en segmentos de vena safena en ausencia (control) y presencia de $CeO_2NPs$ (20 $\mu g/ml$ ). ....	62
Tabla 6. Valores de $pD_2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en respuesta a los diferentes agonistas contráctiles, en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de $CeO_2NPs$ (20 $\mu g/ml$ ). ....	68



## **INTRODUCCIÓN**



## 1. Cardiopatía isquémica y cirugía de *bypass* coronario

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en el mundo (1). Entre ellas la cardiopatía isquémica ocupa el primer lugar, responsable del 16% de todas las muertes a nivel mundial en 2019 (2) siendo además una enfermedad con alto impacto económico y en la calidad de vida del paciente.

El tratamiento de los pacientes con cardiopatía isquémica incluye cambios en el estilo de vida (dieta cardiosaludable, pérdida de peso, ejercicio rutinario, cese del hábito tabáquico...), medidas farmacológicas (antiagregantes, hipolipemiantes, betabloqueantes...) y la revascularización coronaria, ya sea el implante percutáneo de *stents* o la cirugía de derivación o *bypass* coronario.

El *bypass* coronario clásico consiste en conectar un conducto desde la aorta hasta la arteria coronaria enferma más allá de la lesión estenosante u obstructiva. Los conductos utilizados se extraen de venas o arterias del propio paciente. La cirugía de *bypass* coronario ha demostrado su eficacia en un subgrupo determinado de pacientes con cardiopatía isquémica tanto en la mejoría de la calidad de vida como en el pronóstico a largo plazo (3).

### 1.1. Papel de la vena safena interna en la cirugía coronaria

A lo largo de la historia se han utilizado diferentes conductos para la realización del *bypass* coronario (vena safena interna, arteria mamaria, arteria radial y arteria gastroepiploica). La primera revascularización coronaria con éxito la realizaron Garret y DeBakey en 1964 utilizando como conducto la vena safena interna del paciente. Sin embargo, fue Favaloro (1923-2000) quien popularizó y extendió la cirugía de *bypass* coronario con

## Introducción

vena safena interna, que se coloca de forma invertida para que sus válvulas permitan el correcto paso de flujo a través de ellas. Posteriormente se demostró que la arteria mamaria interna izquierda a la arteria descendente anterior mejoraba la permeabilidad del injerto y el pronóstico del paciente a largo plazo (4), por lo que se extendió el uso de dicho conducto quedando la vena safena interna para revascularizar el resto de territorios.

La mayor limitación de los injertos venosos es la disminución progresiva de su permeabilidad a largo plazo, por lo que en los últimos años existe la tendencia al uso de conductos arteriales como preferencia (5, 6). No obstante, según el último registro de intervenciones quirúrgicas de la Sociedad Española de Cirugía Cardiovascular y Endovascular (SECCE), sólo en un 42.9 % de los pacientes intervenidos de cirugía de *bypass* coronario en España durante el año 2020 se utilizó más de un injerto arterial (7), lo que significa que en más de la mitad de los pacientes se utilizó uno o más injertos venosos. La vena safena interna sigue siendo, por tanto, el conducto más utilizado. Las principales razones son posiblemente las ventajas que este injerto ofrece, como son su accesibilidad, fácil disección, posibilidad de disección simultánea a los injertos arteriales, longitud y versatilidad.

Por otro lado, además de aumentar la dificultad técnica del procedimiento, no todos los pacientes se benefician de la revascularización arterial completa, y aunque se ha demostrado mayor permeabilidad a largo plazo no existe a día de hoy evidencia sobre si su uso aumenta la supervivencia (3). El uso de injertos arteriales presenta además otras limitaciones. Por ejemplo, la cirugía con injerto bilateral de arteria mamaria se ha asociado con un aumento de dehiscencia esternal y mediastinitis en pacientes obesos y diabéticos (8). Aunque el riesgo disminuye si se extraen las arterias esqueletizadas (9), actualmente se recomienda su uso en

pacientes con esperanza de vida razonable y riesgo bajo de complicaciones de la herida esternal (3). En cuanto la arteria radial, ha demostrado baja permeabilidad en estenosis menores de 70%, por lo que su uso se debe limitar a estenosis mayores del 70% o idealmente del 90% (10). Otra desventaja de los injertos arteriales es su tendencia al vasoespasmio (11), sobre todo en el caso de la arteria radial por tener mayor componente muscular en su pared, que puede derivar en infarto agudo de miocardio perioperatorio con consecuencias en ocasiones graves para el paciente.

## **1.2. Enfermedad del injerto de *bypass* coronario con vena safena**

Tres son los mecanismos que pueden causar la oclusión de los injertos de vena safena: trombosis, hiperplasia intimal y arteriosclerosis (12).

- La oclusión del injerto durante el primer mes suele estar ocasionada por trombosis del mismo como consecuencia de la lesión intimal durante su manipulación, las alteraciones hemodinámicas del flujo y viscosidad sanguínea y/o por defecto de la técnica de anastomosis.
- La hiperplasia intimal consiste en la proliferación de células musculares lisas y matriz extracelular en la íntima del vaso y suele ser la causa de oclusión del injerto entre el mes y el año de la cirugía. Raramente produce estenosis significativas que causen la oclusión del *bypass*, pero son zonas de asentamiento de placas de arteriosclerosis en el futuro. Uno de los factores que influyen en la formación de la hiperplasia intimal es el aumento de tensión que se produce sobre la pared venosa al someterla de forma aguda a presión arterial.
- La principal causa de la oclusión de los injertos coronarios a partir del primer año tras la cirugía es la afectación por la arteriosclerosis, tanto del conducto como por la progresión de las lesiones dislates en los vasos nativos.

## Introducción

El mal control de los factores de riesgo cardiovascular se ha asociado a disminución de la tasa de permeabilidad de los injertos coronarios de vena safena (12). Otros factores son: el diámetro del vaso diana  $\leq 1.5$  mm (13), la severidad de la estenosis  $<70\%$  donde existe riesgo de flujo competitivo que predispone a la oclusión del injerto (12), la calidad del injerto (se debe evitar venas varicosas o esclerosas) y la ausencia de lesiones intimaes (es importante la manipulación cuidadosa y evitar la hiperdilatación).

### **1.3. Prevención de la enfermedad del injerto**

El control de los factores de riesgo cardiovascular es una de las estrategias principales para evitar el desarrollo de arteriosclerosis de los injertos. Se ha visto que los agentes hipolipemiantes reducen la progresión de la enfermedad coronaria, así como la arteriosclerosis del injerto de vena safena y los eventos cardiovasculares secundarios (14, 15). En cuanto al tratamiento antitrombótico, se ha demostrado que la administración precoz de ácido acetilsalicílico (AAS) reduce la oclusión del injerto de vena safena durante el primer año (16-18), así como las complicaciones postoperatorias tempranas incluyendo mortalidad, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, fallo renal e isquemia intestinal (19). Varios meta-análisis han comparado la permeabilidad de los injertos usando AAS sólo o doble antiagregación con AAS y otros antiagregantes como el clopidogrel o el ticagrelor (20-23). En ellos se ha observado disminución de la tasa de oclusión en los injertos venosos con doble antiagregación con respecto a la monoterapia con AAS, aunque todavía no se considera que haya suficiente evidencia para recomendar su uso generalizado (24). A pesar de que el AAS forma parte del tratamiento estándar tras la cirugía de *bypass* coronario independientemente del injerto utilizado, nuestro grupo de investigación ha demostrado que el AAS a altas dosis y la nimesulida, un inhibidor selectivo de la cicloxigenasa 2 (COX2), aumentan la respuesta contráctil a la



vasopresina en arteria gastroepiploica humana, pero no en la vena safena (25). Las concentraciones de AAS utilizadas en este trabajo eran equivalentes a la administración de AAS en un rango de entre 80- 350 mg diarios, compatibles con su efecto antiagregante plaquetario. La conclusión de este estudio fue que las prostaglandinas vasodilatadoras se liberan en respuesta a la estimulación vasopresinérgica en la arteria gastroepiploica humana, por lo que dosis antiagregantes de AAS podrían contribuir a la oclusión precoz cuando se usa dicha arteria como injerto. Sin embargo, en la vena safena este mecanismo no ocurría (25).

Por otro lado, se ha demostrado que el daño mecánico por la dilatación excesiva del injerto produce disfunción endotelial, que podría contribuir a la oclusión precoz de los injertos (26). Por ello, algunos autores han descrito que la técnica de extracción de la vena safena interna denominada “*no-touch*” mejora la permeabilidad a largo plazo con cifras de hasta el 80% a los 16 años (27). Esta técnica consiste en la extracción de la vena con su pedículo y sin dilatarla con el fin de minimizar el daño endotelial.

## **2. Función del endotelio en la homeostasis vascular**

El endotelio está formado por una monocapa de células aplanadas que constituye el revestimiento interior de los vasos sanguíneos. No se trata únicamente de una barrera, sino que las células endoteliales están en contacto con la sangre y con las células circulantes en ella de manera que al endotelio se le reconocen varias funciones (28):

- Transporte capilar. Al ser una membrana semipermeable el endotelio permite el paso de macromoléculas desde el torrente sanguíneo al espacio intersticial.

## Introducción

- Síntesis y secreción de sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras que regulan el tono vascular.
- Control de la hemostasia y agregación plaquetaria. El endotelio evita la adhesión plaquetar. Por contra, cuando hay una lesión vascular se exponen la matriz colágena y el factor de Von Willebrand, que facilita la adhesión y agregación plaquetaria (29).
- Angiogénesis. Las células progenitoras endoteliales circulantes pueden diferenciarse en células endoteliales maduras y reemplazar las células endoteliales dañadas. Además, contribuyen a la vasculogénesis posnatal (se ha demostrado que albergan sitios de neovascularización) (30). En situación de hipoxia, las células parenquimatosas de los diferentes tejidos segregan factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG) que activa los receptores situados en el endotelio de los vasos sanguíneos preexistentes; la célula endotelial activada segrega proteasas que degradan la membrana basal promoviendo la proliferación y migración de nuevas células endoteliales para formar nuevos vasos (31).
- Funciones metabólicas. El endotelio interviene en el metabolismo de sustancias vasoactivas circulantes como la adrenalina, serotonina, bradiquinina o angiotensina entre otras.
- Función inmunológica e inflamatoria. El endotelio es sensible a numerosas citoquinas como el interferón (IF), el factor de necrosis tumoral (TNF) y las interleuquinas 1 (IL-1) y 6 (IL-6). La superficie del endotelio también puede adherir leucocitos polimorfonucleares, monocitos y linfocitos (29).

En líneas generales, la célula endotelial contiene actividad anticoagulante, antiadhesiva y vasodilatadora.

## 2.1. Rol de la célula endotelial en el tono vascular

Una de las funciones esenciales del endotelio es la síntesis y secreción de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras. Esta vasomoción juega un papel directo en el equilibrio entre el suministro de oxígeno tisular y la demanda metabólica mediante la regulación del tono y el diámetro de los vasos. El endotelio también está implicado en la remodelación de la estructura vascular y del órgano a largo plazo (32). A continuación, se describen las principales sustancias liberadas por el endotelio que regulan el tono vascular.

### 2.1.1. Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) se forma a partir del aminoácido L-arginina por la acción de una familia de enzimas, las sintasas de NO (NOS) (33). Existen varios tipos de NOS: la NOS tipo I o neuronal (nNOS), la tipo II o inducible (iNOS) que se activa por la inflamación y la tipo III o endotelial (eNOS) que es específica del endotelio y constitutiva (34).

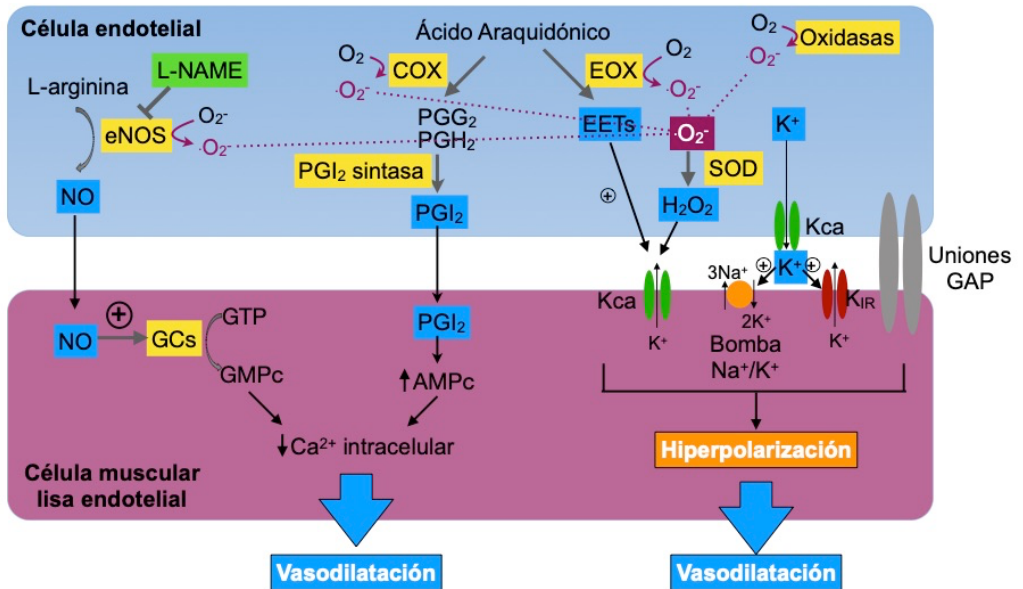
El NO endotelial difunde a las células del músculo liso vascular y activa la enzima guanilato ciclasa soluble (GCs), que transforma el guanosín-5-trifosfato (GTP) en guanosín 3',5' cíclico monofosfato (GMPc) (35). La acumulación de GMPc en la célula conduce a una serie de acontecimientos cuyo resultado es la disminución del calcio citosólico y la inducción de relajación (36).

La tensión de cizallamiento hemodinámico o *shear stress* es un activador clave de la eNOS en condiciones fisiológicas, adaptando la perfusión tisular a los cambios en el gasto cardiaco (37). Otros factores que estimulan la liberación de NO son el aumento de L-arginina, los agonistas que aumentan

## Introducción

la concentración de calcio intracitoplásmico (trombina, bradiquinina, etc.), el VEGF (en respuesta a la hipoxia), las catecolaminas, la vasopresina, la histamina y la serotonina (liberada durante la agregación plaquetaria) (38).

La eNOS se inhibe en presencia de los análogos metilados de la L-arginina, como la N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA) (39), la N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) o la dimetilarginina asimétrica (ADMA) (40, 41) (Figura 1).



**Figura 1.** Formación de las principales sustancias endoteliales vasodilatadoras que regulan el tono vascular. **eNOS**: óxido nítrico sintasa endotelial; **L-NAME**: N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil éster; **O<sub>2</sub>**: oxígeno; **O<sub>2</sub><sup>-</sup>**: anión superóxido; **NO**: óxido nítrico; **GCs**: guanilato ciclasa soluble; **GTP**: guanosín-5-trifosfato; **GMPC**: guanosín 3',5' cíclico monofosfato; **COX**: ciclooxigenasa; **PGH<sub>2</sub>**: prostaglandina H<sub>2</sub>; **PGG<sub>2</sub>**: prostaglandina G<sub>2</sub>; **PGI<sub>2</sub>**: prostaciclina; **AMPc**: adenosín monofosfato cíclico; **EOX**: epoxigenasa; **EETs**: ácidos epoxieicosatrienoicos; **SOD**: superóxido dismutasa; **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: peróxido de hidrógeno; **Kca**: canales de K<sup>+</sup> activados por calcio; **K<sub>IR</sub>**: canales de K<sup>+</sup> rectificadores de entrada. Imagen modificada de (42).

El NO se considera un factor protector del endotelio dado que inhibe la inflamación, la proliferación celular y la trombosis y además limita la fosforilación oxidativa en la mitocondria (38).

### **2.1.2. Prostaciclina y tromboxano A<sub>2</sub>**

La prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) son metabolitos activos del ácido araquidónico (AA). El AA es oxidado por la cicloxigenasa (COX) dando lugar a endoperóxidos inestables (PGG<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub>), que se convierten en prostanoides estables por la acción de enzimas específicas (prostaciclina sintasa o tromboxano sintasa, entre otras).

La PGI<sub>2</sub> activa la adenilato ciclasa aumentando los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) que condiciona su efecto vasodilatador (por disminución de la concentración de calcio intracitosólico) (Figura 1). Además, tiene efecto antiagregante plaquetario (43).

El TXA<sub>2</sub> posee acciones antagónicas a la PGI<sub>2</sub>. Es sintetizado fundamentalmente en las plaquetas, aunque también en el endotelio. Actúa sobre los receptores TP localizados en el músculo liso vascular. Su activación conduce a un descenso del contenido de AMPc intracelular que fisiológicamente se traduce en una potente vasoconstricción y aumento de la agregación plaquetaria (44).

A medida que iba avanzando el conocimiento científico, se hizo evidente que existían dos isoformas de la COX, la COX1 constitutiva y la COX2 inducible. Se encuentran en distintos lugares dentro de la célula y las codifican genes diferentes. La COX1 desempeña un papel importante en la homeostasis vascular y la función plaquetaria, entre otras funciones. La COX2 se expresa tras la exposición a lipopolisacáridos o citoquinas proinflamatorias. Regula la producción de los prostanoides que participan

## Introducción

en la inflamación y en otros procesos no inflamatorios, tanto fisiológicos como patológicos. La formulación de inhibidores selectivos de la COX2 se convirtió en un objetivo farmacológico durante los años 90. Sin embargo, los estudios realizados en la primera mitad de esta década revelaron los efectos adversos de la inhibición de la COX2 en el sistema cardiovascular, como el aumento del riesgo de infarto de miocardio, la exacerbación de la insuficiencia cardiaca congestiva estable y el empeoramiento de la hipertensión arterial. En líneas generales, se relaciona la COX1 con la síntesis de prostanoïdes contráctiles y la COX2 con la síntesis de prostanoïdes relajantes (45).

### **2.1.3. Factor hiperpolarizante derivado del endotelio**

Bajo esta denominación se incluyen un grupo de compuestos generados por el endotelio que inducen vasodilatación. Los compuestos químicos que componen este grupo dependen del lecho vascular y se han postulado como candidatos: el ácido epoxieicosatrienoico (EET) (46), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (42, 47), la anandamida, el péptido natriurético tipo C (48) o el ion  $K^+$ . Este último se ha considerado el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF) en una amplia variedad de lechos vasculares (49-51). El EDHF actúa sobre las células del músculo liso abriendo los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  (Kca) e hiperpolarizando la membrana (Figura 1). A nivel vascular se han descrito tres tipos de Kca: de alta conductancia (BKca), intermedia (IKca) y baja (LKca) (30, 52).

Actualmente, para referirnos a este mecanismo que se inicia en el endotelio y estimula la hiperpolarización de la célula muscular llevando a la relajación del vaso, se prefiere la denominación de "hiperpolarización derivada del endotelio" (EDH). Así pues, ya no se utiliza la palabra "factor" (51). Esto es debido a que pueden existir diferentes factores dependiendo del lecho

vascular e incluso no necesariamente debe haber un factor, ya que las uniones gap entre el endotelio y el músculo liso podrían transmitir la hiperpolarización de una célula a otra sin necesidad de un factor (49, 53, 54). La participación de este mecanismo de relajación se incrementa a medida que el diámetro de las arterias disminuye (34).

En circunstancias fisiológicas el NO y el EDH actúan sinérgicamente (55). En casos de disfunción endotelial con disminución de la biodisponibilidad de NO, un incremento en la participación de la EDH puede compensar el déficit de NO (38).

#### **2.1.4. Endotelinas**

Las endotelinas son péptidos de 21 aminoácidos. Entre ellas, la endotelina-1 (ET-1) es la más importante, puesto que se trata del vasoconstrictor endógeno más potente. Es sintetizada por la célula endotelial y liberada a la pared del vaso. Su síntesis se da a partir de una proteína llamada preproendotelina-1, que se rompe a gran-endotelina-1, sobre la que actúa la enzima convertidora de endotelina, dando lugar a la ET-1. La acción de la ET-1 es mediada por dos receptores distintos, ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>. El ET<sub>A</sub> se localiza en el músculo liso vascular y su estimulación causa vasoconstricción. Sin embargo, el ET<sub>B</sub> está presente tanto en las células endoteliales como en las musculares y causa dilatación y contracción vascular (56, 57).

#### **2.1.5. Angiotensina II**

La angiotensina II (Ang II) es una hormona peptídica que forma parte del sistema renina-angiotensina-aldosterona. Se forma a partir de la angiotensina I (Ang I) por la acción de la enzima convertidora de la

## Introducción

angiotensina (ACE). Es agonista de los receptores ATR1 y ATR2 y tiene un importante papel en la regulación de la tensión arterial por su efecto sobre varios órganos diana. Produce vasoconstricción por efecto directo sobre la pared vascular y por activación del sistema nervioso simpático. Además, regula la reabsorción de agua e iones a nivel del túbulo renal de forma directa y por la activación de los sistemas hormonales de la aldosterona y la hormona antidiurética (58).

La Ang II juega un papel importante también en la disfunción endotelial, ya que disminuye la biodisponibilidad de NO mediante varios mecanismos, entre ellos la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En los últimos años se han realizado varios estudios que han demostrado que los efectos contráctiles de la Ang II podrían estar estrechamente relacionados con la producción de anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) (59, 60). La Ang II también produce condiciones favorables para la aterogénesis al regular al alza los receptores endoteliales de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (OxLDL) con el consiguiente desencadenamiento de la formación de la placa de ateroma y la apoptosis de células endoteliales. Por otro lado, aumenta los receptores para el VEGF y las metaloproteinasas de la matriz, lo que provoca un aumento de permeabilidad y el remodelado vascular. Así mismo, el desencadenamiento de los procesos de estrés oxidativo aumenta la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 y las citoquinas favoreciendo la trombosis y la inflamación (61).

## **2.2. Disfunción endotelial, estrés oxidativo y arteriosclerosis**

La disfunción endotelial se caracteriza por un desequilibrio en la liberación de factores endoteliales cuya consecuencia es un déficit de vasodilatación. La principal causa es una disminución en la biodisponibilidad de NO (62-64),



aunque otros factores derivados del endotelio, tanto relajantes como contráctiles, también podrían verse afectados (38).

Una de las características de la disfunción endotelial es una respuesta alterada a los estímulos dependientes del endotelio, como la bradiquinina o la acetilcolina (65), comúnmente utilizadas para evaluar la función endotelial en los estudios de reactividad vascular.

Los efectos vasodilatadores de la bradiquinina están mediados por el receptor de bradiquinina 1 (B1R) y el receptor de bradiquinina 2 (B2R). El B2R se expresa de forma constitutiva y abundante en el endotelio y su activación induce la liberación endotelial de NO, PGI<sub>2</sub> y/o EDHF. Por el contrario, el B1R se expresa en niveles bajos y se regula al alza en respuesta al estrés (isquemia-reperfusión, inflamación crónica, diabetes...) induciendo vasodilatación mediada por la liberación de NO (66). La vena safena humana produce una vasodilatación dependiente de endotelio en respuesta a la bradiquinina y los mecanismos implicados son la liberación de NO y de EDHF (67, 68). Se ha observado que la bradiquinina es desencadenante de los mecanismos endoteliales protectores. En células endoteliales cultivadas con bradiquinina se observó un aumento dependiente de la concentración (1 pM - 10 nM) de los iones de Ca<sup>2+</sup> citoplásmico. Además, este aumento fue acompañado por la liberación de NO (69). Otros estudios experimentales han demostrado que en oposición directa a la Ang II, la bradiquinina produce vasodilatación, ejerce un efecto antiinflamatorio, disminuye las ROS y tiene efectos antifibrinolíticos y antitrombóticos (70).

La acetilcolina también produce una vasodilatación dependiente de endotelio (71, 72), en este caso por la activación de los receptores muscarínicos localizados en la membrana de las células endoteliales. Se

## Introducción

han descrito 5 subtipos de receptores muscarínicos (M1-M5), siendo el M3 el más expresado en el endotelio (73). La consecuencia de la activación del M3 es el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que, tras unirse a la calmodulina, activa la eNOS y por tanto la síntesis de NO (74).

La disfunción endotelial subyace en todas las patologías cardiovasculares (75-77), así pues, se encuentra en la hipertensión arterial (78, 79), la hipercolesterolemia (80), la diabetes mellitus (81-83) y la obesidad (84), entre otras.

Centrándonos en la disfunción endotelial debida a una menor biodisponibilidad de NO, varios son los mecanismos que podrían desembocar en esta situación. Por ejemplo, la arginasa compite con la eNOS por el mismo sustrato, la L-arginina. Cuando la actividad de la arginasa aumenta, como ocurre en el infarto agudo de miocardio (85-87), se produce un mayor consumo de L-arginina, disminuyendo así la producción de NO. Por otra parte, las metilargininas como la ADMA o la L-NMMA compiten por el centro activo de la eNOS inhibiendo la síntesis de NO. Ésta es la causa de disfunción endotelial en pacientes urémicos (40). La dimetilarginina simétrica (SDMA) no compite con la L-arginina por unirse al centro activo de la eNOS, pero sí lo hace por unirse al transportador que introduce la L-arginina dentro de la célula, así que de manera indirecta podría también disminuir la biodisponibilidad de NO. Se han detectado niveles plasmáticos elevados de SDMA en pacientes con síndrome hepatorenal, pudiendo ser la causa de vasoconstricción y fallo renal en pacientes con cirrosis hepática (88). Las dimetilargininas son degradadas a L-citrulina por las dimetilarginina dimetilaminohidrolasas (DDAHs). La disminución en la actividad de las DDAHs puede contribuir a un aumento de estas sustancias y por tanto a una mayor inhibición de la eNOS (89).

El estrés oxidativo también puede contribuir a la disminución en la biodisponibilidad de NO y, por ende, a la disfunción endotelial. El estrés oxidativo se define como el desequilibrio entre los sistemas prooxidantes y antioxidantes a favor de los primeros. El exceso de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) derivadas del proceso fisiológico de la oxidación celular puede causar daño a elementos celulares esenciales (proteínas, lípidos, ADN, etc) llevando a la muerte celular por necrosis o apoptosis. Entre las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS) destacan:

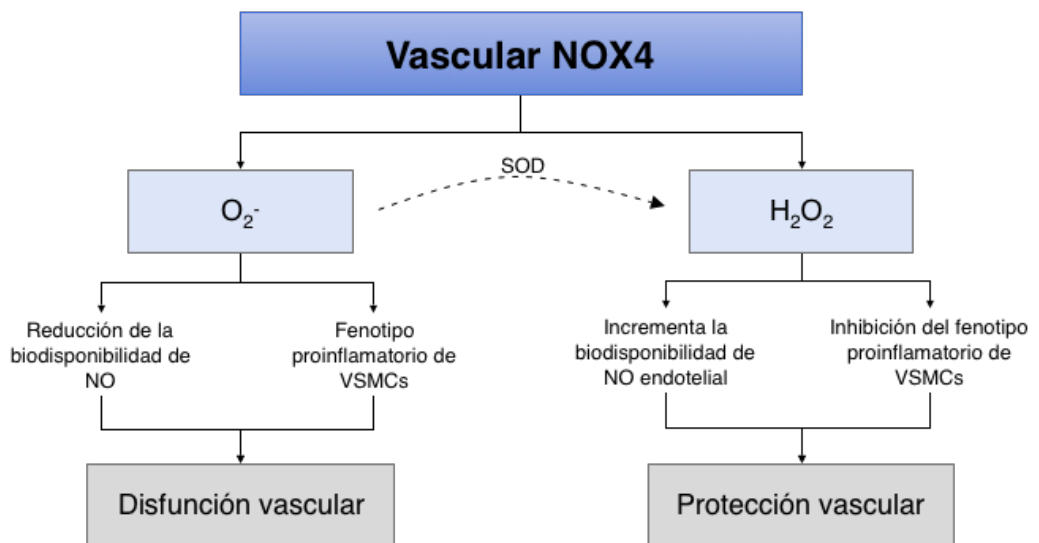
- Anión superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) u oxígeno reactivo.
- Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ): se forma a partir del  $\cdot\text{O}_2^-$  por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD).
- Radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ): se forma también a partir del  $\cdot\text{O}_2^-$  por la acción de catalizadores metálicos como el hierro o el cobre.
- Peroxinitrito ( $\cdot\text{ONOO}^-$ ): especie reactiva de nitrógeno que se forma a partir de la reacción del  $\cdot\text{O}_2^-$  con el NO, lo cual disminuye la biodisponibilidad de NO.

A nivel vascular, las principales fuentes de RONS son (90):

- La nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa o NOX). Esta enzima transforma el  $\text{O}_2$  en  $\cdot\text{O}_2^-$ . Se encuentra en las células endoteliales y en las células del músculo liso vascular. De las cinco isoformas que se conocen, todas excepto la NOX3 se encuentran a nivel vascular. La NOX1 se localiza en el músculo liso, la NOX2 en el endotelio. Se sabe que la Ang II aumenta la expresión génica de la NOX1 y NOX2 con los consiguientes efectos dañinos sobre el endotelio. La NOX4 es la más abundante a nivel vascular; se expresa en el endotelio 100 veces más que la NOX2. Para la NOX4 se han descrito dos vías de acción, de manera que dependiendo de la que predomine presenta un papel dañino

## Introducción

o protector del endotelio (Figura 2). Por un lado, produce  $\cdot\text{O}_2^-$  que disminuye la biodisponibilidad de NO y tiene un efecto proinflamatorio a nivel de la célula muscular lisa vascular con la consiguiente disfunción endotelial y, por otro lado, puede producir  $\text{H}_2\text{O}_2$  que activa la eNOS (91, 92) y por tanto aumenta la biodisponibilidad del NO e inhibe la proliferación de las células del músculo liso vascular con el consiguiente efecto protector. Sin embargo, la mayoría de autores le confieren un poder protector a nivel cardiovascular, puesto que se ha relacionado más con la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que con la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  (93, 94). Además, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  se ha postulado como un posible factor hiperpolarizante derivado del endotelio (42, 47, 95, 96). La NOX5, aunque menos estudiada, también se expresa a nivel vascular (97).



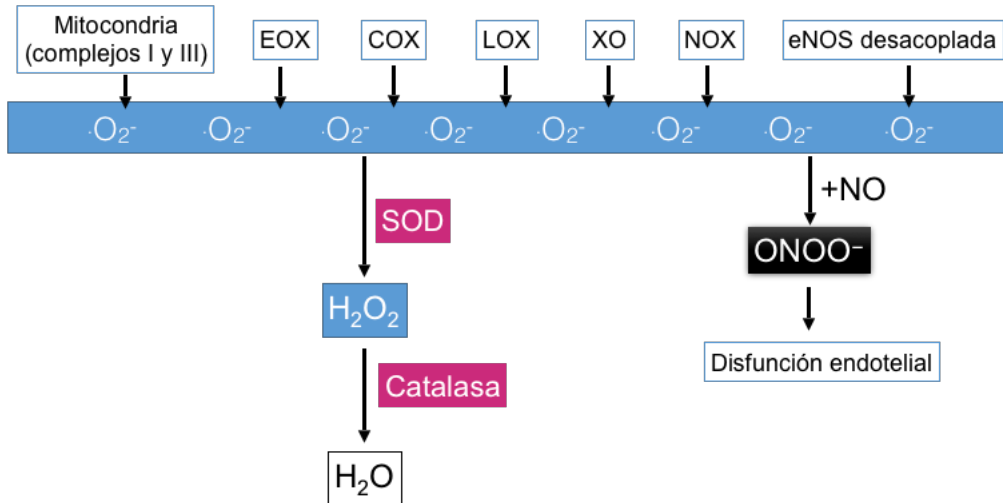
**Figura 2.** Efectos vasculares de la NOX4.  $\cdot\text{O}_2^-$ : anión superóxido;  $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrógeno; **SOD**: superóxido dismutasa; **NO**: óxido nítrico; **VSMCs**: células musculares lisas vasculares. Imagen modificada de (90).

- La eNOS desacoplada. Las principales causas del desacoplamiento de la eNOS son el déficit de L-arginina (debido a un aumento de la actividad de la arginasa) o de tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) (debido a un aumento de su oxidación), la glutación de la eNOS (en pacientes con hipertensión arterial y niveles elevados de Ang II) y el propio estrés oxidativo (98, 99). En un endotelio sano, con niveles bajos de  $\cdot\text{O}_2^-$ , la eNOS transforma la L-arginina en NO y produce vasodilatación. En la fase aguda del estrés oxidativo, con altos niveles de  $\cdot\text{O}_2^-$ , gran parte del NO formado a partir de la L-arginina se consume al interactuar con el  $\cdot\text{O}_2^-$  generando ONOO<sup>-</sup>, lo cual disminuye la vasodilatación por disminuir la síntesis de PGI<sub>2</sub> y la biodisponibilidad de NO. Si la situación de estrés oxidativo persiste, la eNOS desacoplada produce  $\cdot\text{O}_2^-$  a partir de L-arginina en lugar de NO, con lo que además de disminuir la biodisponibilidad de NO y producir disfunción endotelial aumenta los niveles de  $\cdot\text{O}_2^-$  perpetuando la situación de estrés oxidativo (90).
- La xantina oxidasa (XO), que forma  $\cdot\text{O}_2^-$  y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100). Estudios experimentales han demostrado que su expresión aumenta en respuesta a la Ang II y a la activación crónica del sistema renina-angiotensina-aldosterona (101).
- Otras fuentes de RONS también serían la COX, la lipoxigenasa (LOX), la epoxigenasa (EOX) y la fosforilación oxidativa en la mitocondria (Figura 3).

Para compensar el exceso de RONS existen en la célula estrategias defensivas. Las más importantes son las enzimas antioxidantes SOD, catalasa y glutatión peroxidasa. Otros antioxidantes celulares son la peroxirredoxina, la sulfirredoxina, la paraoxonasa, la glutatión S transferasa, la aldehído deshidrogenasa y el ácido ascórbico (vitamina C). La SOD

## Introducción

dismuta el  $\cdot\text{O}_2^-$  para producir  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que será posteriormente degradado, principalmente por la catalasa (Figura 3).



**Figura 3.** Principales fuentes de anión superóxido a nivel vascular. **EOX:** epoxigenasa; **COX:** ciclooxigenasa; **LOX:** lipoxigenasa; **XO:** xantina oxidasa; **NOX:** NADPH oxidasa; **eNOS:** óxido nítrico sintasa endotelial;  $\cdot\text{O}_2^-$ : anión superóxido; **SOD:** superóxido dismutasa;  **$\text{H}_2\text{O}_2$ :** peróxido de hidrógeno;  **$\text{H}_2\text{O}$ :** agua; **NO:** óxido nítrico;  **$\text{ONOO}^-$ :** peroxinitrito.

Existen tres isoformas de la SOD: la SOD1 o Cu/Zn-SOD se encuentra en la mitocondria, el citosol y los endosomas, la SOD2 o Mn-SOD se encuentra en la mitocondria y la SOD3 en el líquido extracelular.

En condiciones normales, el sistema antioxidante contrarresta el exceso de RONS para mantener el equilibrio. Cuando este equilibrio se rompe, el exceso de  $\cdot\text{O}_2^-$  disminuye la biodisponibilidad de NO llevando a una disfunción endotelial, con disminución de la respuesta vasodilatadora y un estado proinflamatorio y protrombótico.

El estrés oxidativo no supone una enfermedad en sí, pero aparece asociado a enfermedades neurodegenerativas (102, 103), cáncer (104) y enfermedades cardiovasculares (105). De ahí el interés en las sustancias antioxidantes que puedan minimizar los daños celulares inducidos por el estrés oxidativo.

### **3. Nanociencia y nanotecnología**

El prefijo “nano” ha sido aplicado en las últimas décadas a diferentes campos de conocimiento, como la nanociencia o la nanotecnología. Procede del griego antiguo y significa minúsculo. En el sistema internacional de unidades se usa para indicar un factor de reducción de  $10^{-9}$  veces. Por tanto, el nanomundo se mide en nanómetros y engloba sistemas cuyo tamaño está por encima de las dimensiones moleculares y por debajo de las macroscópicas, generalmente por encima de 1 nm y por debajo de 100 nm. Una de las bases de la nanociencia es el concepto de que la materia cambia de propiedades cuando se reduce su tamaño. Estos cambios empiezan a aparecer en el dominio cuántico, es decir por debajo de los 100 nm (106).

Por otro lado, la nanotecnología es la capacidad de convertir la teoría de la nanociencia en aplicaciones útiles observando, midiendo, manipulando, ensamblando, controlando y fabricando la materia a escala nanométrica (107). En los últimos tiempos la nanotecnología ha tenido un importante desarrollo, utilizándose actualmente en múltiples campos como la electrónica, los materiales, la cosmética y productos de higiene, el medio ambiente, los biomateriales o la medicina.

En el campo de la medicina, la aplicación de la nanotecnología recibe el nombre de nanomedicina. Los avances en este campo se han orientado

## Introducción

principalmente al desarrollo de nanopartículas, nanoestructuras y nanodispositivos para la detección temprana y el tratamiento de enfermedades neoplásicas, cardiovasculares, autoinmunes e infecciosas (108).

### 3.1. Nanopartículas

Las nanopartículas son partículas con dos o más dimensiones entre 1 y 100 nm (definición de la *American Society for Testing and Materials o ASTM*). Representan la transición entre los materiales sólidos volumétricos y las estructuras atómicas y moleculares.

Las nanopartículas han existido en el mundo desde siempre. De hecho, algunas civilizaciones ya las utilizaban debido a sus propiedades ópticas o medicinales. Un ejemplo de ello es el famoso Vaso de Lycurgus, creado por los romanos en el siglo IV D.C. y que está expuesto en el Museo Británico. Está compuesto por una matriz de vidrio que contiene nanopartículas de plata y oro que le proporcionan la peculiaridad de que se ve rojo si la luz lo atraviesa y verde si la luz se refleja en él. Otro ejemplo es el uso que hacían los egipcios de nanopartículas de oro como coloides medicinales para conservar la salud y la juventud.

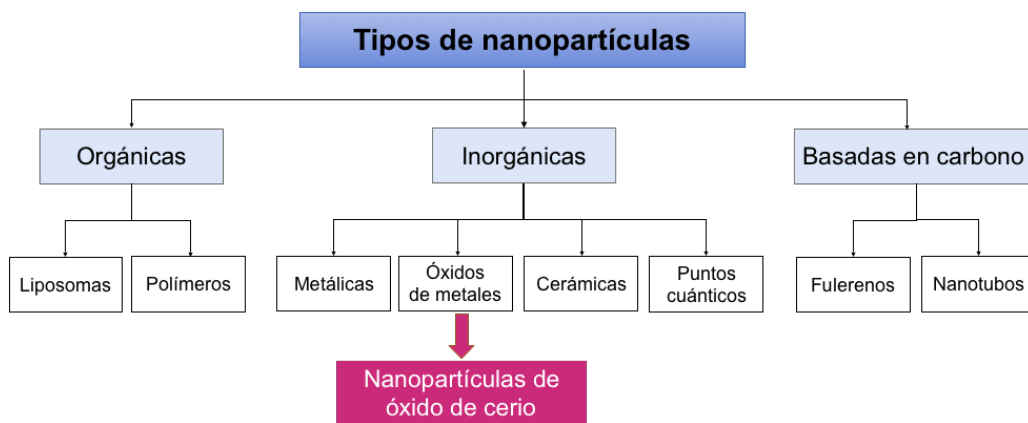
Además de su composición, las propiedades de las nanopartículas dependen de su tamaño y forma. Por ello se han creado diferentes métodos químicos y físicos de síntesis con el objetivo de poder diseñar las dimensiones, forma, composición y modificadores de superficie para así regular su comportamiento (109).

Debido a su mayor ratio superficie-masa, las nanopartículas pueden unirse, absorber o transportar otras moléculas (110), por lo que se plantea su uso



como liberadoras de fármacos. De esta manera, las nanopartículas evitan la degradación del fármaco desde el momento de la administración en el paciente hasta que alcanza su lugar de acción, lo que mejora su biodisponibilidad. Así mismo, es posible dirigir el fármaco directamente a la célula o tejido diana e incluso que se libere en compartimentos intracelulares disminuyendo así los efectos secundarios (p. ej. tratamiento del cáncer). Además, permite atravesar barreras biológicas (gastrointestinal, respiratoria, hematoencefálica, etc) a moléculas que de otra manera no serían capaces o en su caso dañarían los tejidos. Por otra parte, las nanopartículas se pueden utilizar de manera que imiten el comportamiento de ciertos microorganismos (biomimetismo) y sus estrategias para evitar los mecanismos de defensa del organismo y/o colonizar de forma específica determinados tipos de tejidos o células, lo que es de gran utilidad para el desarrollo de nuevas vacunas y tratamientos de inmunoterapia (111). Así también, algunas nanopartículas como las metálicas, las nanopartículas de oro o los puntos cuánticos tienen propiedades electrónicas, ópticas y de fluorescencia que permiten su uso como ligandos, para técnicas de imagen, secuenciación de ADN o como biosensores. Otras, como las nanopartículas de óxido de cerio, tienen la capacidad de ceder o captar electrones del medio. Por todo ello, las nanopartículas han sido consideradas como agentes teragnósticos, acrónimo de las palabras terapéutico y diagnóstico (112, 113).

Según su composición química, las nanopartículas se dividen en tres grupos principales: nanopartículas orgánicas (liposomas y polímeros), nanopartículas inorgánicas (metales, óxidos metálicos, cerámicas y puntos cuánticos) y nanopartículas de carbono (90) (Figura 4).



**Figura 4.** Tipos de nanopartículas según su composición química. Imagen modificada de (90).

### 3.2. Nanopartículas de óxido de cerio

Dentro de las nanopartículas inorgánicas se encuentran las nanopartículas de óxidos de metales que exhiben actividad catalítica y antioxidante, estabilidad química y ciertas propiedades ópticas y de biocompatibilidad, lo que las hace adecuadas para aplicaciones biomédicas. Las más usadas son de óxido de hierro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), titanio ( $\text{TiO}_2$ ), zirconio ( $\text{ZrO}_2$ ) y más recientemente, cerio ( $\text{CeO}_2$ ). Esta tesis se centra en las nanopartículas de óxido de cerio ( $\text{CeO}_2\text{NPs}$ ).

En el ámbito biomédico, las  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  han demostrado resultados prometedores en tratamientos contra el cáncer, debido a sus propiedades terapéuticas y como vehículos de administración de fármacos dirigidos. Estudios recientes demuestran que las  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  son citotóxicas para las células cancerígenas mientras que no afectan a las células sanas. Este efecto puede ser debido a que las células cancerígenas tienen un pH más ácido en el citosol que las células sanas (114, 115). En estas condiciones

las CeO<sub>2</sub>NPs pierden sus propiedades antioxidantes y se comportan como un potente oxidante de componentes intra y extracelulares que inducen apoptosis (116) únicamente en las células cancerígenas preservando la integridad en las células sanas. Como vehículo de administración de fármacos, se han desarrollado unas CeO<sub>2</sub>NPs modificadas con β-cyclodextrina (fármaco anticancerígeno) y acopladas a nanopartículas mesoporosas de sílice con resultados prometedores. Esta asociación es capaz de conseguir la liberación de β-cyclodextrina en el interior de las células cancerígenas de pulmón. Esta liberación del fármaco, mucho más dirigida a las células diana, aumentaría la eficacia del tratamiento (117). Las CeO<sub>2</sub>NPs se han usado también para transportar doxorrubicina, un antibiótico utilizado en la quimioterapia del cáncer. Cuando la doxorrubicina se administra transportada mediante estas nanopartículas aumenta la eficacia antitumoral (118), logrando efectos terapéuticos sinérgicos (119). Estos resultados se deben a la mayor captación celular de doxorrubicina cuando es transportada con CeO<sub>2</sub>NPs en comparación con la doxorrubicina libre. Además, a pH más ácido, la liberación de la doxorrubicina del complejo con la nanopartícula de óxido de cerio aumenta (118), estableciendo un sistema de liberación de fármacos sensible al pH. A menor pH, las CeO<sub>2</sub>NPs muestran una actividad prooxidante, de ahí que se logren efectos terapéuticos sinérgicos (119).

En la terapia fotodinámica también se han utilizado CeO<sub>2</sub>NPs como base de un sistema multifuncional de administración de fármacos (120). Esta técnica basada en el uso de un agente fotosensibilizador es útil para tratar cánceres resistentes a fármacos debido al elevado grado de captación del agente fotosensibilizador por las células cancerígenas. Primero, el agente fotosensibilizador debe ser captado por las células cancerígenas, luego se estimula a la longitud de onda adecuada, lo que induce la formación de radicales libres y muerte celular.

## Introducción

En la terapia génica, basada en la transferencia de material genético a la célula diana, las CeO<sub>2</sub>NPs podrían usarse como vectores no virales. Usar un vector no viral ofrece ciertos beneficios como la mayor reproducibilidad o la menor toxicidad. Hasanzadeh et al. (121), diseñaron una nueva clase de transportador de genes usando CeO<sub>2</sub>NPs. Debido a la capacidad antioxidante dependiente de pH que se le atribuye a las CeO<sub>2</sub>NPs, este estudio concluye la idoneidad potencial de usarlas por su capacidad citotóxica innata frente a las células tumorales, sin afectar a las células sanas.

Por otro lado, diversos estudios han demostrado que las CeO<sub>2</sub>NPs pueden actuar como agentes antioxidantes y antiinflamatorios por su capacidad en la captación de RONS (112, 122, 123). Las CeO<sub>2</sub>NPs poseen tanto actividad catalasa como SOD (124-128) y son capaces de captar las ROS intracelulares, reduciendo entre un 5-25 % sus niveles en cultivos celulares expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (129). El estado de oxidación del cerio de la superficie de la nanopartícula es crucial para su capacidad mimética de la SOD (112). De esta manera, si la relación Ce<sup>3+</sup>/Ce<sup>4+</sup> disminuye, también lo hace su capacidad para eliminar el ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, por lo tanto cuanto más concentración de Ce<sup>+3</sup> haya en la superficie de la nanopartícula mayor poder de eliminación del ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> (124). Sin embargo, las CeO<sub>2</sub>NPs también mimetizan la catalasa y en este caso sorprendentemente, la actividad mimética de la catalasa se correlaciona con un nivel reducido de Ce<sup>3+</sup> (126). Estas propiedades antioxidantes son de gran interés en el tratamiento de enfermedades relacionadas con estrés oxidativo. Por ejemplo, la producción de radicales libres y el aumento de estrés oxidativo son características comunes de las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o el Parkinson (102). En este sentido, la administración de antioxidantes podría constituir una herramienta terapéutica útil (130-132). Sin embargo, las sustancias antioxidantes clásicas tienen un efecto limitado puesto que no

son internalizadas por las células de forma directa y además no son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (133, 134). En este caso, el desarrollo de las CeO<sub>2</sub>NPs ha sido de gran interés debido a sus propiedades antioxidantes y a que atraviesan la barrera hematoencefálica con gran facilidad (125). La unión de las CeO<sub>2</sub>NPs con el NO, mediador de la inflamación, las convierte también en potenciales agentes antiinflamatorios (135). De hecho, se ha demostrado que las CeO<sub>2</sub>NPs son capaces de inhibir la activación de NF-κB *in vitro* en cardiomiocitos de rata (136), por lo que se reduce la expresión de proteínas proinflamatorias como la iNOS.

### **3.3. Sistema vascular y nanopartículas de óxido de cerio**

Mucho menos desarrolladas se encuentran las aplicaciones sobre el sistema cardiovascular. Es por ello que el presente estudio se centra en este campo, especialmente en la reactividad vascular.

Como se ha descrito anteriormente, la disfunción y las lesiones de las células endoteliales se consideran características fisiopatológicas de las enfermedades cardiovasculares que, a menudo, son inducidas por la producción de estrés oxidativo el cual puede activar la vía de apoptosis. En cultivos de células endoteliales de cordón umbilical humano, las CeO<sub>2</sub>NPs eran capaces de contrarrestar la producción de ROS inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de reducir el ratio de necrosis y apoptosis (137). Estos resultados revelan que las CeO<sub>2</sub>NPs podrían ser usadas en tratamientos novedosos para controlar las enfermedades cardiovasculares. La disfunción endotelial conlleva, inevitablemente, la pérdida del poder vasodilatador dependiente del endotelio y como consecuencia el aumento de los efectos vasoconstrictores (38). Como resultado de este desequilibrio queda comprometida la reactividad vascular por aumento de la resistencia. En este sentido, la

## Introducción

absorción de CeO<sub>2</sub>NPs por las células endoteliales y el efecto que producen sobre su viabilidad, podría preservar la liberación de mediadores relajantes que devuelvan el equilibrio entre las sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras endoteliales. De igual forma, las CeO<sub>2</sub>NPs se podrían dirigir al músculo liso vascular disminuyendo la contracción en patologías como la hipertensión, diabetes o la dislipemia que cursan con un aumento del tono vasomotor.

En células endoteliales, las CeO<sub>2</sub>NPs no alteran la viabilidad celular, reducen el estrés oxidativo y la inflamación. Además, reducen el acortamiento de los telómeros, contrarrestando posiblemente la senescencia prematura. Todo ello las posiciona como candidatas prometedoras para tratar afecciones relacionadas con el estrés oxidativo vascular (138). Más efectos beneficiosos de las CeO<sub>2</sub>NPs sobre el sistema vascular los encontramos en la protección que ofrecen en la isquemia cerebral aguda en un modelo de reperfusión en ratas. El mecanismo, de nuevo, está relacionado con sus propiedades antioxidantes (139). En un modelo experimental de cirrosis en rata, las CeO<sub>2</sub>NPs también han demostrado efectos beneficiosos, disminuyendo el estrés oxidativo y la inflamación en el endotelio de la vena porta (140). Sin embargo, Minarchick et al. (141) defienden que la administración intravenosa y gástrica de CeO<sub>2</sub>NPs empeora la función vascular en la microcirculación. Los mecanismos subyacentes no quedan claros. No obstante, el mismo grupo defiende que las CeO<sub>2</sub>NPs mejoran la disfunción endotelial inducida por la hipertensión arterial en un modelo de rata. La explicación de Minarchick et al. (142) es que las CeO<sub>2</sub>NPs, por su potencial antioxidante, podrían ser capaces de reducir estos altos niveles de ROS mejorando la función vascular.

**HIPÓTESIS**





Una de las mayores preocupaciones tras la cirugía de *bypass* coronario es la durabilidad de los injertos. Como se ha explicado anteriormente, la causa más frecuente de oclusión a largo plazo de los mismos es el desarrollo de arteriosclerosis tanto del propio injerto como del lecho arterial nativo distal. La disfunción endotelial inducida frecuentemente por estrés oxidativo es un mecanismo fuertemente asociado a la formación de la placa de ateroma y relacionado con todos los factores de riesgo cardiovascular, por lo que el estudio de agentes antioxidantes a nivel vascular es de gran interés en el campo de la cirugía cardiovascular.

En base a los antecedentes expuestos, nuestra hipótesis es que las CeO<sub>2</sub>NPs podrían tener propiedades antioxidantes a nivel vascular, especialmente por actuar como miméticas de la SOD y disminuir los niveles de ·O<sub>2</sub>·. Esto aumentaría la biodisponibilidad de NO y revertiría la disfunción endotelial ocasionada por el estrés oxidativo asociado con enfermedades cardiovasculares.



## **OBJETIVOS**



## Objetivo general

La vena safena interna procedente de pacientes sometidos a cirugía de *bypass* coronario no suele presentar una buena función endotelial. Nuestro objetivo general es estudiar si la incubación con CeO<sub>2</sub>NPs en este lecho venoso ejerce un efecto antioxidante mejorando la homeostasis vascular.

## Objetivos específicos

1. Estudiar el efecto de las CeO<sub>2</sub>NPs sobre la relajación independiente de endotelio (en respuesta al nitroprusiato sódico) en ausencia (control) y en presencia de CeO<sub>2</sub>NPs.
2. Estudiar el efecto de las CeO<sub>2</sub>NPs sobre la relajación dependiente de endotelio (en respuesta a la bradiquinina y la acetilcolina) en ausencia (control) y en presencia de CeO<sub>2</sub>NPs.
3. Analizar la expresión proteica de eNOS, eNOS fosforilada (peNOS) en Ser 1177, GCs y canales BKca como principales proteínas relacionadas con la vasodilatación en ausencia (control) y en presencia de CeO<sub>2</sub>NPs.
4. Analizar la expresión proteica de los principales sistemas prooxidantes y antioxidantes a nivel vascular en ausencia (control) y en presencia de CeO<sub>2</sub>NPs. Nos centramos en la SOD1, SOD2 y NOX4.
5. Estudiar el efecto de las CeO<sub>2</sub>NPs sobre la contracción inducida por norepinefrina (NE), TXA<sub>2</sub>, ET-1 y Ang II. En caso de observarse diferencias con la incubación de CeO<sub>2</sub>NPs se analizaría la expresión de los diferentes receptores implicados.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**





## 1. Grupo de estudio

Este estudio se realizó utilizando muestras de vena safena interna de pacientes sometidos a cirugía de *bypass* coronario en el Hospital Clínico Universitario de Valencia.

El protocolo de estudio fue aprobado por el comité ético de investigación clínica del Hospital Clínico Universitario de Valencia y se realizó de conformidad con la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes firmaron consentimiento informado previamente a la cirugía y a la extracción de las muestras.

Se incluyeron 95 pacientes en base a criterios de inclusión como se detalla en la tabla 1.

**Tabla 1.** Criterios de inclusión y exclusión de los pacientes.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Pacientes mayores de 18 años	Pacientes que pertenezcan a otros estudios clínicos
Con indicación de cirugía de <i>bypass</i> coronario	Pacientes que rechacen participar en el estudio
Ingresados en el Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Clínico de Valencia	
Que acepten ser incluidos tras firma de consentimiento informado por el propio paciente o por el representante legal o familiar	

## Material y métodos

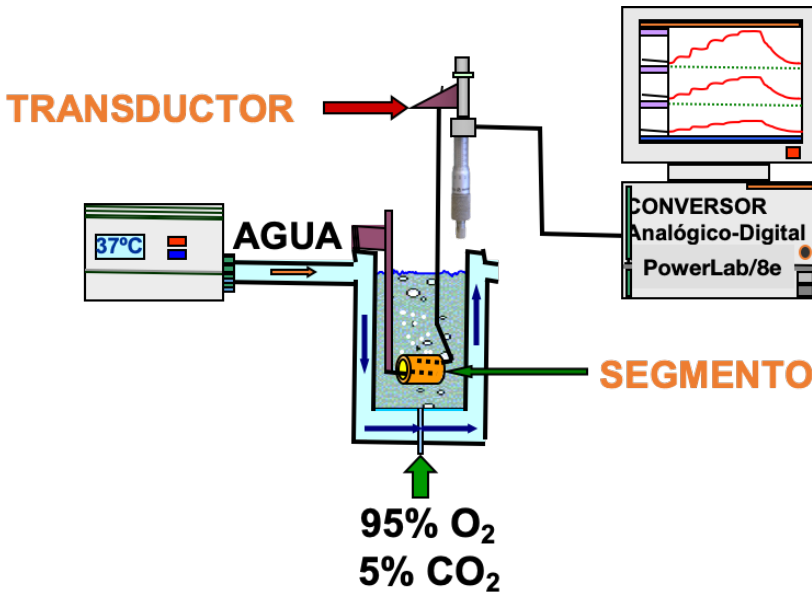
Se utilizó vena safena interna para la revascularización de todos los vasos diana salvo para la arteria descendente anterior donde se usó arteria mamaria interna según la práctica rutinaria del Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

### **2. Obtención de las muestras de vena safena interna**

Los segmentos de vena safena interna fueron obtenidos durante cirugía de *bypass* coronario. El procedimiento para la preparación quirúrgica del injerto se realizó según el método tradicional. La vena safena interna se disecó cuidadosamente y se ligaron sus ramas. Se midió la longitud necesaria para realizar los injertos y el segmento de vena excedente sin dilatar se colocó inmediatamente en una solución de suero salino frío y se trasladó al laboratorio. En la mayor parte de los casos el experimento se realizó el mismo día de la extracción quirúrgica y todos los tejidos se utilizaron dentro de las siguientes 18 horas.

### **3. Preparación de las muestras**

Se realizó la limpieza de las muestras de vena safena interna, retirando la grasa perivascolar, en una placa de Petri con solución salina (NaCl 0,9%) fría, bajo una lupa de disección (Wild M3C) iluminada con luz fría. Posteriormente las muestras se cortaron en segmentos de 3 mm de longitud y se montaron en un sistema para el registro de la tensión isométrica (Figura 5).



**Figura 5.** Baño de órganos y sistema para el registro de la tensión isométrica.

La preparación experimental consistió en introducir dos alambres rígidos (200  $\mu\text{m}$  de diámetro) de acero inoxidable a través de la luz del segmento venoso. Uno de los alambres se unió a un soporte que a su vez se fijó a la pared del baño de órganos; el otro alambre, que es móvil y se desplaza paralelamente al anterior, se conectó a un transductor de fuerza (FT03 Grass Instruments). Cada segmento venoso, con los alambres introducidos en su luz, se colocó en un baño de órganos que contenía 4 ml de solución fisiológica (solución de Krebs) cuya composición es la siguiente (en mM): NaCl 115; KCl 4,6;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1,2;  $\text{CaCl}_2$  2,5;  $\text{NaHCO}_3$  25; glucosa 11,1 y EDTA disódico 0,01. Esta solución se equilibró con una mezcla gaseosa (95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$ ) que proporcionó un pH entre 7,3 - 7,4. La temperatura de la solución se mantuvo a 37 °C durante todo el experimento. Un tornillo micrométrico unido al transductor de fuerza permitió aplicar al segmento

## Material y métodos

venoso la tensión pasiva adecuada separando los alambres. Los cambios de tensión isométrica se registraron en un ordenador Macintosh utilizando un software Chart v7 y un sistema de adquisición de datos PowerLab/8e (AD Instruments). Una vez montados, los segmentos venosos se dejaron estabilizar en el baño de órganos durante 1 hora, renovándose la solución de Krebs con lavados cada 15 minutos.

Al inicio de cada experimento, se comprobó la capacidad contráctil del músculo liso vascular por su respuesta al KCl (60 mM), y la integridad funcional del endotelio por la relajación provocada por bradiquinina ( $10^{-7}$  -  $10^{-6}$  M) en segmentos previamente contraídos con NE ( $10^{-7}$  -  $3 \times 10^{-7}$  M). Se descartaron aquellos segmentos que no respondieron más de 1g al KCl (60 mM) y que no relajaron más de un 40% a la bradiquinina ( $10^{-7}$  M). Cada condición experimental se realizó en un segmento venoso diferente.

### **4. Tensión pasiva óptima**

Se realizaron una serie de experimentos preliminares en segmentos de vena safena interna de semejante longitud y diámetro con el fin de determinar la tensión pasiva óptima. Para ello se registró la contracción inducida por el KCl (60 mM) después de exponer los segmentos venosos a diversas tensiones pasivas (1, 2, 3 y 4 g). La tensión pasiva a la que se obtuvo la mayor respuesta contráctil al KCl se consideró como la tensión óptima de reposo. La tensión pasiva óptima para los segmentos de vena safena interna humana fue de 3 g.

Para aplicar la tensión pasiva adecuada, los segmentos se distendieron separando los alambres mediante el tornillo micrométrico. Dado que la respuesta inmediata a la distensión es la relajación, la tensión se reajustó

periódicamente hasta alcanzar una tensión óptima de reposo. Posteriormente se mantuvo a ese nivel de tensión durante 1 hora de acomodación, previo a la realización del experimento.

## 5. Curvas concentración-respuesta

Las curvas concentración-respuesta se obtuvieron de forma acumulativa, de manera que la concentración del fármaco en el baño cuando se aplicó una dosis fue la resultante de la suma de ésta última con las administradas anteriormente. El cambio de concentración se llevó a cabo cuando la dosis anterior había desarrollado su efecto máximo.

Se construyeron curvas concentración-respuesta a los siguientes agonistas:

### 5.1. Nitroprusiato sódico

Para estudiar el efecto de las CeO<sub>2</sub>NPs sobre la respuesta vasodilatadora independiente de endotelio se construyeron curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico ( $10^{-10}$  -  $10^{-6}$  M), un dador de NO, en ausencia (control) y presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (10, 20 y 40 µg/ml).

Además, para analizar la contribución del  $\cdot O_2^-$  en la respuesta al nitroprusiato sódico, se construyeron curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico ( $10^{-10}$  -  $10^{-6}$  M) en ausencia (control) y presencia de tempol ( $10^{-3}$  M), un mimético de la SOD que descompone el  $\cdot O_2^-$  en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## 5.2. Bradiquinina y acetilcolina

Para estudiar el efecto de las CeO<sub>2</sub>NPs sobre la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio se construyeron curvas concentración-respuesta a la bradiquinina (10<sup>-9</sup> - 10<sup>-5</sup> M) y a la acetilcolina (10<sup>-9</sup> - 10<sup>-6</sup> M) en ausencia (control) y presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (10, 20 y 40 µg/ml) y CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml) respectivamente.

Además, para analizar la contribución de los factores endoteliales en la respuesta a la bradiquinina, se construyeron curvas concentración-respuesta a la bradiquinina (10<sup>-6</sup> M) en ausencia (control) y presencia de:

- Indometacina (10<sup>-5</sup> M), un inhibidor de la COX.
- L-NAME (10<sup>-4</sup> M), un inhibidor de la NOS.
- Cloruro de tetraetilamonio (TEA, 10<sup>-3</sup> M), un bloqueante de los canales K<sub>ca</sub> relacionados con la EDH.
- Tempol (10<sup>-3</sup> M).

## 5.3. Norepinefrina

Para estudiar el efecto de las CeO<sub>2</sub>NPs sobre la respuesta vascular adrenérgica se construyeron curvas concentración-respuesta a la NE (10<sup>-9</sup> - 10<sup>-5</sup> M), un agonista de los receptores α-adrenérgicos, en ausencia (control) y presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml).

## 5.4. Tromboxano A<sub>2</sub>

Para estudiar el efecto de las CeO<sub>2</sub>NPs sobre la respuesta contráctil derivada de la activación de los receptores TP, se construyeron curvas concentración-respuesta al U46619 (10<sup>-10</sup> - 10<sup>-6</sup> M), un análogo del TXA<sub>2</sub>, en ausencia (control) y presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml).

### 5.5. Endotelina-1

Para estudiar el efecto de las CeO<sub>2</sub>NPs sobre la respuesta contráctil a la ET-1, se realizaron curvas concentración-respuesta a la ET-1 ( $10^{-11}$  -  $10^{-7}$  M) en ausencia (control) y presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml).

### 5.6. Angiotensina II

Para estudiar el efecto de las CeO<sub>2</sub>NPs sobre la respuesta contráctil a la Ang II, se realizaron curvas concentración-respuesta a la Ang II ( $10^{-11}$  -  $3 \times 10^{-7}$  M), en ausencia (control) y presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml).

Además, para analizar la participación del  $\cdot O_2^-$  en la respuesta a la Ang II, se realizaron curvas concentración-respuesta a la Ang II ( $10^{-11}$  -  $3 \times 10^{-7}$  M) en ausencia (control) y presencia de tempol ( $10^{-3}$  M).

## 6. Fármacos y soluciones

Cloruro de acetilcolina, nitroprusiato sódico, L-NAME, cloruro de tetraetilamonio, indometacina, clorhidrato de norepinefrina, endotelina-1, U46619, angiotensina II y tempol todos ellos distribuidos por Sigma. Cloruro potásico distribuido por Panreac. Las soluciones concentradas de los fármacos utilizados en baño de órganos se realizaron con agua bidestilada, excepto la indometacina que se disolvió en etanol y bicarbonato sódico (150 mM) ajustado a un pH 7,4 con HCl. La concentración de etanol final en el baño fue inferior al 0,01%. Las diluciones correspondientes se hicieron con solución fisiológica (NaCl 0,9%).

## **7. Análisis de la expresión proteica mediante Western-Blot**

Con el fin de analizar los efectos de las CeO<sub>2</sub>NPs sobre las vías de señalización celular relacionadas con el mantenimiento del tono vascular, así como las principales enzimas de los sistemas prooxidante y antioxidante de la pared vascular, se determinó la expresión proteica de eNOS, peNOS, canales BKca, GCs, SOD1, SOD2 y NOX4, en ausencia (control) y presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml).

### **7.1. Incubación de los segmentos de venosos**

Se utilizaron segmentos limpios de grasa perivascular de 3 mm de longitud de vena safena interna y se mantuvieron en solución de Krebs a 37°C equilibrada con una mezcla gaseosa (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>). Posteriormente se incubaron durante 30 minutos en ausencia (control) y presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml). Tras la incubación, los segmentos fueron rápidamente congelados en nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C hasta el momento de la extracción de proteínas.

### **7.2. Extracción y cuantificación de proteínas**

Se sumergieron 50 mg de tejido vascular en tampón de lisis (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 19% glicerol y 1% (v/v) inhibidor de proteasas) en un microtubo de 1,5 ml y se homogeneizaron mediante fricción mecánica. Los homogeneizados se congelaron toda la noche a -20°C y al día siguiente se centrifugaron a 4°C, 10.000 r.p.m. durante 20 minutos. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas totales por el método del ácido bicinconónico (BCA) utilizando una curva estándar de seroalbúmina bovina (BSA).



### 7.3. Separación y transferencia de proteínas

Una vez conocida la concentración de proteínas de cada muestra, se añadió 0,5% (v/v) 2-mercaptoetanol y 1% (v/v) azul de bromofenol y se calentó a 95°C durante 5 minutos. Las proteínas se separaron mediante electroforesis desnaturante SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). Para ello, se cargaron 20 - 40 µg de proteína de cada muestra en geles de resolución, preparados con un gradiente de poliacrilamida del 4 - 15% en función del peso molecular de la proteína a estudiar. Así mismo, se utilizó una proteína estándar multicolor (Broad MultiColor Pre-Stained Protein Standard, GenScript) para verificar la eficacia de la transferencia y determinar el tamaño aproximado de las proteínas de interés. La electroforesis se realizó en el sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio Rad), que contenía un tampón de migración (Tris 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0.1% (p/v), pH 8,3), y se aplicó un voltaje constante de 140 V durante 50-60 minutos. Tras la electroforesis, las proteínas separadas en el gel fueron transferidas en medio húmedo a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad, Hércules, CA, EE.UU) activada previamente con metanol. Para la transferencia se usó un tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM y metanol 20%), y se aplicó un voltaje constante de 40 V durante 1 hora a 4°C.

### 7.4. Inmunodetección

Para la inmunodetección, las membranas se incubaron con una solución de bloqueo para impedir las uniones inespecíficas, compuesta por BSA al 5% en TBS-Tween (Tris-Cl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1%, pH 7.5). El bloqueo se realizó en agitación suave, a temperatura ambiente, durante 1 hora. A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo

## Material y métodos

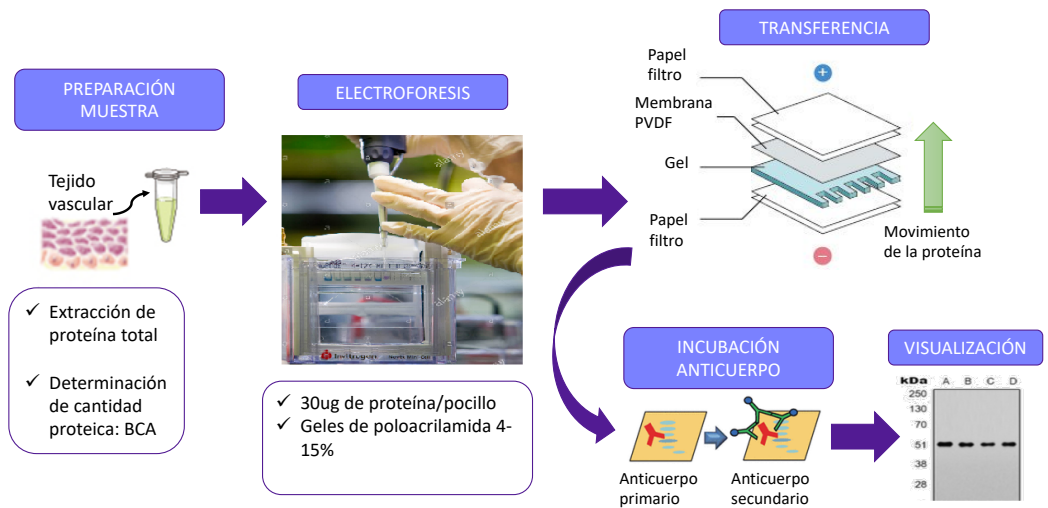
primario, diluido en la solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C, en agitación suave (Tabla 2).

**Tabla 2.** Anticuerpos primarios utilizados para la determinación de la expresión proteica por Western-Blot.

<b>Anticuerpos primarios</b>			
<b>Anticuerpo</b>	<b>Peso molecular (KDa)</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>eNOS</b>	133	1:250	Abcam
<b>peNOS</b>	140	1:250	Thermo Fisher Scientific
<b>GCs</b>	67	1:500	Santa Cruz
<b>BKca</b>	115	1:500	Abcam
<b>SOD1</b>	16	1:1000	Thermo Fisher Scientific
<b>SOD2</b>	20	1:1000	Thermo Fisher Scientific
<b>NOX4</b>	67	1:500	Invitrogen
<b>ATR1</b>	41	1:1000	Thermo Fisher Scientific
<b>ATR2</b>	41	1:1000	Thermo Fisher Scientific
<b>ACE2</b>	120	1:1000	Thermo Fisher Scientific
<b><math>\alpha</math>-tubulina</b>	50	1:1000	Sigma-Aldrich
<b><math>\beta</math>-actina</b>	42	1:10000	Novus

Al día siguiente, las membranas se lavaron con TBS-Tween (3 lavados de 5 minutos) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario (anti-rabbit para eNOS, peNOS, canales BKca, SOD1 y NOX4; y anti-mouse para SOD2,  $\beta$ -actina y  $\alpha$ -tubulina) conjugado con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP), diluido en la solución de

bloqueo. Finalmente, tras lavar las membranas varias veces con TBS-Tween para eliminar el exceso del anticuerpo secundario, se incubaron con el reactivo comercial ECL (Pierce, Thermo Scientific), que permite la detección por quimioluminiscencia de los anticuerpos conjugados con HRP. La actividad de la peroxidasa se visualizó mediante el sistema ImageQuant LAS-4000 (GE Healthcare Life Science, Barcelona, Spain). La señal obtenida se cuantificó por densitometría utilizando el software ImageJ (Figura 6).



**Figura 6.** Determinación de la expresión proteica mediante Western-Blot.

## 8. Análisis estadístico

Los resultados para reactividad vascular se indican como la media  $\pm$  error estándar y para la expresión proteica como la media  $\pm$  desviación estándar.

## Material y métodos

Las curvas concentración-respuesta a agonistas relajantes se realizaron en segmentos venosos previamente contraídos con NE ( $3 \times 10^{-7}$  M) que corresponde a un efecto contráctil aproximado al 70% de la contracción máxima obtenida en respuesta a 60 mM de KCl. Las curvas concentración-respuesta a agonistas contráctiles se representan en porcentaje de contracción con respecto a la contracción obtenida en respuesta a 60 mM de KCl.

La concentración eficaz 50 ( $CE_{50}$ ), es decir, la concentración de agonista que produce el 50 % de la respuesta máxima ( $E_{max}$ ), se calculó para cada curva concentración-respuesta por un método de análisis de regresión no lineal. Los resultados se expresan como el valor de  $pD_2 \pm$  el error estándar, donde  $pD_2 = -\text{Log}(CE_{50})$ . En cada grupo de experimentos,  $n$  indica el número de individuos.

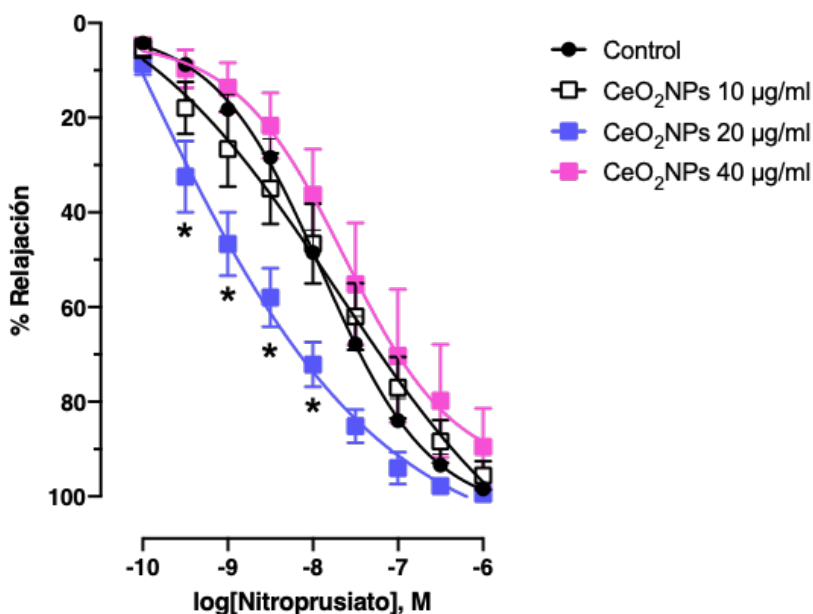
En los experimentos de reactividad vascular, las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. Para el análisis de expresión proteica, en los que se utilizaron las mismas venas en condiciones de control y experimentales, se utilizó una prueba t pareada. En todos los casos se consideraron las diferencias significativas cuando el valor de  $p < 0,05$ . El análisis estadístico se realizó con GraphPad Prism 8.2.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## **RESULTADOS**



## 1. Efecto de las nanopartículas de óxido de cerio sobre la respuesta al nitroprusiato sódico

Para estudiar el efecto de las CeO<sub>2</sub>NPs sobre la relajación independiente de endotelio, se realizaron curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico ( $10^{-10}$  -  $10^{-6}$  M) en ausencia (control) y en presencia de diferentes concentraciones de CeO<sub>2</sub>NPs (10, 20 y 40  $\mu\text{g/ml}$ ). Se observó que las CeO<sub>2</sub>NPs a la concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$  aumentaron la respuesta vasodilatadora (Figura 7 y tabla 3).



**Figura 7.** Curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico ( $10^{-10}$  -  $10^{-6}$  M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (10, 20 y 40  $\mu\text{g/ml}$ ). Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar. \* $p < 0,05$  comparado con el control.

## Resultados

**Tabla 3.** Valores de  $pD_2 \pm$  error estándar (e.e.) y del  $E_{max} \pm$  error estándar (e.e.), en respuesta al nitroprusiato sódico en segmentos de vena safena en las diferentes condiciones experimentales.

<b>Nitroprusiato sódico</b>	<b>n</b>	<b><math>pD_2 \pm</math> e.e</b>	<b><math>E_{max} \pm</math> e.e</b>
Control	12	$7,9 \pm 0,1$	$98,3 \pm 0,8$
CeO <sub>2</sub> NPs 10 $\mu$ g/ml	5	$7,8 \pm 0,1$	$95,6 \pm 2,9$
CeO <sub>2</sub> NPs 20 $\mu$ g/ml	6	$8,5 \pm 0,1^*$	$99,5 \pm 0,5$
CeO <sub>2</sub> NPs 40 $\mu$ g/ml	6	$7,6 \pm 0,2$	$89,5 \pm 8,0$
Tempol $10^{-3}$ M	3	$8,7 \pm 0,1^*$	$100,0 \pm 0,1$

$n$  = número de pacientes.

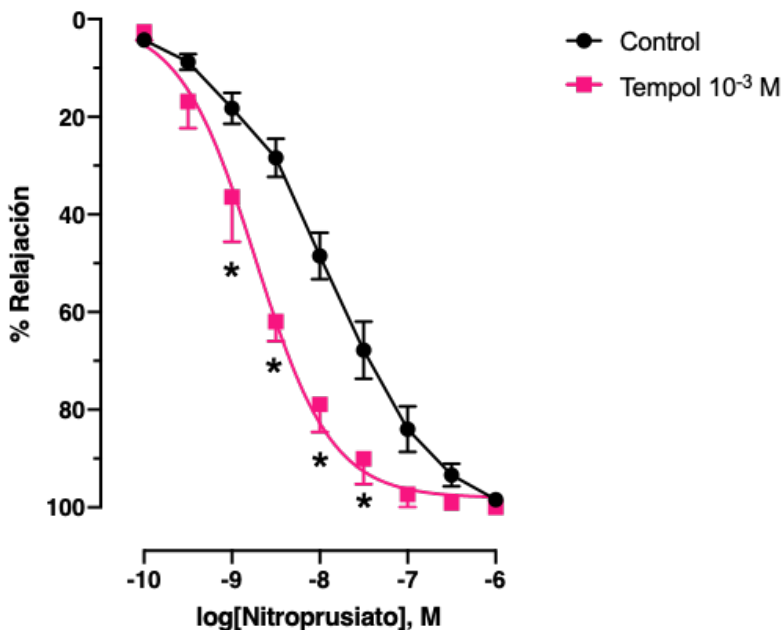
\* $p < 0,05$  comparado con el control.

### 1.1. Participación del anión superóxido en la respuesta al nitroprusiato sódico

El hecho de que las CeO<sub>2</sub>NPs puedan aumentar la respuesta vasodilatadora al nitroprusiato sódico podría estar relacionado con un aumento de la biodisponibilidad del NO por disminución del estrés oxidativo.

Para estudiar si el estrés oxidativo es capaz de disminuir la relajación dependiente de NO, se realizaron curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico ( $10^{-10}$  -  $10^{-6}$  M) en presencia de tempol ( $10^{-3}$  M). Los resultados mostraron un aumento de la respuesta vasodilatadora en presencia de tempol, indicando que el  $\cdot O_2^-$  reacciona con el NO disminuyendo su biodisponibilidad (Figura 8 y tabla 3).

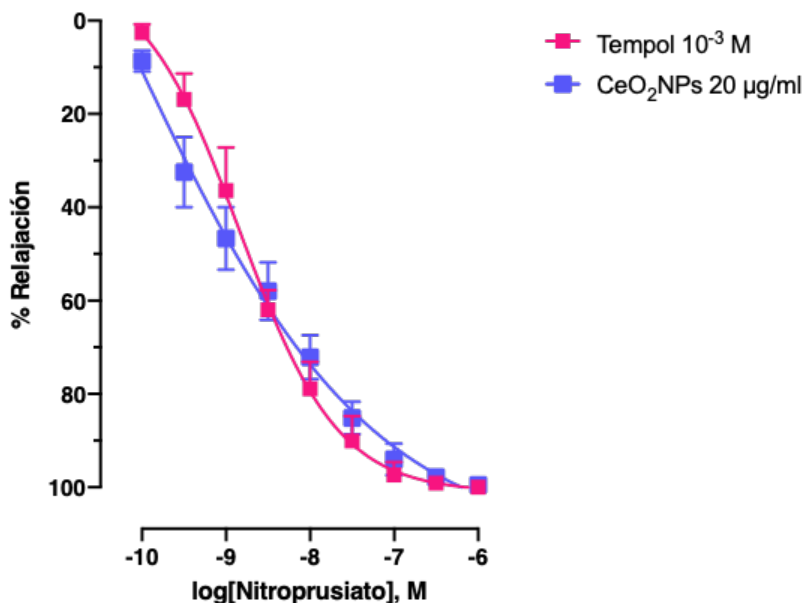




**Figura 8.** Curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico ( $10^{-10}$  -  $10^{-6}$  M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia tempol ( $10^{-3}$  M). Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar. \* $p < 0,05$  comparado con el control.

Si además, solapamos las curvas de nitroprusiato sódico en presencia de  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  y tempol, se observa que tienen la misma respuesta (Figura 9 y tabla 3).

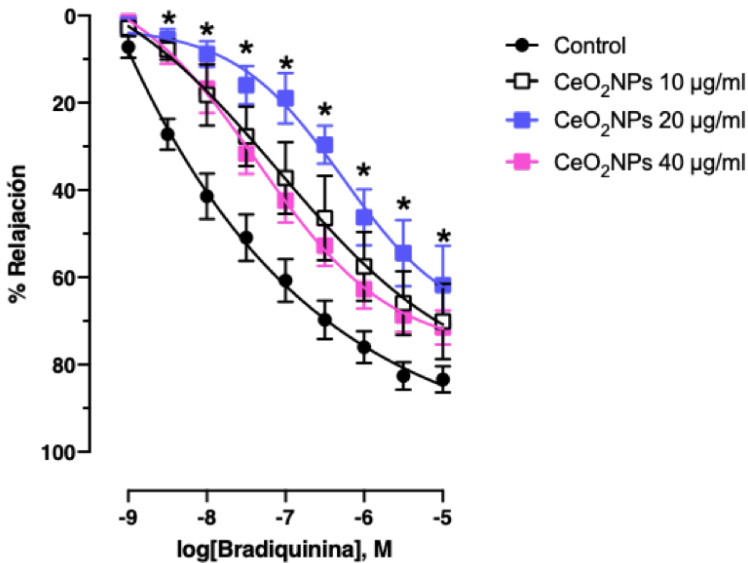
## Resultados



**Figura 9.** Curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico ( $10^{-10}$  -  $10^{-6}$  M) en segmentos de vena safena en presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml) y tempol ( $10^{-3}$  M). Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar.

## 2. Efecto de las nanopartículas de óxido de cerio sobre la respuesta a la bradiquinina.

Para estudiar el efecto de las CeO<sub>2</sub>NPs sobre la relajación dependiente de endotelio, se realizaron curvas concentración-respuesta a la bradiquinina ( $10^{-9}$  -  $10^{-5}$  M) en ausencia (control) y en presencia de diferentes concentraciones de CeO<sub>2</sub>NPs (10, 20 y 40 µg/ml). Los resultados mostraron que las CeO<sub>2</sub>NPs inducen un desplazamiento de la curva de bradiquinina a la derecha que es significativo a todas las concentraciones ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, en términos de E<sub>max</sub>, éste sólo resultó significativo a 20 µg/ml (Figura 10 y tabla 4).



**Figura 10.** Curvas concentración-respuesta a la bradiquinina ( $10^{-9}$  -  $10^{-5}$  M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  (10, 20 y 40  $\mu\text{g/ml}$ ). Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar. \* $p < 0,05$  comparado con el control.

**Tabla 4.** Valores de  $\text{pD}_2 \pm$  error estándar (e.e.) y del  $\text{Emax} \pm$  error estándar (e.e.), en respuesta a la bradiquinina en segmentos de vena safena en las diferentes condiciones experimentales.

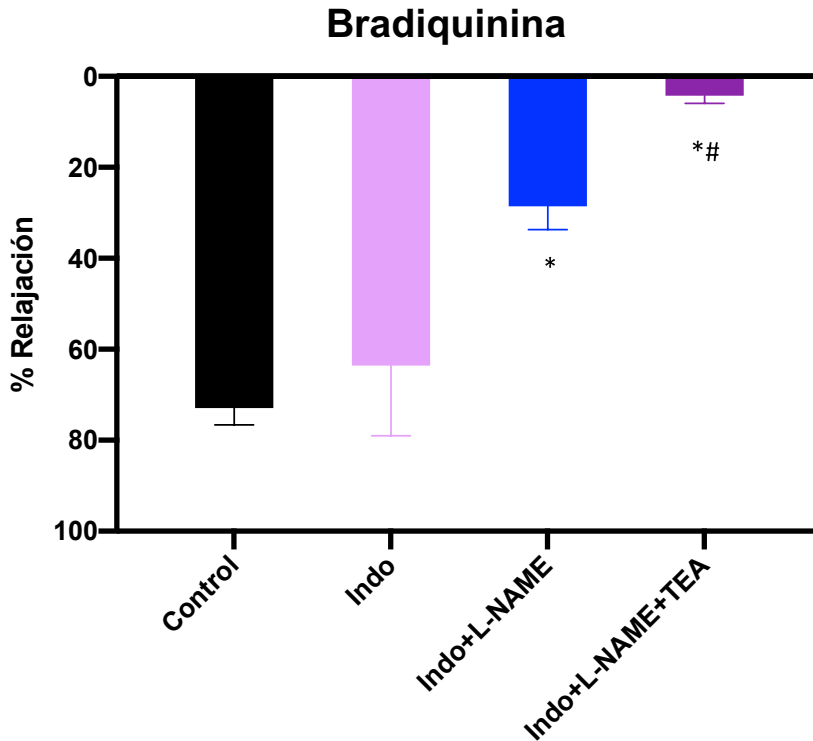
Bradiquinina	n	$\text{pD}_2 \pm$ e.e	$\text{Emax} \pm$ e.e
Control	9	$7,7 \pm 0,1$	$83,7 \pm 2,6$
$\text{CeO}_2\text{NPs}$ 10 $\mu\text{g/ml}$	6	$7,0 \pm 0,2^*$	$70,1 \pm 8,5$
$\text{CeO}_2\text{NPs}$ 20 $\mu\text{g/ml}$	8	$6,4 \pm 0,1^*$	$61,8 \pm 8,9^*$
$\text{CeO}_2\text{NPs}$ 40 $\mu\text{g/ml}$	6	$7,3 \pm 0,1^*$	$71,5 \pm 3,8$
Tempol $10^{-3}$ M	9	$7,5 \pm 0,1$	$83,2 \pm 2,1$

$n$  = número de pacientes.

\* $p < 0,05$  comparado con el control.

## **2.1. Mecanismos implicados en respuesta a la bradiquinina en la vena safena humana**

Con el fin de analizar los mecanismos por los que relaja la bradiquinina en la vena safena humana, se estudió la respuesta a la bradiquinina ( $10^{-6}$  M) en presencia de diferentes inhibidores relacionados con la síntesis de factores relajantes derivados del endotelio. El bloqueo con indometacina ( $10^{-5}$  M), que se utilizó para estudiar la participación de prostanooides, no disminuyó significativamente la relajación inducida por bradiquinina, como se observa en la figura 11, indicando que la bradiquinina no media su efecto vasodilatador por liberar prostanooides. Al incubarse con L-NAME ( $10^{-4}$  M), un inhibidor de la NOS, se observó una disminución significativa del efecto relajante, lo que demuestra que la bradiquinina relaja por liberar NO. Por último, para bloquear la relajación resistente a la combinación de indometacina ( $10^{-5}$  M) y L-NAME ( $10^{-4}$  M), se incubó con TEA ( $10^{-3}$  M), un bloqueante de los canales Kca. Éste produjo un bloqueo significativo de la relajación remanente.

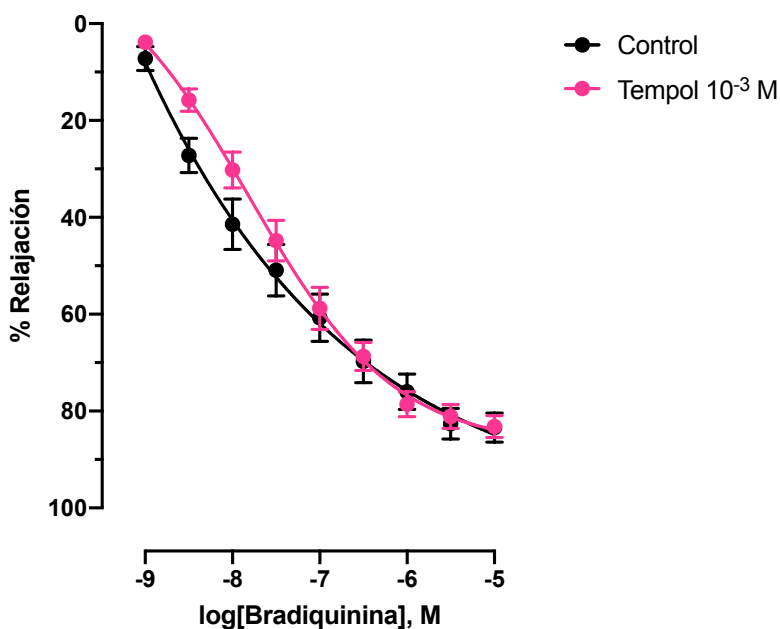


**Figura 11.** Respuesta a la bradiquinina ( $10^{-6}$  M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y presencia de indometacina ( $10^{-5}$  M), L-NAME ( $10^{-4}$  M) y TEA ( $10^{-3}$  M). Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar. \* $p < 0,05$  con respecto al control. # $p < 0,05$  con respecto a indometacina + L-NAME.  $n=9$  para cada condición.

En base a estos resultados, podemos concluir que la bradiquinina media su efecto vasodilatador en la vena safena humana por activar la eNOS y los canales Kca, relacionados con el mecanismo denominado EDH.

## 2.2. Participación del anión superóxido en la respuesta a la braquinina

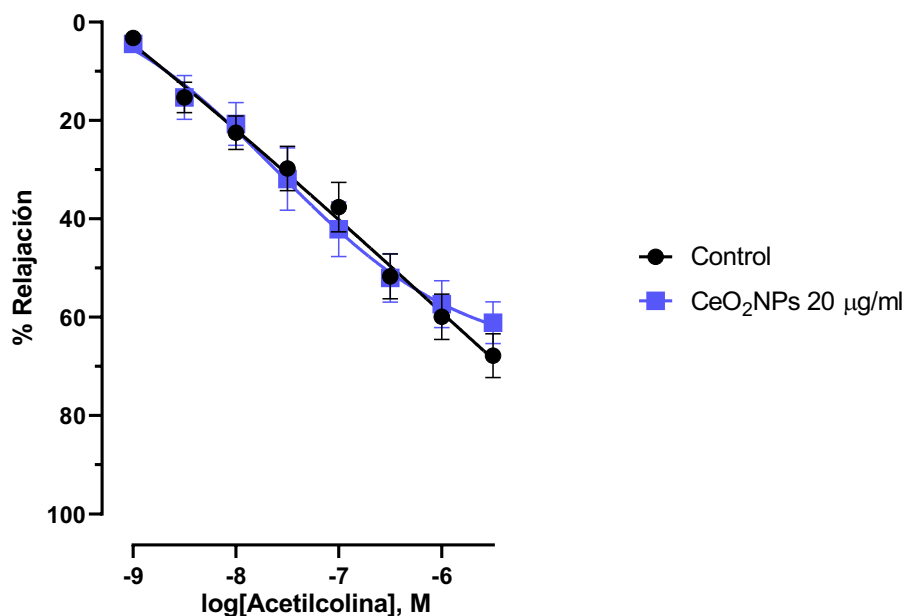
Para estudiar si el  $\cdot\text{O}_2^-$  fuera el factor liberado por el endotelio en respuesta a la braquinina, se realizaron curvas concentración-respuesta a la braquinina ( $10^{-9}$  -  $10^{-5}$  M) en presencia de tempol ( $10^{-3}$  M). Los resultados mostraron que el tempol no modificaba la respuesta relajante a la braquinina (Figura 12 y tabla 4).



**Figura 12.** Curvas concentración-respuesta a la braquinina ( $10^{-9}$  -  $10^{-5}$  M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia tempol ( $10^{-3}$  M). Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar.

### 3. Efecto de las nanopartículas de óxido de cerio sobre la respuesta a la acetilcolina

Para estudiar la integridad de endotelio, se realizaron curvas concentración-respuesta a la acetilcolina ( $10^{-9}$  -  $10^{-6}$  M) en ausencia (control) y en presencia de  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  ( $20 \mu\text{g/ml}$ ). Los resultados mostraron que las  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  no modificaban la respuesta relajante a la acetilcolina (Figura 13 y tabla 5), por lo que podemos concluir que las  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  no producen disfunción endotelial.



**Figura 13.** Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina ( $10^{-9}$  -  $10^{-6}$  M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y presencia de  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  ( $20 \mu\text{g/ml}$ ). Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar.

## Resultados

**Tabla 5.** Valores de  $pD_2 \pm$  error estándar (e.e.) y del  $E_{max} \pm$  error estándar (e.e.), en respuesta a la acetilcolina en segmentos de vena safena en ausencia (control) y presencia de  $CeO_2NPs$  (20  $\mu g/ml$ ).

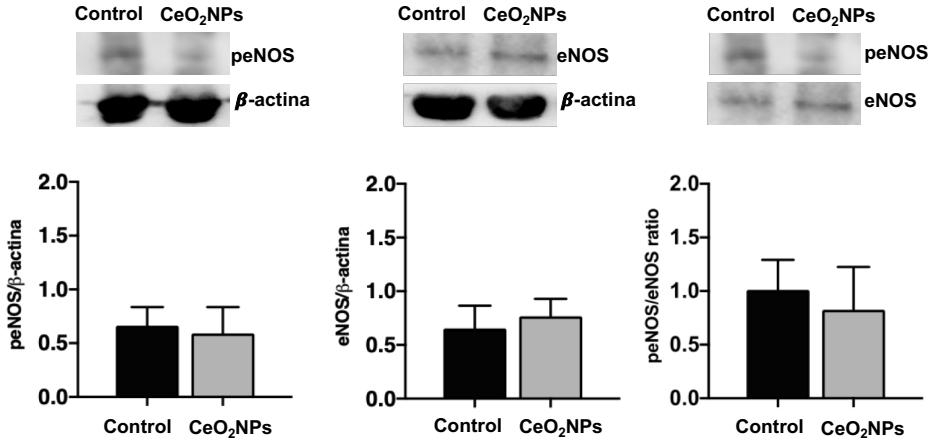
Acetilcolina	n	$pD_2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$
Control	5	$7,1 \pm 0,3$	$69,3 \pm 5,7$
$CeO_2NPs$ 20 $\mu g/ml$	5	$6,5 \pm 0,4$	$61,1 \pm 8,6$

$n$  = número de pacientes.

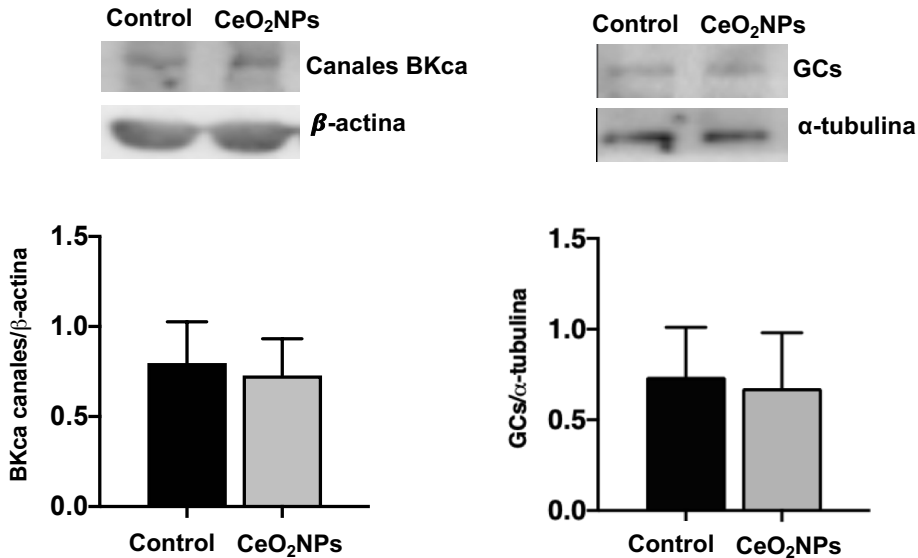
#### **4. Efecto de las nanopartículas de óxido de cerio sobre la expresión proteica de las enzimas relacionadas con la vasodilatación**

Con el fin de analizar el efecto de las  $CeO_2NPs$  sobre las diferentes enzimas relacionadas con la vasodilatación, se cuantificó la expresión proteica de eNOS, peNOS, canales BKca y GCs en ausencia (control) y en presencia de  $CeO_2NPs$  (20  $\mu g/ml$ ). Se observó que las  $CeO_2NPs$  no modificaron la expresión de dichas enzimas, indicando que la menor relajación a la bradiquinina observada en presencia de  $CeO_2NPs$  (20  $\mu g/ml$ ) no era debida a una menor expresión de la eNOS, la peNOS (Figura 14) o los canales BKca (Figura 15). Tampoco parece probable que la respuesta aumentada al nitroprusiato sódico en presencia de  $CeO_2NPs$  (20  $\mu g/ml$ ) fuera debida a una mayor expresión de la GCs (Figura 15).





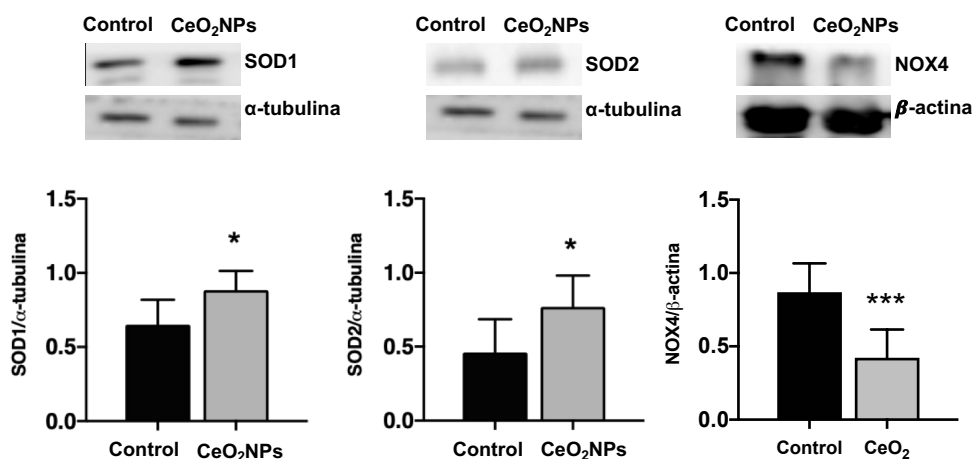
**Figura 14.** Cuantificación de la expresión proteica de las enzimas eNOS y peNOS en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml). Las barras representan la media ± desviación estándar.  $n=12-14$  pacientes para cada condición.



**Figura 15.** Cuantificación de la expresión proteica de los canales BKca y de la enzima GCs en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml). Las barras representan la media ± desviación estándar.  $n=9-10$  pacientes para cada condición.

## 5. Efecto de las nanopartículas de óxido de cerio sobre la expresión proteica de los principales sistemas prooxidantes y antioxidantes

Con el fin de analizar el efecto de las CeO<sub>2</sub>NPs sobre las principales enzimas relacionadas con el estrés oxidativo vascular, se cuantificó la expresión proteica de la SOD1 y SOD2, enzimas antioxidantes, y de la NOX4, enzima prooxidante y principal isoforma de la NOX a nivel vascular, en ausencia (control) y en presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml) (Figura 16).



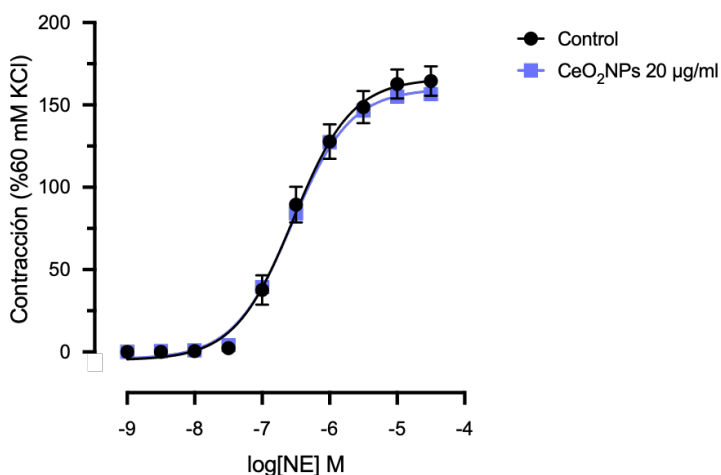
**Figura 16.** Cuantificación de la expresión proteica de las enzimas SOD1, SOD2 y NOX4 en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml). Las barras representan la media ± desviación estándar. \* $p < 0,05$  con respecto al control. \*\*\* $p < 0,0005$  con respecto al control.  $n=9-10$  pacientes para cada condición.

En las muestras incubadas con CeO<sub>2</sub>NPs, se observó un aumento de la expresión de SOD1 y SOD2 y una menor expresión de NOX4 de forma significativa. En base a estos resultados, podemos concluir que las CeO<sub>2</sub>NPs son capaces de disminuir el estrés oxidativo vascular.

## 6. Efecto de las nanopartículas de óxido de cerio sobre la contracción inducida por diferentes agonistas contráctiles

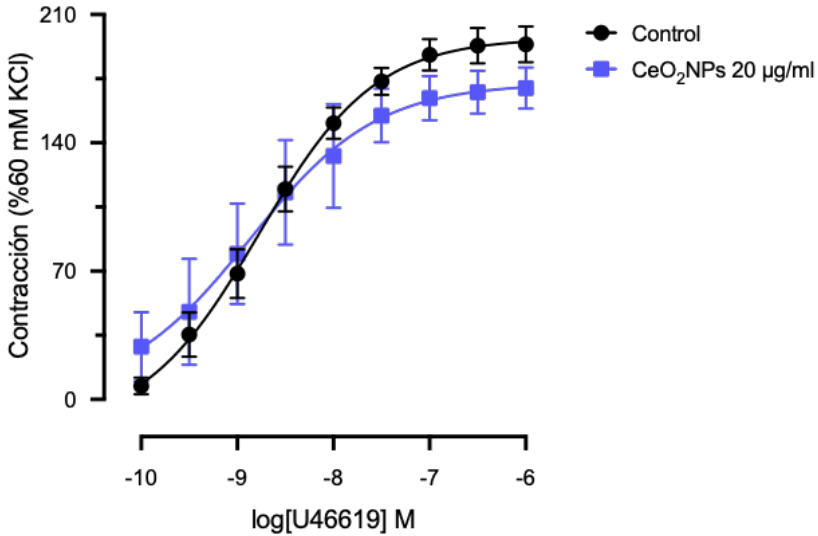
Con el fin de conocer si las CeO<sub>2</sub>NPs podían modular la respuesta de diferentes agonistas contráctiles, se realizaron curvas concentración-respuesta a NE (10<sup>-9</sup> - 10<sup>-4</sup> M), U46619 (10<sup>-10</sup> - 10<sup>-6</sup> M), ET-1 (10<sup>-11</sup> - 10<sup>-6</sup> M) y Ang II (10<sup>-11</sup> - 3x10<sup>-7</sup> M), en ausencia (control) y presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml).

Las CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml) no modificaron la respuesta contráctil a la NE (Figura 17), el U46619 (Figura 18) y la ET-1 (Figura 19), pero sí disminuyeron significativamente la respuesta a la Ang II (Figura 20). En la Tabla 6 se recogen los valores de pD<sub>2</sub> y Emax en respuesta a los diferentes agonistas contráctiles en segmentos de vena safena en las diferentes condiciones experimentales.

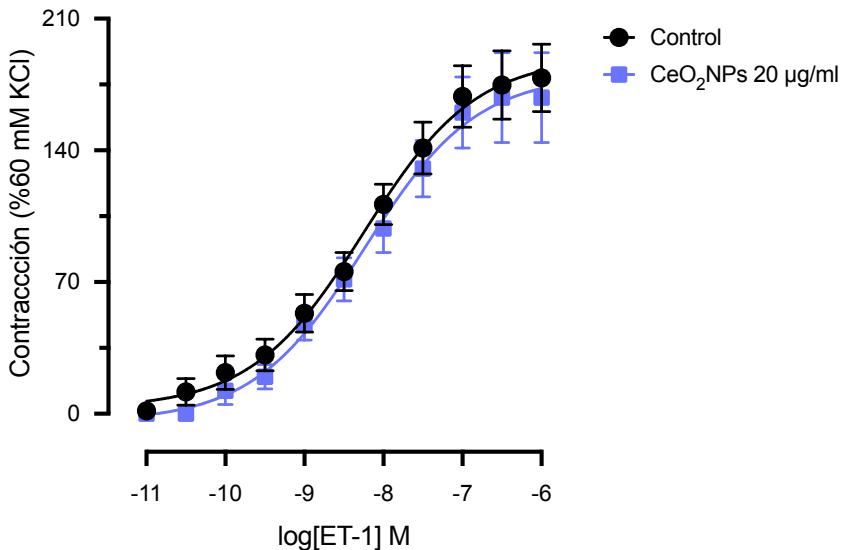


**Figura 17.** Curvas concentración-respuesta a la NE (10<sup>-9</sup> - 10<sup>-4</sup> M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml). Cada punto representa la media ± error estándar. n=7-14 pacientes para cada condición

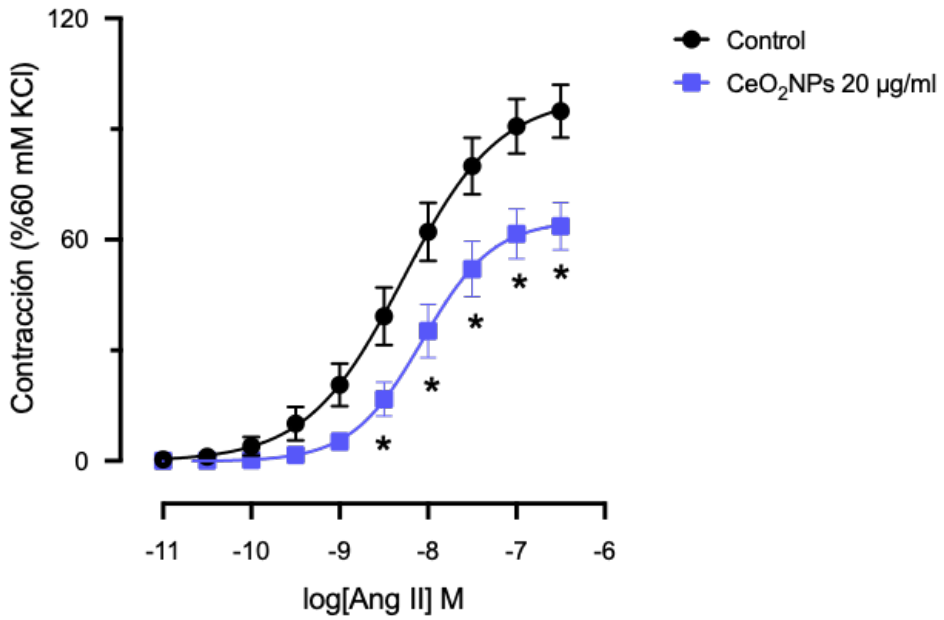
## Resultados



**Figura 18.** Curvas concentración-respuesta al U46619 ( $10^{-10}$  -  $10^{-6}$  M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml). Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar.  $n=6-18$  pacientes para cada condición.



**Figura 19.** Curvas concentración-respuesta a la ET-1 ( $10^{-11}$  -  $10^{-6}$  M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml). Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar.  $n=7-14$  pacientes para cada condición.



**Figura 20.** Curvas concentración-respuesta a la Ang II ( $10^{-11}$  -  $3 \times 10^{-7}$  M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml). Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar. \* $p < 0,05$  con respecto al control.  $n = 10-18$  pacientes para cada condición.

## Resultados

**Tabla 6.** Valores de  $pD_2 \pm$  error estándar (e.e.) y del  $E_{max} \pm$  error estándar (e.e.), en respuesta a los diferentes agonistas contráctiles, en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de  $CeO_2NPs$  (20  $\mu g/ml$ ).

<b>Control</b>	<b>n</b>	<b><math>pD_2 \pm e.e</math></b>	<b><math>E_{max} \pm e.e</math></b>
Norepinefrina	14	$6,5 \pm 0,1$	$163,1 \pm 5,6$
U46619	10	$8,8 \pm 0,2$	$193,7 \pm 9,6$
Endotelina-1	10	$8,2 \pm 0,2$	$178,5 \pm 17,9$
Angiotensina II	20	$8,3 \pm 0,1$	$94,8 \pm 7,2$
<b><math>CeO_2NPs</math> 20 <math>\mu g/ml</math></b>	<b>n</b>	<b><math>pD_2 \pm e.e</math></b>	<b><math>E_{max} \pm e.e</math></b>
Norepinefrina	7	$6,6 \pm 0,1$	$156,5 \pm 4,6$
U46619	6	$8,9 \pm 0,6$	$169,8 \pm 7,1$
Endotelina-1	7	$8,2 \pm 0,2$	$168,0 \pm 23,9$
Angiotensina II	10	$8,1 \pm 0,1$	$63,6 \pm 6,4^*$

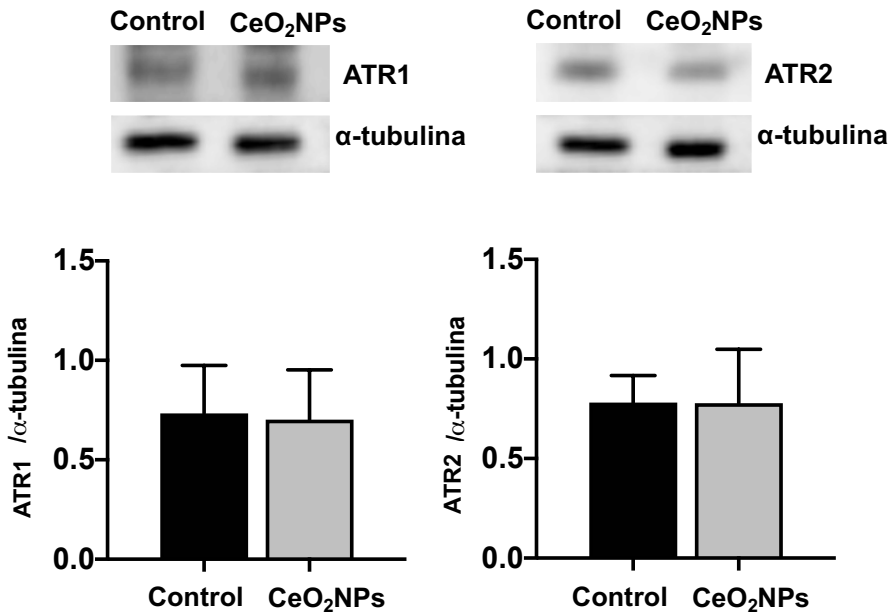
$n$  = número de pacientes.

\* $p < 0,05$  comparado con el control.

### **6.1. Niveles proteicos de los receptores ATR1 y ATR2 en respuesta a las nanopartículas de óxido de cerio**

Con el fin de estudiar si la menor respuesta a la Ang II en presencia de las  $CeO_2NPs$  era debida a una menor expresión de los receptores de la Ang II, se midieron los niveles proteicos de los mismos en ausencia (control) y presencia de  $CeO_2NPs$  (20  $\mu g/ml$ ). Como nuestros resultados indican, la expresión de ambos receptores de la Ang II (ATR1 y ATR2) no se vio alterada en presencia de las  $CeO_2NPs$  (Figura 21), por lo que no parece

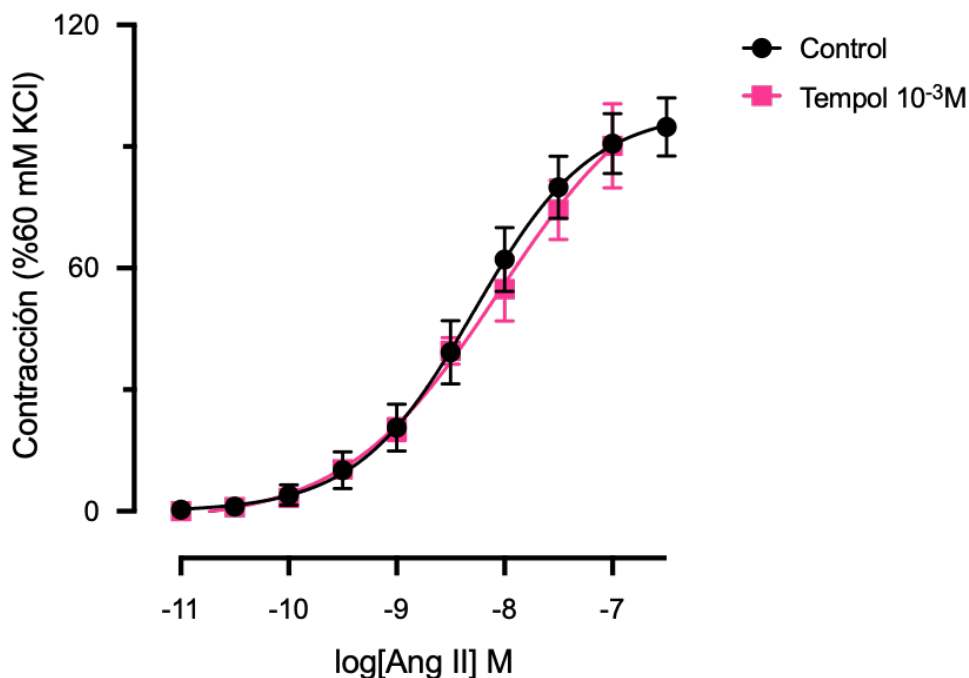
probable que éste sea el mecanismo por el cual las CeO<sub>2</sub>NPs reducen el efecto contráctil a la Ang II.



**Figura 21.** Cuantificación de la expresión proteica de los receptores de la Ang II (ATR1 y ATR2) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (20  $\mu$ g/ml). Las barras representan la media  $\pm$  desviación estándar.  $n=8-13$  pacientes para cada condición.

## 6.2. Participación del anión superóxido en la respuesta a la angiotensina II

Con el fin de evaluar si el  $\cdot O_2^-$  fuera liberado en respuesta a la Ang II, y éste fuera modulado por las CeO<sub>2</sub>NPs, se realizaron curvas concentración-respuesta a la Ang II ( $10^{-11}$  -  $3 \times 10^{-7}$  M), en presencia de tempol ( $10^{-3}$  M). Los resultados mostraron que el tempol no modificaba la respuesta contráctil a la Ang II (Figura 22), por lo que tampoco parece probable que éste sea el mecanismo por el cual las CeO<sub>2</sub>NPs reducen el efecto contráctil a la Ang II.

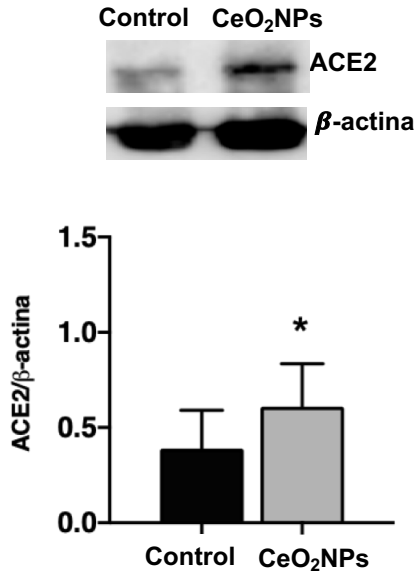


**Figura 22.** Curvas concentración-respuesta a la Ang II ( $10^{-11}$  -  $3 \times 10^{-7}$  M) en segmentos de vena safena en ausencia (control) y presencia de tempol ( $10^{-3}$  M). Cada punto representa la media  $\pm$  error estándar.  $n=9-18$  pacientes para cada condición.

### 6.3. Efecto de las nanopartículas de óxido de cerio sobre la expresión proteica de la ACE2

Puesto que la Ang II es degradada por la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ACE2), decidimos medir los niveles proteicos de ésta en ausencia (control) y en presencia de  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  ( $20 \mu\text{g/ml}$ ). Nuestros resultados mostraron que las  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  aumentaban los niveles de ACE2 (Figura 23), pudiendo ser ésta la causa de la menor respuesta contráctil a la Ang II en presencia de las  $\text{CeO}_2\text{NPs}$ .





**Figura 23.** Cuantificación de la expresión proteica de la ACE2 en segmentos de vena safena en ausencia (control) y en presencia de CeO<sub>2</sub>NPs (20 µg/ml). Las barras representan la media ± desviación estándar. \* $p < 0,05$  comparado con el control.  $n = 10$  pacientes para cada condición.



## **DISCUSIÓN**



## 1. Ventajas y limitaciones del estudio

En primer lugar, debemos hacer hincapié en que el presente trabajo trata de investigación básica, siendo el objetivo de esta tesis aumentar los conocimientos fisiológicos sobre los mecanismos de reactividad vascular, en concreto de los efectos de las CeO<sub>2</sub>NPs sobre la vena safena interna humana. El mayor entendimiento de estos mecanismos en vasos utilizados en la cirugía de *bypass* coronario, puede contribuir al desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas. No obstante, la extrapolación de los resultados a la práctica clínica debe ser tomada con cautela precisando de la realización de más estudios para su potencial aplicabilidad clínica en el futuro.

En segundo lugar, hemos de tener en cuenta que esta tesis analiza los efectos de las CeO<sub>2</sub>NPs sobre la reactividad vascular *in vitro*. Los sistemas de baño de órganos han sido ampliamente utilizados en estudios preclínicos para evaluar la relación concentración-respuesta en el tejido contráctil. En la investigación cardiovascular se usan para medir la tensión isométrica de vasos aislados en respuesta a diferentes estímulos. Estos estudios presentan la ventaja de obtener resultados en tiempo real, lo que nos permite sacar conclusiones rápidas y poder planificar los siguientes experimentos, así como resolver problemas durante los mismos y estudiar de forma paralela varios segmentos vasculares. Sin embargo, durante el estudio *in vitro* del vaso aislado quedan excluidos los factores hormonales o nerviosos que afectan a la pared vascular y regulan el flujo sanguíneo, lo que constituye una limitación del estudio. Al mismo tiempo, el poder aislar el vaso y realizar los experimentos en estas condiciones nos permite dilucidar mecanismos de acción intrínsecos de la propia pared vascular, es decir “sin interferencias” de la regulación endocrina o nerviosa. Además, el estudio *in*

## Discusión

*vitro* nos permite realizar los experimentos sin producir ningún perjuicio para el paciente ni alterar su tratamiento.

La realización de un estudio con muestras humanas presenta ventajas obvias con respecto al uso de muestras de procedencia animal, pero los inconvenientes de la variabilidad de respuesta entre pacientes, por motivos constitutivos, diferente comorbilidad y tratamiento farmacológico entre otros. Además, en la arteriosclerosis se produce una disfunción endotelial en gran parte mediada por estrés oxidativo cuyo resultado es el aumento de la resistencia y la disminución de la respuesta vasodilatadora (143). Nuestros resultados proceden de pacientes con patología cardiovascular y por tanto pueden presentar alteraciones en la reactividad vascular.

Según el lecho vascular, la reactividad vascular a diferentes estímulos puede diferir (67, 68), por lo que debemos ser cautos al extrapolar los datos. En nuestro trabajo hemos utilizado la vena safena interna por ser el injerto más empleado en la última década en los pacientes sometidos a cirugía de *bypass* coronario en el Hospital Clínico Universitario de Valencia, de donde proceden las muestras. Además, su fácil extracción y longitud hace que sea frecuente que exista un excedente al finalizar el procedimiento quirúrgico que pueda ser utilizado para estudio. No ocurre lo mismo con otros injertos utilizados para revascularización coronaria, con longitudes más limitadas o que precisan aplicación tópica de sustancias vasodilatadoras, lo que los inutiliza para estudios de reactividad vascular.

## 2. Efecto de las nanopartículas de óxido de cerio sobre la vasodilatación

Las CeO<sub>2</sub>NPs son un importante nanomaterial de uso médico debido a su potencial actividad antioxidante (112). Además, su alta biocompatibilidad y gran superficie las convierte en agentes terapéuticos ideales que pueden penetrar la membrana celular y ser usadas como transportadores de fármacos (144). A pesar de su creciente importancia farmacéutica, sus efectos en el sistema cardiovascular permanecen inexplorados. Por otra parte, la causa más frecuente de oclusión a largo plazo de los injertos de vena safena interna es el desarrollo de arteriosclerosis (12), por lo que la presente tesis pretende generar conocimiento en este campo para su posible aplicabilidad futura. El estrés oxidativo acelera la disfunción endotelial en la arteriosclerosis llevando a la alteración de la homeostasis vascular (143). Nuestra hipótesis es que las CeO<sub>2</sub>NPs podrían tener propiedades antioxidantes a nivel vascular, especialmente por actuar como miméticas de la SOD y disminuir los niveles de  $\cdot\text{O}_2^-$ . Esto aumentaría la biodisponibilidad de NO y revertiría la disfunción endotelial ocasionada por el aumento de estrés oxidativo asociado con enfermedades cardiovasculares.

Diversos estudios han demostrado el efecto antioxidante de las CeO<sub>2</sub>NPs (112, 122, 123), evidenciando que presentan actividad mimética con algunas de las enzimas antioxidantes más importantes a nivel vascular como son la SOD (124) o la catalasa (126) y que su efecto depende de su estado de oxidación (128).

Como cabría esperar por su potencial actividad antioxidante, las CeO<sub>2</sub>NPs aumentan la sensibilidad al nitroprusiato sódico en la vena safena humana. El nitroprusiato sódico es un dador de NO que activa la vía de la GCs

## Discusión

aumentando los niveles de GMPc, el cual disminuye la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular produciendo así vasodilatación. Por ello, medimos la expresión de la GCs en ausencia y presencia de  $\text{CeO}_2\text{NPs}$ . No se encontraron diferencias significativas, por lo que podemos concluir que el aumento de la respuesta vasodilatadora al nitroprusiato sódico no es secundaria a una mayor expresión de la GCs. Sin embargo, las  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  sí aumentan la expresión proteica de ambas isoformas de la SOD. De manera que nuestra hipótesis es que el mecanismo por el que las  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  aumentan el efecto vasodilatador del dador exógeno de NO es por el aumento de la expresión proteica de la SOD en sus dos isoformas, que disminuiría los niveles de  $\cdot\text{O}_2^-$  y, por tanto, aumentaría la biodisponibilidad del NO administrado de forma exógena. Para confirmar esta hipótesis se incubaron las muestras con tempol, mimético de la SOD utilizado en otros estudios de reactividad vascular (145), observando que se produce un aumento de la respuesta vasodilatadora al nitroprusiato sódico y además, que la curva concentración-respuesta obtenida se superpone a la que se obtiene al incubar con  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  (20  $\mu\text{g/ml}$ ), lo que nos permite concluir que este mecanismo antioxidante es, probablemente, la causa de que las  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  aumenten la respuesta vasodilatadora al nitroprusiato sódico.

En concordancia con lo anteriormente expuesto, cabría esperar que las  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  aumentasen la respuesta vasodilatadora a la bradiquinina (vasodilatación dependiente del endotelio) por aumento de la biodisponibilidad del NO. Sin embargo, en la vena safena humana hemos observado que las  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  disminuyen la respuesta vasodilatadora a la bradiquinina dependiente de la concentración, siendo máxima a 20  $\mu\text{g/ml}$ .

Nos preguntamos por qué mecanismos se estaba produciendo esta disminución de la respuesta vasodilatadora a la bradiquinina. Para ello



estudiamos la respuesta a la bradiquinina ( $10^{-6}$  M) en presencia de diferentes inhibidores de los factores relajantes derivados del endotelio. Así, pudimos observar que el bloqueo con indometacina (bloqueante de los prostanoïdes) no disminuyó la relajación inducida por bradiquinina. Sin embargo, al incubarse con L-NAME (inhibidor de la eNOS), y con TEA (bloqueante de los canales Kca) se observó una disminución significativa de la relajación inducida por bradiquinina. Estos resultados indicaban que la bradiquinina mediaba su efecto vasodilatador por activar la eNOS y los canales Kca, estos últimos relacionados con el mecanismo denominado EDH. Estos datos concuerdan con estudios realizados por Liu et al. (68) quienes observaron que la relajación dependiente del endotelio en vena safena humana era fundamentalmente consecuencia del NO y del EDHF. También obtuvieron similares resultados Akar et al. (67)

Así pues, debíamos buscar si las CeO<sub>2</sub>NPs afectaban a alguno de estos dos mecanismos y por ello disminuían la respuesta a la bradiquinina. Con esta finalidad analizamos la expresión proteica de la eNOS, peNOS (Ser1177), GCs y los canales BKca en ausencia y presencia de las CeO<sub>2</sub>NPs. En cuanto a la expresión proteica de la eNOS, las CeO<sub>2</sub>NPs no la modificaron. Sin embargo, esto no indicaba si realmente se estaba produciendo menos NO, ya que la fosforilación en determinados aminoácidos de la proteína puede modificar su actividad. En concreto, la fosforilación de la serina en posición 1177 aumenta la actividad de la eNOS (146). Algunas nanopartículas han mostrado capacidad para fosforilar proteínas, por ejemplo, las nanopartículas de plata producen fosforilación de histona 3 de la serina en posición 10 (147). Además, las CeO<sub>2</sub>NPs han demostrado tener capacidad de interacción con ésteres fosfato de diversas biomoléculas como el ATP, p-nitrofenilfosfato (pNPP) o o-fosfo-l-tirosina (148). Por ello nos preguntamos si las CeO<sub>2</sub>NPs podían afectar a la fosforilación de la eNOS (Ser1177) aumentando así su actividad. Para ello se analizó la expresión

## Discusión

proteica de peNOS (Ser1177) en ausencia y presencia de CeO<sub>2</sub>NPs. De nuevo, no se observaron diferencias significativas en la expresión proteica de la peNOS en presencia y ausencia de las CeO<sub>2</sub>NPs. Así pues, podemos concluir que las CeO<sub>2</sub>NPs no disminuyen la respuesta vasodilatadora a la bradiquinina en la vena safena humana por disminuir la expresión de la eNOS o por afectar a su activación a través de la fosforilación.

Así pues, no encontramos una explicación basada en la producción de NO por la célula endotelial. El NO media su efecto vasodilatador por activar la GCs en la célula muscular lisa. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas expresión de la GCs en ausencia y presencia de CeO<sub>2</sub>NPs. En conjunto estos resultados indican que las CeO<sub>2</sub>NPs no afectan a la producción de NO por parte del endotelio ni a la expresión de la GCs.

Además, la apertura de los canales Kca produce una hiperpolarización de la célula muscular lisa y este mecanismo también participa en la relajación inducida por bradiquinina en la vena safena humana. Algunas nanopartículas han mostrado interacción con canales iónicos *in vitro*. En un estudio realizado por Soloviev et al. (149) se observó que nanopartículas de oro disminuían la amplitud de la contractilidad inducida por NE en células musculares lisas de aorta de rata por activación de los canales BKca. Por otro lado, Melnyk et al. (150) demostraron que el fullereno C60 inhibe los canales BKca en células musculares lisas de arteria pulmonar. Además, nuestro grupo de investigación ha demostrado que en la vena safena humana los canales BKca están activos, disminuyendo la respuesta adrenérgica (151). Sin embargo, como muestran los resultados de la presente tesis, las CeO<sub>2</sub>NPs no modifican la expresión proteica de dichos canales, con lo que podemos concluir que la menor relajación a la

bradiquinina observada en presencia de CeO<sub>2</sub>NPs no es debida a una menor expresión de los canales BKca.

A la bradiquinina se le ha adjudicado un papel protector a nivel endotelial por producir vasodilatación mediada por NO, ejercer un efecto antiinflamatorio, disminuir las ROS y por sus efectos antifibrinolíticos y antitrombóticos (69, 70). Por tanto, no podemos pasar por alto que el hecho de que las CeO<sub>2</sub>NPs disminuyan su efecto a nivel vascular, podría ser indicativo de disfunción endotelial. Sin embargo, el hecho de no alterar la respuesta a la acetilcolina, ni tampoco la vía de la eNOS-GCs apunta hacia un efecto selectivo de las CeO<sub>2</sub>NPs sobre la bradiquinina y no sobre la función endotelial.

La EDH es un mecanismo que se relaciona con los canales Kca, y que puede implicar o no un factor derivado del endotelio (51). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se ha postulado como ese factor en diversos lechos vasculares (42, 47, 95, 96). La principal fuente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a nivel vascular parece ser la NOX4, que produce tanto  $\cdot\text{O}_2^-$  como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De hecho, algunos autores afirman que produce más H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que  $\cdot\text{O}_2^-$  (93, 94), confiriéndole un papel protector a nivel cardiovascular. Nuestros resultados mostraron que la incubación con CeO<sub>2</sub>NPs disminuye la expresión de NOX4, por lo tanto, podría estar disminuida la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Si el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fuera el factor liberado por el endotelio en respuesta a la bradiquinina que activase los canales BKca, podría explicar, al menos en parte, la disminución del efecto relajante a la bradiquinina en presencia de CeO<sub>2</sub>NPs. En este sentido, se ha visto que en arteria mamaria el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce relajación a través de la hiperpolarización de la membrana celular del músculo liso vascular por activación de los canales de K<sup>+</sup> (152).

## Discusión

Nuestros resultados en general, contrastan con los obtenidos por Minarchick et al. (141) quienes al estudiar los efectos de la exposición intravenosa y gástrica de las CeO<sub>2</sub>NPs sobre la función microvascular en arteriola mesentérica de rata, no sólo vieron que se producía disfunción endotelial y disminución de la biodisponibilidad de NO sino también una disminución de la vasodilatación independiente de endotelio por afectación de la vía GCs. Estas diferencias pueden ser atribuidas a la vía de administración utilizada, la concentración de las nanopartículas, el tiempo de exposición y el lecho vascular.

### **3. Efecto de las nanopartículas de óxido de cerio sobre la vasoconstricción**

Las CeO<sub>2</sub>NPs no modifican la contracción inducida por la NE, el U46619 (análogo del TXA<sub>2</sub>) ni la ET-1. Sin embargo, sí que se observa una disminución en la respuesta vasoconstrictora a la Ang II. Este efecto no se atribuye a la capacidad para modificar los receptores ATR1 y ATR2, ya que su expresión proteica no varía en presencia de las CeO<sub>2</sub>NPs. El efecto vasoconstrictor de la Ang II y su contribución a la disfunción endotelial se ha relacionado fuertemente con la producción de  $\cdot\text{O}_2^-$  (59, 60, 153). Las CeO<sub>2</sub>NPs presentan propiedades antioxidantes por aumentar la expresión de SOD1 y SOD2 como muestran nuestros resultados, por lo que la disminución en el efecto contráctil a este agonista en presencia de las nanopartículas, podría estar relacionado con su poder neutralizante del  $\cdot\text{O}_2^-$ . Sin embargo, en nuestros resultados la incubación con tempol no modificó la contracción a la Ang II. En consonancia con nuestros resultados, Schuijt et al. (145) observaron que la incubación con tempol no afecta a la respuesta vasoconstrictora a la Ang II en arterias coronarias humanas, por lo que

concluyen que la vasoconstricción por Ang II en este lecho vascular no está mediado por el  $\cdot\text{O}_2^-$ .

Por otra parte, la Ang II es degradada por la ACE2. Esta enzima fue descubierta en el año 2000 y se describió como el primer homólogo humano de la ACE, aunque presentan diferencias significativas. Se trata también de una proteína transmembrana, pero en este caso una carboxipeptidasa. Además, tiene diferentes sustratos. Mientras la ACE transforma la Ang I en Ang II, la ACE2 degrada la Ang I en Ang (1-9) (metabolito inactivo) y la Ang II en Ang (1-7) (154). En cuanto a su distribución, a pesar de que inicialmente se describió que su expresión génica se limitaba al corazón, riñones y testículos (154) actualmente se sabe que la ACE2 se expresa de manera abundante en las células epiteliales del alveolo pulmonar, en enterocitos del intestino delgado, así como en las células endoteliales de arterias y venas y en las células musculares lisas arteriales de todos los órganos (155). La ACE2 también está presente en el riñón y además se ha observado sobreexpresión en el endotelio capilar glomerular y peritubular en diversas patologías renales y en riñones trasplantados (156). Existen dos formas de ACE2: la ACE2 de longitud completa, que es una proteína transmembrana ampliamente presente en los órganos incluyendo el endotelio vascular, y la ACE2 soluble, presente en el plasma sanguíneo sin su anclaje de membrana (157).

En base a esto, decidimos medir los niveles proteicos de la ACE2, encontrando un aumento de su expresión en presencia de  $\text{CeO}_2\text{NPs}$ , lo que explicaría nuestros resultados en respuesta a la Ang II. El aumento de ACE2 en presencia de las  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  aumentaría la degradación de Ang II y por tanto disminuiría su efecto contráctil. Estos resultados nos hacen pensar que las  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  podrían constituir una nueva estrategia terapéutica en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión. En

## Discusión

este sentido, Crackower et al. (158) observaron una menor expresión de los niveles proteicos de ACE2 en los riñones de ratas hipertensas con respecto a controles normotensos. Además, como se ha explicado anteriormente, la degradación de la Ang II por la ACE2 forma Ang (1-7). La Ang (1-7) ha demostrado tener un efecto vasodilatador, antiproliferativo, antitrombótico y antiinflamatorio a través de la activación del receptor Mas (159, 160). El eje ACE2-Ang(1-7)-Mas constituye un brazo muy relevante del sistema renina-angiotensina-aldosterona puesto que contrarresta la acción de la ACE y de la Ang II (159, 161-164).

Además, según diversos estudios en animales, la ACE2 parece tener un papel cardioprotector (162). La ablación genética de ACE2 en ratones produjo disminución severa de la contractilidad cardiaca (158). El sistema renina-angiotensina y la Ang II son factores clave en el remodelado ventricular asociado a la insuficiencia cardiaca (165). En este sentido, la sobreexpresión de ACE2 por transferencia genética ha demostrado proteger el corazón del remodelado inducido por hipertensión en ratas espontáneamente hipertensas (166). Por otro lado, Hernández-Prada et al. (167) observaron que el uso de XNT, fármaco activador de la ACE2, disminuía la presión arterial en ratas espontáneamente hipertensas y, además, esta disminución en la tensión arterial se asociaba a mejoría de la función cardiaca y reversión de la fibrosis miocárdica, perivascular y renal asociada. Estudios en humanos también han demostrado la importancia de la ACE2 en el remodelado ventricular y la disfunción cardiaca sistólica y diastólica (168, 169). El remodelado ventricular produce un deterioro progresivo de la función cardiaca que deriva en insuficiencia cardiaca. Ohtsuki et al. (170) demostraron que existe una correlación entre la cantidad de expresión génica de la ACE2 y la gravedad del remodelado ventricular, lo que sugiere que la expresión de esta enzima podría activarse como

mecanismo compensatorio adaptativo contra el remodelado ventricular. En este sentido, se ha observado también un aumento de los niveles de ACE2 soluble en plasma de pacientes con insuficiencia cardiaca sistólica que se correlaciona con empeoramiento de la clase funcional (171) y es factor predictor independiente de efectos adversos (muerte, trasplante cardiaco y hospitalización por insuficiencia cardiaca) (172).

Además, como hemos explicado anteriormente, la ACE2 convierte la Ang I en Ang (1-9), aunque con menor eficiencia que la conversión de la Ang II en Ang (1-7). La Ang (1-9) también ha demostrado ser cardioprotectora, reduciendo la fibrosis cardiaca por hipertensión e infarto de miocardio en modelos animales, a través de los receptores ATR2 y por una vía independiente al eje ACE2-Ang(1-7)-Mas (173-177). Los activadores de la ACE2, así como los agonistas de los receptores Mas y ATR2, han sido objeto de investigación en los últimos años para el tratamiento de la hipertensión arterial (178). Así también, el grupo de Bindom observó que la regulación al alza de ACE2 producía una mejoría del control glucémico en ratas diabéticas (179). Además, Murça et al. (180) demostraron que la activación endógena de ACE2 mediante XNT en ratas diabéticas protegía frente a la disfunción cardiaca autonómica inducida por la diabetes. La ACE2 parece tener también un papel protector a nivel renal en el contexto de la diabetes mellitus (181, 182), de hecho se ha observado una disminución de la expresión proteica de ACE2 en riñones de ratas diabéticas (183). Así mismo, se ha descrito una alteración en la expresión del eje ACE2-Ang(1-7)-Mas en muchas patologías cardiovasculares como hipertensión, daño renal, insuficiencia cardíaca y remodelado ventricular (159). Por otro lado, Fraga-Silva et al. (184) demostraron que la activación de ACE2 mejoraba la función endotelial por disminución de la producción de ROS. Estos investigadores observaron una mejoría de la función endotelial tras tratamiento *in vivo* con XNT al evaluar la respuesta vasodilatadora a la

## Discusión

acetilcolina y al nitroprusiato sódico en ratas espontáneamente hipertensas y en ratas diabéticas inducidas por estreptomycin. *In vitro* observaron que el XNT producía vasodilatación dependiente de endotelio y que dicha respuesta vasodilatadora se atenuaba con un antagonista del receptor Mas y en ratones Mas *knockout*. Esos efectos estaban asociados con la producción de ROS. Además, observaron que la producción de ROS inducida por Ang II en anillos de aorta humana fue atenuada por XNT.

Por todo lo expuesto, el hecho de que las CeO<sub>2</sub>NPs aumenten la expresión proteica de la ACE2 podría abrir nuevas estrategias terapéuticas para enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial, la insuficiencia cardiaca o la diabetes mellitus.

## 4. Consideraciones finales

La ACE2 también degrada la des-Arg-bradiquinina, metabolito activo de la bradiquinina que activa los receptores B1R (154), poco expresados en tejidos sanos pero que cobran un papel importante en procesos inflamatorios (185, 186). La activación de los receptores B1R y B2R por la bradiquinina y su metabolito activo causa una permeabilidad vascular masiva y un aumento de los niveles de citoquinas inflamatorias implicadas en la tormenta de citoquinas observada en la infección por SARS-CoV-2 (187, 188). De hecho, en los dos últimos años ha cobrado mucha importancia el estudio de la ACE2 por ser el principal receptor para la entrada del SARS-CoV-2 (189). Cuando el virus se une a la ACE2, el complejo se internaliza en la célula, lo que produce una regulación a la baja de la ACE2. Esto aumenta los niveles de Ang II y disminuye los niveles de Ang (1-7) a la vez que aumenta los niveles de des-Arg-bradiquinina. A nivel



pulmonar, la Ang (1-7) tiene efecto antiinflamatorio a través de la activación de los receptores Mas presentes en el epitelio del músculo liso bronquial; por el contrario, la des-Arg-bradiquinina produce inflamación pulmonar. Por tanto, la disminución de la Ang (1-7) sumado al aumento de des-Arg-bradiquinina condicionan la respuesta inflamatoria a nivel pulmonar (190). El aumento de Ang II aumenta el eje Ang II/ATR1, que asociado al aumento de des-Arg-bradiquinina, activa la tormenta de citoquinas responsable del distrés respiratorio. Por todo ello, la ACE2 está siendo objeto de desarrollo de nuevas terapias contra la COVID-19. Por ejemplo, algunos investigadores están estudiando el tratamiento con ACE2 recombinante humano soluble para prevenir la entrada del SARS-CoV-2 (191). En este sentido, las CeO<sub>2</sub>NPs, al aumentar la expresión de la ACE2, podrían contrarrestar la regulación a la baja de la ACE2 y la consecuente tormenta de citoquinas e inflamación pulmonar responsable de las manifestaciones graves causantes de la mayor parte de las muertes por esta enfermedad, colocando por primera vez a las CeO<sub>2</sub>NPs como tratamiento prometedor coadyuvante para la COVID-19.

En cuanto al efecto antioxidante de las CeO<sub>2</sub>NPs, nuestros resultados muestran que estas nanopartículas disminuyen por un lado la expresión proteica de la NOX4, y por otro lado aumentan la expresión de la SOD1 y SOD2. La disminución de la NOX4 conlleva una menor síntesis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ambas ROS. Aunque si bien hemos dicho que la síntesis basal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría tener un efecto protector a nivel endotelial, niveles elevados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> son lesivos para el sistema vascular (94). Por otro lado, la disminución de los niveles de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> también es vasoprotectora puesto que el ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> provoca disfunción endotelial por disminución de la biodisponibilidad de NO y a la larga por desacoplamiento de la eNOS (90, 97). Este mismo efecto se produce con el aumento de la expresión proteica de las dos isoformas de la SOD. En este sentido, las CeO<sub>2</sub>NPs podrían utilizarse como nuevas

## Discusión

estrategias para el tratamiento de la arteriosclerosis y enfermedades cardiovasculares, fuertemente relacionadas con el estrés oxidativo vascular (105, 143).

En conclusión, como planteábamos en nuestra hipótesis, las CeO<sub>2</sub>NPs han demostrado tener efecto antioxidante en la vena safena humana, lo que les confiere efecto protector a nivel endotelial, ya que la formación de la placa de ateroma está fuertemente asociada al estrés oxidativo. Además, disminuyen la respuesta contráctil de la vena safena a la Ang II probablemente por aumentar su degradación a través del aumento de la expresión de la ACE2. Todo ello las convertiría en potenciales agentes terapéuticos para enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial, la insuficiencia cardíaca, la diabetes mellitus, la cardiopatía isquémica o la enfermedad del injerto coronario. Se precisarían, no obstante, la realización de estudios específicos en este sentido.

Por último, a la hora de plantear el uso de las CeO<sub>2</sub>NPs como agentes terapéuticos, no debemos olvidar que las nanopartículas pueden ser citotóxicas por sí mismas o al interferir con la homeostasis celular (192). En concreto, los óxidos metálicos son tóxicos *per se*. Esta citotoxicidad ha resultado útil en ciertos casos como es el tratamiento contra el cáncer (193). Respecto a la toxicidad de las CeO<sub>2</sub>NPs, varios estudios han observado efectos deletéreos con la exposición pulmonar (194, 195). No obstante, es de vital importancia conocer los procesos de distribución y absorción de la nanopartícula a utilizar, ya que durante su fabricación es posible modificar ciertas características (tamaño, forma, composición y carga eléctrica de su superficie, etc.) para mejorar su biocompatibilidad (193).

## **CONCLUSIONES**



1. Las CeO<sub>2</sub>NPs aumentan la respuesta al nitroprusiato sódico en la vena safena humana, probablemente por mimetizar la SOD, es decir, actuarían disminuyendo los niveles de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> y aumentando la biodisponibilidad de NO. En consonancia, las CeO<sub>2</sub>NPs tienen un efecto antioxidante a nivel vascular por aumentar la expresión proteica de ambas isoformas de la SOD y disminuir la NOX4.
2. Las CeO<sub>2</sub>NPs disminuyen la respuesta vasodilatadora a la bradiquinina, sin afectar a la relajación inducida por acetilcolina. La bradiquinina relaja por inducir la liberación de NO y activar los canales BKca.
3. Las CeO<sub>2</sub>NPs no afectan la vía eNOS-NO-GCs, ya que no modifican la expresión proteica de la eNOS, tampoco la fosforilación de la eNOS, ni la expresión de la GCs. Tampoco afectan la expresión de los canales BKca.
4. Las CeO<sub>2</sub>NPs no tienen efecto sobre la contracción inducida por la NE, el análogo del TXA<sub>2</sub> (U46619) ni la ET-1. Sin embargo, sí que disminuyen la respuesta contráctil a la Ang II en la vena safena humana.
5. El efecto las CeO<sub>2</sub>NPs sobre la Ang II no se atribuye a la capacidad para modificar la expresión de los receptores ATR1 y ATR2, pero podría estar relacionado con un aumento de la expresión proteica de la ACE2.



## **BIBLIOGRAFÍA**





1. World Health Organization. Cardiovascular diseases. Available at: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) Accessed January 2021.
2. World Health Organization. The top 10 causes of death. World health statistics 2019. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> Accessed January 2021.
3. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning A, Benedetto U. Guía ESC/EACTS 2018 sobre revascularización miocárdica. *Rev Esp Cardiol.* 2019;72(1):73.
4. Fitzgibbon GM, Kafka HP, Leach AJ, Keon WJ, Hooper GD, Burton JR. Coronary bypass graft fate and patient outcome: angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28(3):616-26.
5. Sabik JF, 3rd, Blackstone EH, Gillinov AM, Banbury MK, Smedira NG, Lytle BW. Influence of patient characteristics and arterial grafts on freedom from coronary reoperation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;131(1):90-8.
6. Benedetto U, Raja SG, Albanese A, Amrani M, Biondi-Zoccai G, Frati G. Searching for the second best graft for coronary artery bypass surgery: a network meta-analysis of randomized controlled trials. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2015;47(1):59-65; discussion
7. Cuerpo G, Carnero M, López J, Centella T, Polo L, García-Fuster R, et al. Cirugía cardiovascular en España en el año 2020. Registro de intervenciones de la Sociedad Española de Cirugía Cardiovascular y Endovascular. *Cir Cardiovasc.* 2022;29(4):207-20.
8. Deo SV, Shah IK, Dunlay SM, Erwin PJ, Locker C, Altarabsheh SE, et al. Bilateral internal thoracic artery harvest and deep sternal wound infection in diabetic patients. *Ann Thorac Surg.* 2013;95(3):862-9.
9. Toumpoulis IK, Theakos N, Dunning J. Does bilateral internal thoracic artery harvest increase the risk of mediastinitis? *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2007;6(6):787-91.
10. Hayward PA, Gordon IR, Hare DL, Matalanis G, Horrigan ML, Rosalion A, et al. Comparable patencies of the radial artery and right internal thoracic artery or saphenous vein beyond 5 years: results from the Radial Artery Patency and Clinical Outcomes trial. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010;139(1):60-5; discussion 5-7.
11. He G-W, Taggart D. Spasm in arterial grafts in coronary artery bypass grafting surgery. *Ann Thorac Surg.* 2016;101(3):1222-9.
12. Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation.* 1998;97(9):916-31.

## Bibliografía

13. Roth JA, Cukingnan RA, Brown BG, Gocka E, Carey JS. Factors influencing patency of saphenous vein grafts. *Ann Thorac Surg.* 1979;28(2):176-83.
14. Frick MH, Syväne M, Nieminen MS, Kauma H, Majahalme S, Virtanen V, et al. Prevention of the Angiographic Progression of Coronary and Vein-Graft Atherosclerosis by Gemfibrozil After Coronary Bypass Surgery in Men With Low Levels of HDL Cholesterol. *Circulation.* 1997;96(7):2137-43.
15. Investigators PCABGT. The effect of aggressive lowering of low-density lipoprotein cholesterol levels and low-dose anticoagulation on obstructive changes in saphenous-vein coronary-artery bypass grafts. *N Engl J Med.* 1997;336(3):153-63.
16. Chesebro JH, Fuster V, Elveback LR, Clements IP, Smith HC, Holmes DR, Jr., et al. Effect of dipyridamole and aspirin on late vein-graft patency after coronary bypass operations. *N Engl J Med.* 1984;310(4):209-14.
17. Goldman S, Copeland J, Moritz T, Henderson W, Zadina K, Ovitt T, et al. Saphenous vein graft patency 1 year after coronary artery bypass surgery and effects of antiplatelet therapy. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *Circulation.* 1989;80(5):1190-7.
18. Gavaghan TP, GebSKI V, Baron D. Immediate postoperative aspirin improves vein graft patency early and late after coronary artery bypass graft surgery. A placebo-controlled, randomized study. *Circulation.* 1991;83(5):1526-33.
19. Mangano DT. Aspirin and Mortality from Coronary Bypass Surgery. *N Engl J Med.* 2002;347(17):1309-17.
20. Deo SV, Dunlay SM, Shah IK, Altarabsheh SE, Erwin PJ, Boilson BA, et al. Dual anti-platelet therapy after coronary artery bypass grafting: is there any benefit? A systematic review and meta-analysis. *J Card Surg.* 2013;28(2):109-16.
21. Nocerino AG, Achenbach S, Taylor AJ. Meta-analysis of effect of single versus dual antiplatelet therapy on early patency of bypass conduits after coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol.* 2013;112(10):1576-9.
22. Verma S, Goodman SG, Mehta SR, Latter DA, Ruel M, Gupta M, et al. Should dual antiplatelet therapy be used in patients following coronary artery bypass surgery? A meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC surgery.* 2015;15(1):1-15.
23. Zhao Q, Zhu Y, Xu Z, Cheng Z, Mei J, Chen X, et al. Effect of ticagrelor plus aspirin, ticagrelor alone, or aspirin alone on saphenous vein graft patency 1 year after coronary artery bypass grafting: a randomized clinical trial. *JAMA.* 2018;319(16):1677-86.
24. Valgimigli M, Bueno H, Byrne RA, Collet J-P, Costa F, Jeppsson A, et al. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary

- artery disease developed in collaboration with EACTS. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2018;53(1):34-78.
25. Aldasoro M, Mauricio MD, Serna E, Cortina B, Segarra G, Medina P, et al. Effects of aspirin, nimesulide, and SC-560 on vasopressin-induced contraction of human gastroepiploic artery and saphenous vein. *Crit Care Med.* 2008;36(1):193-7.
26. Chello M, Mastroroberto P, Frati G, Patti G, D'Ambrosio A, Di Sciascio G, et al. Pressure distension stimulates the expression of endothelial adhesion molecules in the human saphenous vein graft. *Ann Thorac Surg.* 2003;76(2):453-8.
27. Johansson B, Samano N, Souza D, Bodin L, Filbey D, Mannion JD, et al. The no-touch vein graft for coronary artery bypass surgery preserves the left ventricular ejection fraction at 16 years postoperatively: long-term data from a longitudinal randomised trial. *Open Heart.* 2015;2(1):e000204.
28. Vane JR, Ånggård EE, Botting RM. Regulatory Functions of the Vascular Endothelium. *New Eng J Med.* 1990;323(1):27-36.
29. Macín-Valsecia. Cap. 19: Farmacología del endotelio vascular [Available from: [https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/cap19\\_endotelio.pdf](https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/cap19_endotelio.pdf).
30. Félétou M, editor *The endothelium, Part I: Multiple functions of the endothelial cells--focus on endothelium-derived vasoactive mediators. Colloquium series on integrated systems physiology: From molecule to function; 2011: Morgan & Claypool Life Sciences.*
31. Adair TH, Montani J-P, editors. *Angiogenesis. Colloquium series on integrated systems physiology: from molecule to function; 2010: Morgan & Claypool Life Sciences.*
32. Schechter AN, Gladwin MT. Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide. *N Eng J Med.* 2003;348(15):1483-5.
33. Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;153(3):1251-6.
34. C D. Endotelio vascular. *Hematología.* 2017;21(21):19-30.
35. Moncada S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol rev.* 1991;43:109-42.
36. Waldman SA, Murad F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1988;12:S115-8.
37. Corson MA, James NL, Latta SE, Nerem RM, Berk BC, Harrison DG. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res.* 1996;79(5):984-91.
38. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.* 2007;115(10):1285-95.

## Bibliografía

39. Rees DD, Palmer RM, Hodson HF, Moncada S. A specific inhibitor of nitric oxide formation from l-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol.* 1989;96(2):418-24.
40. Leone A, Moncada S, Vallance P, Calver A, Collier J. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet.* 1992;339(8793):572-5.
41. MacAllister RJ, Whitley GSJ, Vallance P. Effects of guanidino and uremic compounds on nitric oxide pathways. *Kidney Int.* 1994;45(3):737-42.
42. Shimokawa H, Morikawa K. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39(5):725-32.
43. Moncada S, Higgs E, Vane J. Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin x), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet.* 1977;309(8001):18-21.
44. JM RL. Prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Biosíntesis, metabolismo y mecanismos de acción. *Química clínica.* 1986;5(2):139-44.
45. Vanhoutte P. COX-1 and vascular disease. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;86(2):212-5.
46. Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature.* 1999;401(6752):493-7.
47. Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, et al. Hydrogen Peroxide Is an Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Human Mesenteric Arteries. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290(3):909-13.
48. Juez M. Estudio de la respuesta adrenérgica de la vena safena interna [Tesis Doctoral]: Universitat de València; 2014.
49. Félétou M, Vanhoutte Paul M. EDHF: an update. *Clin Sci.* 2009;117(4):139-55.
50. Félétou M. Endothelium-Dependent Hyperpolarization and Endothelial Dysfunction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2016;67(5):373-87.
51. Garland C, Dora K. EDH: endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. *Acta Physiol.* 2017;219(1):152-61.
52. Coleman HA, Tare M, Parkington HC. Endothelial potassium channels, endothelium-dependent hyperpolarization and the regulation of vascular tone in health and disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004;31(9):641-9.
53. de Wit C, Wöfle SE. EDHF and gap junctions: important regulators of vascular tone within the microcirculation. *Curr Pharm Biotechnol.* 2007;8(1):11-25.
54. Figueroa XF, Duling BR. Gap junctions in the control of vascular function. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(2):251-66.
55. Wallerstedt SM, Bodelsson M. Endothelium-dependent relaxation by substance P in human isolated omental arteries and veins: relative

- contribution of prostanoids, nitric oxide and hyperpolarization. *Br J Pharmacol.* 1997;120(1):25-30.
56. Haynes WG, Strachan FE, Webb DJ. Endothelin ETA and ETB receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation.* 1995;92(3):357-63.
57. Verhaar MC, Strachan FE, Newby DE, Cruden NL, Koomans HA, Rabelink TJ, et al. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation.* 1998;97(8):752-6.
58. Egido J, Alcázar R, Ruiz-Ortega M. Angiotensina II: péptido clave en el daño vascular y renal. *Nefrología.* 2003;23:27-35.
59. Lu C, Su L-Y, Lee RM, Gao Y-J. Superoxide anion mediates angiotensin II-induced potentiation of contractile response to sympathetic stimulation. *Eur J Pharmacol.* 2008;589(1-3):188-93.
60. Welch WJ. Angiotensin II-Dependent Superoxide: Effects on Hypertension and Vascular Dysfunction. *Hypertension.* 2008;52(1):51-6.
61. Ancion A, Tridetti J, Nguyen Trung ML, Oury C, Lancellotti P. A Review of the Role of Bradykinin and Nitric Oxide in the Cardioprotective Action of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors: Focus on Perindopril. *Cardiol Ther.* 2019;8(2):179-91.
62. Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C. The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol.* 2012;10(1):4-18.
63. Yuyun MF, Ng LL, Ng GA. Endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5-methyltetrahydrofolate in cardiovascular disease. Where are we with therapy? *Microvasc Res.* 2018;119:7-12.
64. Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, Zuckerbraun BS. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin.* 2020;36(2):307-21.
65. Förstermann U, Mügge A, Alheid U, Haverich A, Frölich J. Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ res.* 1988;62(2):185-90.
66. Hornig B, Drexler H. Endothelial function and bradykinin in humans. *Drugs.* 1997;54 Suppl 5:42-7.
67. Akar F, Uydeş B, Ayrancıoğlu K, Yener A, Aşlamacı S, Arsan M, et al. Endothelial function of human gastroepiploic artery in comparison with saphenous vein. *Cardiovasc Res.* 1994;28(4):500-4.
68. Liu Z-G, Ge Z-D, He G-W. Difference in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated hyperpolarization and nitric oxide release between human internal mammary artery and saphenous vein. *Circulation.* 2000;102(suppl\_3):lii-296-iii-301.
69. Gryglewski RJ, Uracz W, Chłopicki S, Marcinkiewicz E. Bradykinin as a major endogenous regulator of endothelial function. *Pediatric Pathology & Molecular Medicine.* 2002;21(3):279-90.

## Bibliografía

70. Taddei S, Bortolotto L. Unraveling the pivotal role of bradykinin in ACE inhibitor activity. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2016;16(5):309-21.
71. Angus J, Campbell G, Cocks T, Manderson J. Vasodilatation by acetylcholine is endothelium-dependent: a study by sonomicrometry in canine femoral artery in vivo. *J Physiol*. 1983;344(1):209-22.
72. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
73. Walch L, Brink C, Norel X. The muscarinic receptor subtypes in human blood vessels. *Therapie*. 2001;56(3):223-6.
74. Saternos HC, Almarghalani DA, Gibson HM, Meqdad MA, Antypas RB, Lingireddy A, et al. Distribution and function of the muscarinic receptor subtypes in the cardiovascular system. *Physiol genomics*. 2018;50(1):1-9.
75. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87(10):840-4.
76. Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation*. 2000;101(16):1899-906.
77. Incalza MA, D'Oria R, Natalicchio A, Perrini S, Laviola L, Giorgino F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul Pharmacol*. 2018;100:1-19.
78. Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Jr., Epstein SE. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*. 1990;323(1):22-7.
79. Konukoglu D, Uzun H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Adv Exp Med Biol*. 2017;956:511-40.
80. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, et al. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest*. 1990;86(1):228-34.
81. McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, et al. Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1992;35(8):771-6.
82. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*. 1993;88(6):2510-6.
83. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 2002;23(5):599-622.
84. Mauricio MD, Aldasoro M, Ortega J, Vila JM. Endothelial dysfunction in morbid obesity. *Curr Pharm Des*. 2013;19(32):5718-29.

85. Pernow J, Jung C. Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? *Cardiovasc Res.* 2013;98(3):334-43.
86. Kövamees O, Shemyakin A, Pernow J. Effect of arginase inhibition on ischemia-reperfusion injury in patients with coronary artery disease with and without diabetes mellitus. *PLoS One.* 2014;9(7):e103260-e.
87. Tengbom J, Cederström S, Verouhis D, Böhm F, Eriksson P, Folkersen L, et al. Arginase 1 is upregulated at admission in patients with ST-elevation myocardial infarction. *J Intern Med.* 2021;290(5):1061-70.
88. Lluch P, Mauricio M, Vila J, Segarra G, Medina P, del Olmo J, et al. Accumulation of symmetric dimethylarginine in hepatorenal syndrome. *Exp Biol Med.* 2006;231:70-5.
89. Klinger JR, Abman SH, Gladwin MT. Nitric oxide deficiency and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;188(6):639-46.
90. Mauricio MD, Guerra-Ojeda S, Marchio P, Valles SL, Aldasoro M, Escribano-Lopez I, et al. Nanoparticles in Medicine: A Focus on Vascular Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2018;2018:6231482.
91. Craig SM, Chen K, Pei Y, Li C, Huang X, Chen C, et al. NADPH oxidase 4 promotes endothelial angiogenesis through endothelial nitric oxide synthase activation. *Circulation.* 2011;124(6):731-40.
92. Schröder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J, et al. Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circulation research.* 2012;110(9):1217-25.
93. Dikalov SI, Dikalova AE, Bikineyeva AT, Schmidt HH, Harrison DG, Griendling KK. Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(9):1340-51.
94. Schröder K, Zhang M, Benkhoff S, Mieth A, Pliquett R, Kosowski J, et al. Nox4 is a protective reactive oxygen species generating vascular NADPH oxidase. *Circ Res.* 2012;110(9):1217-25.
95. Liu Y, Bubolz AH, Mendoza S, Zhang DX, Gutterman DD. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is the transferrable factor mediating flow-induced dilation in human coronary arterioles. *Circ Res.* 2011;108(5):566-73.
96. Shimokawa H, Godo S. Diverse Functions of Endothelial NO Synthases System: NO and EDH. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2016;67(5):361-6.
97. Knock GA. NADPH oxidase in the vasculature: Expression, regulation and signalling pathways; role in normal cardiovascular physiology and its dysregulation in hypertension. *Free Radic Biol Med.* 2019;145:385-427.
98. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 2006;113(13):1708-14.

## Bibliografía

99. Li H, Förstermann U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13(2):161-7.
100. Nishino T, Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T. Mammalian xanthine oxidoreductase—mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J.* 2008;275(13):3278-89.
101. Mervaala EM, Cheng ZJ, Tikkanen I, Lapatto R, Nurminen K, Vapaatalo H, et al. Endothelial dysfunction and xanthine oxidoreductase activity in rats with human renin and angiotensinogen genes. *Hypertension.* 2001;37(2):414-8.
102. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan R. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol.* 2009;7(1):65-74.
103. Islam MT. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurol Res.* 2017;39(1):73-82.
104. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell.* 2020;38(2):167-97.
105. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87(10):840-4.
106. Hagens WI, Oomen AG, de Jong WH, Cassee FR, Sips AJ. What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regul Toxicol Pharmacol.* 2007;49(3):217-29.
107. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical–physical applications to nanomedicine. *Molecules.* 2020;25(1):112.
108. Gómez A. Nanomedicina y su impacto en la práctica médica. *Repert de Medicina y Cirugía.* 2017;26(3):129-30.
109. Ghosh Chaudhuri R, Paria S. Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications. *Chem Rev.* 2012;112(4):2373-433.
110. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine.* 2008;3(2):133.
111. Irache JM, editor *Nanomedicina: nanopartículas con aplicaciones médicas.* Anales del Sistema Sanitario de Navarra; 2008: SciELO Espana.
112. Celardo I, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale.* 2011;3(4):1411-20.
113. Bao G, Mitragotri S, Tong S. Multifunctional nanoparticles for drug delivery and molecular imaging. *Ann Revi Biomed Eng.* 2013;15:253-82.
114. Ristow M. Oxidative metabolism in cancer growth. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2006;9(4):339-45.
115. Colon J, Herrera L, Smith J, Patil S, Komanski C, Kupelian P, et al. Protection from radiation-induced pneumonitis using cerium oxide nanoparticles. *Nanomed Nanotech Biol Med.* 2009;5(2):225-31.



116. Perez JM, Asati A, Nath S, Kaittanis C. Synthesis of biocompatible dextran-coated nanoceria with pH-dependent antioxidant properties. *Small*. 2008;4(5):552-6.
117. Xu C, Lin Y, Wang J, Wu L, Wei W, Ren J, et al. Nanoceria-triggered synergetic drug release based on CeO(2) -capped mesoporous silica host-guest interactions and switchable enzymatic activity and cellular effects of CeO(2). *Adv Healthc Mater*. 2013;2(12):1591-9.
118. Das J, Choi Y-J, Han JW, Reza AMMT, Kim J-H. Nanoceria-mediated delivery of doxorubicin enhances the anti-tumour efficiency in ovarian cancer cells via apoptosis. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-12.
119. Singh RK, Patel KD, Mahapatra C, Parthiban SP, Kim T-H, Kim H-W. Combinatory cancer therapeutics with nanoceria-capped mesoporous silica nanocarriers through pH-triggered drug release and redox activity. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;11(1):288-99.
120. Li H, Liu C, Zeng Y-P, Hao Y-H, Huang J-W, Yang Z-Y, et al. Nanoceria-mediated drug delivery for targeted photodynamic therapy on drug-resistant breast cancer. *ACS applied materials & interfaces*. 2016;8(46):31510-23.
121. Hasanzadeh L, Darroudi M, Ramezani N, Zamani P, Aghaee-Bakhtiari SH, Nourmohammadi E, et al. Polyethylenimine-associated cerium oxide nanoparticles: a novel promising gene delivery vector. *Life Sci*. 2019;232:116661.
122. Celardo I, Traversa E, Ghibelli L. Cerium oxide nanoparticles: a promise for applications in therapy. *J Exp Ther Oncol*. 2011;9(1):47-51.
123. Dhall A, Self W. Cerium oxide nanoparticles: a brief review of their synthesis methods and biomedical applications. *Antioxidants*. 2018;7(8):97.
124. Heckert EG, Karakoti AS, Seal S, Self WT. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria. *Biomaterials*. 2008;29(18):2705-9.
125. Karakoti A, Singh S, Dowding JM, Seal S, Self WT. Redox-active radical scavenging nanomaterials. *Chem Soc Rev*. 2010;39(11):4422-32.
126. Pirmohamed T, Dowding JM, Singh S, Wasserman B, Heckert E, Karakoti AS, et al. Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity. *ChemComm*. 2010;46(16):2736-8.
127. Xu C, Qu X. Cerium oxide nanoparticle: a remarkably versatile rare earth nanomaterial for biological applications. *NPG Asia Mater*. 2014;6(3):e90-e.
128. Baldim V, Bedioui F, Mignet N, Margail I, Berret J-F. The enzyme-like catalytic activity of cerium oxide nanoparticles and its dependency on Ce 3+ surface area concentration. *Nanoscale*. 2018;10(15):6971-80.
129. Ciofani G, Genchi GG, Liakos I, Cappello V, Gemmi M, Athanassiou A, et al. Effects of cerium oxide nanoparticles on PC12 neuronal-like cells: proliferation, differentiation, and dopamine secretion. *Pharm Res*. 2013;30(8):2133-45.

## Bibliografía

130. Rutten BP, Steinbusch HW, Korr H, Schmitz C. Antioxidants and Alzheimer's disease: from bench to bedside (and back again). *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002;5(6):645-51.
131. Ciulla M, Marinelli L, Cacciatore I, Stefano AD. Role of Dietary Supplements in the Management of Parkinson's Disease. *Biomolecules*. 2019;9(7).
132. Veurink G, Perry G, Singh SK. Role of antioxidants and a nutrient rich diet in Alzheimer's disease. *Open Biol*. 2020;10(6):200084-.
133. Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology*. 2001;40(8):959-75.
134. Pardridge WM. Alzheimer's disease drug development and the problem of the blood-brain barrier. *Alzheimer's & dementia*. 2009;5(5):427-32.
135. Hirst SM, Karakoti AS, Tyler RD, Sriranganathan N, Seal S, Reilly CM. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles. *Small*. 2009;5(24):2848-56.
136. Niu J, Wang K, Kolattukudy PE. Cerium oxide nanoparticles inhibits oxidative stress and nuclear factor- $\kappa$ B activation in H9c2 cardiomyocytes exposed to cigarette smoke extract. *J Pharmacolo Exp Ther*. 2011;338(1):53-61.
137. Chen S, Hou Y, Cheng G, Zhang C, Wang S, Zhang J. Cerium Oxide Nanoparticles Protect Endothelial Cells from Apoptosis Induced by Oxidative Stress. *Biol Trace Elem Res*. 2013;154(1):156-66.
138. Del Turco S, Ciofani G, Cappello V, Parlanti P, Gemmi M, Caselli C, et al. Effects of cerium oxide nanoparticles on hemostasis: Coagulation, platelets, and vascular endothelial cells. *J Biomed Mater Res A*. 2019;107(7):1551-62.
139. Zhang T, Li C-y, Jia J-j, Chi J-s, Zhou D, Li J-z, et al. Combination therapy with LXW7 and ceria nanoparticles protects against acute cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Curr Med Sci*. 2018;38(1):144-52.
140. Ribera J, Rodríguez-Vita J, Cordoba B, Portolés I, Casals G, Casals E, et al. Functionalized cerium oxide nanoparticles mitigate the oxidative stress and pro-inflammatory activity associated to the portal vein endothelium of cirrhotic rats. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218716.
141. Minarchick VC, Stapleton PA, Fix NR, Leonard SS, Sabolsky EM, Nurkiewicz TR. Intravenous and gastric cerium dioxide nanoparticle exposure disrupts microvascular smooth muscle signaling. *Toxicol Sci*. 2015;144(1):77-89.
142. Minarchick VC, Stapleton PA, Sabolsky EM, Nurkiewicz TR. Cerium dioxide nanoparticle exposure improves microvascular dysfunction and reduces oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Front Physiol*. 2015;6:339.

143. Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD. Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:8563845.
144. Menchón C, Martín R, Apostolova N, Victor VM, Alvaro M, Herance JR, et al. Gold nanoparticles supported on nanoparticulate ceria as a powerful agent against intracellular oxidative stress. *Small*. 2012;8(12):1895-903.
145. Schuijt MP, Tom B, de Vries R, Saxena PR, Sluiter W, van Kats JP, et al. Superoxide does not mediate the acute vasoconstrictor effects of angiotensin II: a study in human and porcine arteries. *J Hypertens*. 2003;21(12):2335-44.
146. Michell BJ, Chen Z-p, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, et al. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*. 2001;276(21):17625-8.
147. Zhao X, Rao Y, Liang J, Lin S, Wang X, Li Z, et al. Silver Nanoparticle-Induced Phosphorylation of Histone H3 at Serine 10 Involves MAPK Pathways. *Biomolecules*. 2019;9(2).
148. Kuchma MH, Komanski CB, Colon J, Teblum A, Masunov AE, Alvarado B, et al. Phosphate ester hydrolysis of biologically relevant molecules by cerium oxide nanoparticles. *Nanomed Nanotech Biol Med*. 2010;6(6):738-44.
149. Soloviev A, Zholos A, Ivanova I, Novokhatska T, Tishkin S, Raevska A, et al. Plasmonic gold nanoparticles possess the ability to open potassium channels in rat thoracic aorta smooth muscles in a remote control manner. *Vascul Pharmacol*. 2015;72:190-6.
150. Melnyk MI, Ivanova IV, Dryn DO, Prylutskyi YI, Hurmach VV, Platonov M, et al. C(60) fullerenes selectively inhibit BK(Ca) but not K(v) channels in pulmonary artery smooth muscle cells. *Nanomedicine*. 2019;19:1-11.
151. Mauricio MD, Serna E, Cortina B, Novella S, Segarra G, Aldasoro M, et al. Role of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels on adrenergic responses of human saphenous vein. *Am J Hypertens*. 2007;20(1):78-82.
152. Conklin DJ, Cowley HR, Wiechmann RJ, Johnson GH, Trent MB, Boor PJ. Vasoactive effects of methylamine in isolated human blood vessels: role of semicarbazide-sensitive amine oxidase, formaldehyde, and hydrogen peroxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(2):H667-H76.
153. Rahman M, Kimura S, Nishiyama A, Hitomi H, Zhang G, Abe Y. Angiotensin II stimulates superoxide production via both angiotensin AT1A and AT1B receptors in mouse aorta and heart. *Eur J Pharmacol*. 2004;485(1-3):243-9.
154. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase

(ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000;87(5):e1-e9.

155. Hamming I, Timens W, Bulthuis M, Lely A, Navis Gv, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol.* 2004;203(2):631-7.

156. Lely A, Hamming I, van Goor H, Navis G. Renal ACE2 expression in human kidney disease. *J Pathol.* 2004;204(5):587-93.

157. Salamanna F, Maglio M, Landini MP, Fini M. Body localization of ACE-2: On the trail of the keyhole of SARS-CoV-2. *Front Med.* 2020;7:935.

158. Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature.* 2002;417(6891):822-8.

159. Santos RAS, Ferreira AJ, Verano-Braga T, Bader M. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. *Journal of Endocrinology.* 2013;216(2):R1-R17.

160. Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M, et al. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev.* 2018;98(1):505-53.

161. Santos RAS, Campagnole-Santos MJ, Andrade SIP. Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept.* 2000;91(1):45-62.

162. Warner FJ, Guy JL, Lambert DW, Hooper NM, Turner AJ. Angiotensin converting enzyme-2 (ACE2) and its possible roles in hypertension, diabetes and cardiac function. *Lett Pept Sci.* 2003;10(5):377-85.

163. Jiang F, Yang J, Zhang Y, Dong M, Wang S, Zhang Q, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin 1-7: novel therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol.* 2014;11(7):413-26.

164. Patel VB, Zhong J-C, Grant MB, Oudit GY. Role of the ACE2/angiotensin 1-7 axis of the renin-angiotensin system in heart failure. *Circ Res.* 2016;118(8):1313-26.

165. Blaufarb IS, Sonnenblick EH. The renin-angiotensin system in left ventricular remodeling. *Am J Cardiol.* 1996;77(13):C8-C16.

166. Díez-Freire C, Vázquez J, Adjounian MFCd, Ferrari MFR, Yuan L, Silver X, et al. ACE2 gene transfer attenuates hypertension-linked pathophysiological changes in the SHR. *Physiol Genomics.* 2006;27(1):12-9.

167. Hernández Prada JA, Ferreira AJ, Katovich MJ, Shenoy V, Qi Y, Santos RA, et al. Structure-based identification of small-molecule angiotensin-converting enzyme 2 activators as novel antihypertensive agents. *Hypertension.* 2008;51(5):1312-7.

168. Wang W, Bodiga S, Das SK, Lo J, Patel V, Oudit GY. Role of ACE2 in diastolic and systolic heart failure. *Heart Fail Rev.* 2012;17(4):683-91.

169. Chamsi-Pasha MA, Shao Z, Tang WW. Angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for heart failure. *Curr Heart Fail Rep*. 2014;11(1):58-63.
170. Ohtsuki M, Morimoto S-i, Izawa H, Ismail TF, Ishibashi-Ueda H, Kato Y, et al. Angiotensin converting enzyme 2 gene expression increased compensatory for left ventricular remodeling in patients with end-stage heart failure. *Inte J Cardiol*. 2010;145(2):333-4.
171. Epelman S, Wilson Tang WH, Chen SY, Van Lente F, Francis GS, Sen S. Detection of Soluble Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;52(9):750-4.
172. Epelman S, Shrestha K, Troughton RW, Francis GS, Sen S, Klein AL, et al. Soluble Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Human Heart Failure: Relation With Myocardial Function and Clinical Outcomes. *J Card Fail*. 2009;15(7):565-71.
173. Ocaranza MP, Lavandero S, Jalil JE, Moya J, Pinto M, Novoa U, et al. Angiotensin-(1–9) regulates cardiac hypertrophy in vivo and in vitro. *J Hypertens*. 2010;28(5):1054-64.
174. Flores-Muñoz M, Smith N, Haggerty C, Milligan G, Nicklin S. Angiotensin1-9 antagonises pro-hypertrophic signalling in cardiomyocytes via the angiotensin type 2 receptor. *J Physiol*. 2011;589(4):939-51.
175. Flores-Munoz M, Work LM, Douglas K, Denby L, Dominiczak AF, Graham D, et al. Angiotensin-(1-9) attenuates cardiac fibrosis in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat via the angiotensin type 2 receptor. *Hypertension*. 2012;59(2):300-7.
176. Ocaranza MP, Moya J, Barrientos V, Alzamora R, Hevia D, Morales C, et al. Angiotensin-(1–9) reverses experimental hypertension and cardiovascular damage by inhibition of the angiotensin converting enzyme/Ang II axis. *J Hypertens*. 2014;32(4):771-83.
177. Fattah C, Nather K, McCarroll CS, Hortigon-Vinagre MP, Zamora V, Flores-Munoz M, et al. Gene therapy with angiotensin-(1-9) preserves left ventricular systolic function after myocardial infarction. *JACC*. 2016;68(24):2652-66.
178. Tamargo J, Duarte J, Ruilope L. New antihypertensive drugs under development. *Curr Med Chem*. 2015;22(3):305-42.
179. Bindom SM, Hans CP, Xia H, Boulares AH, Lazartigues E. Angiotensin I-converting enzyme type 2 (ACE2) gene therapy improves glycemic control in diabetic mice. *Diabetes*. 2010;59(10):2540-8.
180. Murça TM, Almeida TCS, Raizada MK, Ferreira AJ. Chronic activation of endogenous angiotensin-converting enzyme 2 protects diabetic rats from cardiovascular autonomic dysfunction. *Exp Physiol*. 2012;97(6):699-709.
181. Burrell LM, Johnston CI, Tikellis C, Cooper ME. ACE2, a new regulator of the renin–angiotensin system. *Trends Endocrinol Metab*. 2004;15(4):166-9.

## Bibliografía

182. Soler MJ, Wysocki J, Batlle D. Angiotensin-converting enzyme 2 and the kidney. *Exp Physiol*. 2008;93(5):549-56.
183. Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Burrell LM, Risvanis J, et al. Characterization of Renal Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Diabetic Nephropathy. *Hypertension*. 2003;41(3):392-7.
184. Fraga-Silva RA, Costa-Fraga FP, Murça TM, Moraes PL, Martins Lima A, Lautner RQ, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 activation improves endothelial function. *Hypertension*. 2013;61(6):1233-8.
185. McEachern AE, Shelton ER, Bhakta S, Obernolte R, Bach C, Zuppan P, et al. Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88(17):7724-8.
186. Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, et al. Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J Biol Chem*. 1994;269(34):21583-6.
187. Paegelow I, Werner H, Vietinghoff G, Wartner U. Release of cytokines from isolated lung strips by bradykinin. *Inflamm Res*. 1995;44(7):306-11.
188. Roche JA, Roche R. A hypothesized role for dysregulated bradykinin signaling in COVID-19 respiratory complications. *FASEB J*. 2020;34(6):7265-9.
189. Scialo F, Daniele A, Amato F, Pastore L, Matera MG, Cazzola M, et al. ACE2: the major cell entry receptor for SARS-CoV-2. *Lung*. 2020:1-11.
190. Mahmudpour M, Roozbeh J, Keshavarz M, Farrokhi S, Nabipour I. COVID-19 cytokine storm: The anger of inflammation. *Cytokine*. 2020;133:155151.
191. Monteil V, Kwon H, Prado P, Hagelkrüys A, Wimmer RA, Stahl M, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2. *Cell*. 2020;181(4):905-13. e7.
192. Mu Q, Jiang G, Chen L, Zhou H, Fourches D, Tropsha A, et al. Chemical basis of interactions between engineered nanoparticles and biological systems. *Chem Rev*. 2014;114(15):7740-81.
193. De Matteis V, Rinaldi R. Toxicity Assessment in the Nanoparticle Era. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1048:1-19.
194. Minarchick VC, Stapleton PA, Porter DW, Wolfarth MG, Çiftyürek E, Barger M, et al. Pulmonary cerium dioxide nanoparticle exposure differentially impairs coronary and mesenteric arteriolar reactivity. *Cardiovasc Toxicol*. 2013;13(4):323-37.
195. Nemmar A, Al-Salam S, Beegam S, Yuvaraju P, Ali BH. Aortic oxidative stress, inflammation and DNA damage following pulmonary exposure to cerium oxide nanoparticles in a rat model of vascular injury. *Biomolecules*. 2019;9(8):376.