



Universidad  
Rey Juan Carlos

## TESIS DOCTORAL

*Regulación por Nrf2 de la inflamación  
vascular y el estrés oxidativo inducidos por  
IL-1 $\beta$  en células de músculo liso vascular.  
Relación con TLR4.*

Autora:

Zoe González Carnicero

Directoras:

Ángela Martín Cortés  
Raquel Hernanz Martín

Programa de Doctorado en

Ciencias de la Salud

Escuela Internacional de Doctorado

2023



## TESIS DOCTORAL

*Regulación por Nrf2 de la inflamación  
vascular y el estrés oxidativo inducidos por  
IL-1 $\beta$  en células de músculo liso vascular.  
Relación con TLR4.*

Autora:

Zoe González Carnicero

Directoras:

Ángela Martín Cortés  
Raquel Hernanz Martín

Programa de Doctorado en

Ciencias de la Salud

Escuela Internacional de Doctorado

2023



Este trabajo ha sido financiado con ayudas del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 2015-69294\_R) Instituto de Salud Carlos III (CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, CB16.11.00286), y Universidad Rey Juan Carlos (Programa Propio de Fomento y Desarrollo de la Investigación. Convocatoria de financiación de Proyectos Puente de Investigación, 2020 y Convocatoria de Proyectos de Impulso a la Investigación para Jóvenes Doctores, 2022). Zoe González Carnicero ha sido beneficiaria de un contrato de Investigadora Predoctoral de la Comunidad de Madrid, y es beneficiaria actualmente de un contrato Predoctoral de Personal en Formación de la Universidad Rey Juan Carlos.



Dadme un punto de apoyo  
y moveré el mundo  
**Arquímedes**





A mi familia



# **AGRADECIMIENTOS**



Una Tesis Doctoral es un viaje largo y especial que conlleva un aprendizaje constante tanto en lo profesional como en lo personal. A lo largo del trayecto del doctorado hay momentos más fáciles y otros más complicados, pero por todos ellos consigues pasar gracias a tu esfuerzo y dedicación, y a la gente que te rodea. Quiero agradecer a todos el haberme acompañado estos años, el haber estado ahí, el haberme apoyado, y el seguir haciéndolo.

Gracias a la Doctora María Jesús Alonso por haberme dado esta oportunidad, por haberme permitido trabajar con ella (aun habiéndome confundido de campus en esta, nuestra universidad, el primerísimo día), y por haberme permitido formar parte de su equipo. Gracias a Mariaje, y también a las doctoras Ángela Martín y Raquel Hernanz, por haber sido mis guías en esta etapa, por haber sido algo así como “mis mamis” de laboratorio. Gracias por haber confiado en mí para hacer cosas que a veces ni yo pensé que podría hacer. Gracias por contar conmigo como una más desde el principio, por estar siempre pendientes, por contestar todas mis dudas, por ser ejemplos de rigurosidad, dedicación y esfuerzo. Gracias a las tres por ser siempre tan claras y directas. Gracias Mariaje por tu ayuda, por tu comprensión, y por dejarme ser una de tus niñas. Gracias Angela por tus historias, tus despistes, y tu positivismo, que tantos buenos momentos nos han dado. Gracias por tenerlo todo, absolutamente todo, apuntado para que tu pollito pudiera consultarlo. Gracias Raquel por tus esquemas, por saber buscar la buena historia cuando a veces al resto nos costaba, gracias por tu ayuda con los ratoncitos, por estar siempre a todo y a que no se nos pase nada. Gracias a las tres por ser, cada una a su manera, las mejores mentoras que una haya podido tener.

Gracias Maite por ser mi almacén particular, por ser una de las pocas personas que conozco a las que les gusta el frío más que a mí. Quiero agradecer de manera especial a Ana María y a Astrid por ser mis segundas manos el tiempo que estuvisteis con nosotras, por vuestra ayuda sin miramientos, por estar siempre dispuestas a hacer lo que esta, vuestra mini jefa, os iba mandado. Gracias también a Raquel R., la última incorporación al equipo, pero sin dudarle otro buen fichaje, siempre dispuesta a ayudar. Gracias por soportarme en mi recta final. A las tres, Ana María, Astrid, y Raquel R, gracias por aguantarme como profe, por las conversaciones de poyata, y por hacerme un poco más adicta de lo que ya era a la cafeína. Quiero dar las gracias también a Rober, que aun sin conocernos ha estado siempre para resolver mis dudas. Ha sido un placer conocerlo y coincidir contigo (aunque haya sido veces contadas). Gracias también a todas las chicas, y a las no tan chicas, de la UAM. Gracias por vuestros consejos y opiniones, gracias por echarnos una mano siempre, gracias por vuestro apoyo en la distancia.

A Elia, Marta y Almu: Gracias por estar siempre ahí, por nuestro club de lectura, por las confesiones entre té y paparajotes, por las comilonas. Gracias por aguantar mis penas y alegrías. Gracias por ser mis gochas. Elia por tu sensatez, por tu dulzura, por tu amor incondicional, por querer a la Rigo tanto como yo, por ser la mami de las cuatro, la primera en ser doctora, mi ejemplo a seguir. Marta por tu locura, por tu “puntualidad” y las historias que nos ha regalado, por ser a la par mi rubia, que mi morena, que mi pelirroja, y por ser mi predecesora. Almu por ser la ironía personificada, por tu paciencia, tu cariño y tus mimos, y sobre todo por no parar de traernos bollitos. Gracias a las tres por ser un pilar fundamental en la URJC.

A Elvira I, Elvira II y Marina: Elvira I, gracias por ser mi compañera de bata, mi Spotify particular (¿Venga Zowi que quieres que te ponga hoy? Y la pesada de yo a piñón fijo con la Rigo. Aunque también sabes que, ¡si te encuentro gritaré a viva voz que prefiero verte que...!). Gracias por tu energía siempre positiva, por confiar en mí, y por estar ahí. Elvira II, un paso fugaz por la URJC, pero para quedarse en nuestras vidas. Gracias por estar siempre de risas, por acompañarnos a esquiar a los paraísos fiscales de Andorra, y sobre todo por acabar aceptando el II como apellido. Marina, gracias por decirme siempre “tú puedes”, por esas notitas que, aunque cortitas, siempre me han sacado una sonrisa. En fin, gracias a las tres por ser mi otro pilar fundamental de la URJC.

En la URJC gracias también a Anita por aguantar mi bipolaridad y a José Luis por alegrarnos los días con su risa. A todos los postdocs del departamental I (nombraros a todos sería eterno), gracias por vuestra ayuda, y por aclararme unas cuantas dudas. Gracias también a mis chicas de la cafetería, por aprenderos mis manías con la cafeína, y por sacarme siempre una sonrisa desde bien temprano y todos los días.

Otra cosa muy importante en estos años ha sido mi estancia predoctoral en el laboratorio de la doctora Brigitta Buttari. Gracias por brindarme la oportunidad de poder trabajar contigo, gracias por confiar en mí para nuestro mini proyecto, y gracias por permitirme conocer la ciudad eterna y enamorarme de ella. Gracias también a la doctora Elisabetta Proffumo por ayudarme en esta etapa. Gracias a Benedetta por compartir conmigo poyata, risas y confesiones. Por los cafés y sobre todo por los cornetos rellenos. Gracias a las tres por vuestra alegría, por vuestros intentos de enseñarme italiano, y por compartir conmigo los días en el laboratorio.

Llegados a este punto quiero dar un gracias muy especial a las personitas que Roma me ha dado: A Tati, por ser y existir, a Ágata por ser mi compi de moño, a Javi (alias “el pelirrojo”) por ser mi conexión musical, a Abel por ser mi compi de basílicas e iglesias, a David por ser mi compi PhD, a Jaimito por ser tan directo como yo, a Dani por ser nuestras relaciones públicas... y a unos cuantos más. Gracias por acogerme como una más de la familia, por incluirme en el “pack”, por no dejarme apenas un día libre, por darme paseos por tantos sitios “viejos”, por los helados, por presentarme al suplí, y por un largo etc. Roma no sería tan Roma sin vosotros. Sois un pedacito de mí.

Gracias también a la biología que tantas cosas buenas me ha dado. Gracias a mis biólogos por iniciarse conmigo como proyecto de científicos, y sobre todo a mis compañeros de doctorado, Miguel, Adri, Jos, Pablo, con los que mucho, mucho he disfrutado, mucho, mucho me he quejado, mucho, mucho me he reído y mucho, mucho me han aguantado. Gracias también a mis biólogas María, Alba, Paula, Caye y demás por vuestras locuras, por sacarme siempre una sonrisa, por los cotilleos y las confesiones, por los momentos compartidos. Gracias a todos mis biólogos por existir, por ser compañeros de alegrías y sufrimientos, de aventuras, de viajes. En fin, gracias a todos por haberos convertido en compañeros de vida. Gracias a los biólogos por el mundo y a sus conexiones romanas. Gracias Romadrizzz, y a Álvaro por ser el nexa, por seguir permitiéndome socializar. Gracias también por estar ahí.

Gracias a todos mis pueblerinos por preocuparos verano a verano durante estos años de cómo le va a este proyecto de doctora. Por disfrutar conmigo en nuestro campamento particular, por ser mis compis de verbenas interminables, por amanecer conmigo cantando, y por seguir conmigo bailando, por nuestras excursiones y por los merecidos porrones con barrita energética

soriana (torrezno) de acompañamiento, por las noches de trivial y catán. Gracias por compartir conmigo un lugar tan especial (Soria que linda eres).

Para terminar, gracias, gracias y gracias a toda mi familia. Voy a empezar agradeciendo a la familia que se hace y no con la que se nace. Celia, Cris, Ana, María, Irene Muñoz, Irene Melero, Álvaro, Manu, Enrique, Miguel, Jorge y Dani, gracias por estar ahí siempre, en lo bueno y en lo malo. Gracias por acompañarme en esta vida, gracias por ser tan diferentes, pero a la vez tan iguales. Gracias por querernos tanto. Celia, gracias por ser mi binomio, Crispy, por ser mi rubia. Gracias a ambas por ser mis "Friends" (*I'll be there for you, 'cause you're there for me too*). Gracias Álvaro por ser nuestra Wikipedia particular, Ana, por tu alegría, María, por ser nuestra mami, Irene Muñoz, por estar siempre, aunque a 10.000 km. A todos por ser mis incondicionales. Gracias Miguel M. por captar mis bromas e ironías, Irene Melero por llegar a Madrid para quedarte. Gracias Enrique y Jorge por ser nuestros personajes particulares, y Dani por los abrazos. Gracias Manu por aguantarme desde que nacíste. Primo y amigo. Gracias a todos por saber aguantarme y por haber formado conmigo nuestra familia particular.

Gracias a mi familia de sangre. A mi madre porque es mi madre ¡Viva la madre que me parió! Por no dejar nunca que me falten unos buenos calcetines estampados. Por las mejores croquetas del mundo. Por ser bióloga. Por enseñarme a amar el cine. A mi padre porque es mi padre. Por enseñarnos que hay que saber de todo. Por las mejores comiditas del mundo. Por ser físico y filosofar. Por enseñarme a amar los libros. A ambos por apoyarme de manera incondicional, aun sin muchas veces entenderme. A mi hermana, por ser mi bebé preferido, por ser mi gemela (aunque solo por detrás), por estar tan loca, por ponerme nombres especiales, por ser una osita mimosita, por ponerme músicas del mundo y, sobre todo, por aguantarme y por existir.

Gracias a Miguel por ser y por estar. Por tener la paciencia que has tenido siempre conmigo. Por quererme como soy. Por no dejar de apoyarme ni un solo segundo. Por soñar conmigo, y por las buenas dosis de realidad que me has dado cuando mi cabeza aun quería seguir soñando (sin ellas habría cosas a las que igual no habría llegado). Eres un pilar fundamental. Podría escribirte una Tesis, pero soy mala para estas cosas, así que simplemente gracias.

Quiero acabar diciendo que me perdonéis porque no soy muy buena escribiendo este tipo de cosas. Sé que seguro me dejo gente por nombrar y es algo por lo que quería dar un "gracias a todos" y ya está, pero, aunque me deje algunas cosas por contar, había otras que había que mencionar. Gracias a todos, por todo.





# ÍNDICE



# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....</b>	<b>25</b>
ÍNDICE DE FIGURAS .....	27
ÍNDICE DE TABLAS .....	32
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>33</b>
<b>RESUMEN/ABSTRACT .....</b>	<b>41</b>
RESUMEN .....	43
ABSTRACT .....	45
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>47</b>
1. ESTRUCTURA DE LA PARED VASCULAR .....	50
2. FACTORES QUE REGULAN LA FUNCIÓN VASCULAR .....	52
2.1. ÓXIDO NÍTRICO.....	53
2.2. PROSTANOIDES .....	54
2.3. ENDOTELINA-1 .....	56
2.4. ANGIOTENSINA II.....	56
2.5. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.....	58
2.5.1. Fuentes de producción de ROS .....	60
▪ NAD(P)H OXIDASA .....	60
▪ XANTINA OXIDORREDUCTASA.....	62
▪ ÓXIDO NÍTRICO SINTASA DESACOPLADA .....	63
▪ MITOCONDRIAS.....	63
▪ OTRAS FUENTES DE ROS.....	64
3. ALTERACIONES DE LA PARED VASCULAR .....	65
3.1. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL .....	65
3.2. REMODELADO VASCULAR .....	66
3.3. RIGIDEZ VASCULAR.....	67
3.4. CAMBIOS FENOTÍPICOS DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES .....	68
3.4.1. Migración y proliferación celular.....	70
4. Nrf2.....	70
4.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN Nrf2/ARE.....	73
4.2. OTROS MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Nrf2 .....	75
4.3. SUSTANCIAS REGULADORAS DE Nrf2.....	78
4.4. EFECTOS DE LA ACTIVACIÓN DE Nrf2.....	80

4.5. Nrf2 Y ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES .....	82
5. INFLAMACIÓN VASCULAR .....	84
5.1. TLR4.....	85
5.2. IL-1 $\beta$ .....	89
5.2.1. Procesamiento de IL-1 $\beta$ .....	89
5.2.2. Señalización de IL-1 $\beta$ .....	90
5.3. COX-2.....	92
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>95</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>99</b>
1. ANIMALES Y MATERIAL BIOLÓGICO .....	101
2. CULTIVOS CELULARES.....	102
2.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL EN CMLV .....	102
3. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN PROTEICA .....	104
3.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS TOTALES.....	104
3.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES Y CITOSÓLICOS.....	105
3.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....	105
3.4. WESTERN BLOT .....	105
4. CUANTIFICACIÓN DEL ARNm – qRT-PCR .....	108
4.1. EXTRACCIÓN DEL ARNm.....	108
4.2. CUANTIFICACIÓN DEL ARNm.....	108
4.3. RETROTRANSCRIPCIÓN .....	108
4.4. qRT-PCR.....	109
5. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD NAD(P)H OXIDASA.....	110
6. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO MEDIANTE MICROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA.....	110
7. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO .....	111
8. ANÁLISIS DE LA MIGRACIÓN CELULAR .....	111
9. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	112
10. ANÁLISIS DE LA APOPTOSIS, LA NECROSIS Y LA VIABILIDAD CELULAR.....	112
11. ESTUDIOS DE FUNCIÓN VASCULAR .....	113
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	115
13. COMPUESTOS Y FÁRMACOS UTILIZADOS .....	115
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>119</b>
1. PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL EFECTO PROINFLAMATORIO DE IL-1 $\beta$ ....	121

1.1. EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO ...	121
1.1.1. Efecto de IL-1 $\beta$ sobre la actividad NAD(P)H oxidasa y la producción de especies reactivas de oxígeno.....	121
1.1.2. Efecto de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la actividad NAD(P)H oxidasa y la producción de anión superóxido.....	122
1.2. PARTICIPACIÓN DE ROS EN LA INDUCCIÓN DE COX-2 POR IL-1 $\beta$ .....	124
1.2.1. Efecto de IL-1 $\beta$ sobre la vía MAPK/AP-1/COX-2 .....	124
1.2.2. Participación de ROS en la activación de la vía AP-1/COX-2 .....	126
1.3. PARTICIPACIÓN DE ROS EN LA MIGRACIÓN Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR INDUCIDAS POR IL-1 $\beta$ .....	128
1.3.1. Efecto de IL-1 $\beta$ sobre la migración y la proliferación celular .....	128
1.3.2. Participación de ROS en la migración y la proliferación celular inducidas por IL-1 $\beta$ .....	129
1.3.3. Efecto de ROS sobre la migración celular.....	130
1.4. EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR .....	131
2. PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE TLR4 EN EL EFECTO PROINFLAMATORIO DE IL-1 $\beta$ .....	132
2.1. EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA VÍA DE TLR4 .....	132
2.2. PARTICIPACIÓN DE TLR4 EN EL EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO .....	134
2.3. PARTICIPACIÓN DE TLR4 EN EL EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA VÍA MAPK/AP-1/COX-2 .....	134
2.4. PARTICIPACIÓN DE TLR4 EN EL EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA MIGRACIÓN Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR .....	136
2.5. PARTICIPACIÓN DE TLR4 EN EL EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR... ..	137
3. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 POR IL-1 $\beta$ .....	138
3.1. EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA VÍA DE Nrf2.....	138
3.1.1. Activación de la vía de Nrf2 por IL-1 $\beta$ .....	138
3.1.2. Efecto de IL-1 $\beta$ sobre Keap1.....	141
3.1.3. Efecto de IL-1 $\beta$ sobre la fosforilación de Nrf2 .....	141
3.2. PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA VÍA DE Nrf2.....	142
3.2.1. Efecto de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la vía de Nrf2.....	145
3.3. PARTICIPACIÓN DE TLR4 EN EL EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA VÍA DE Nrf2.....	147
3.4. EFECTO PROTECTOR DE LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 POR IL-1 $\beta$ .....	149
4. MODULACIÓN POR LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 DEL EFECTO PROINFLAMATORIO DE IL-1 $\beta$ . ..	153
4.1. EFECTO DE tBHQ SOBRE LA VÍA DE Nrf2 .....	153
4.1.1. Activación de la vía de Nrf2 por tBHQ.....	153

4.1.2.	Efecto de tBHQ sobre Keap1 .....	156
4.1.3.	Efecto de tBHQ sobre la fosforilación de Nrf2 .....	156
4.2.	MODULACIÓN POR tBHQ DEL EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA VÍA DE Nrf2 .....	157
4.2.1.	Modulación por tBHQ de la activación de la vía de Nrf2 por IL-1 $\beta$ .....	157
4.2.2.	Modulación por tBHQ del efecto de IL-1 $\beta$ sobre Keap1.....	159
4.2.3.	Modulación por tBHQ del efecto de IL-1 $\beta$ sobre la fosforilación de Nrf2.....	159
4.3.	MODULACIÓN POR tBHQ DE LOS EFECTOS PROOXIDANTES DE IL-1 $\beta$ .....	160
4.3.1.	Modulación por tBHQ de la producción de estrés oxidativo inducida por IL-1 $\beta$ .....	160
4.3.2.	Modulación por tBHQ de los efectos del H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	164
4.4.	MODULACIÓN POR tBHQ DE LOS EFECTOS PROINFLAMATORIOS DE IL-1 $\beta$ .....	167
4.4.1.	Modulación por tBHQ del efecto de IL-1 $\beta$ sobre MyD88 .....	167
4.4.2.	Modulación por tBHQ del efecto de IL-1 $\beta$ sobre la vía MAPK/AP-1/COX-2....	168
4.5.	MODULACIÓN POR tBHQ DEL EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA MIGRACIÓN Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR .....	170
4.6.	MODULACIÓN POR tBHQ DEL EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR.....	171
5.	MODULACIÓN POR LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 DEL EFECTO PROINFLAMATORIO DE LPS ...	172
5.1.	EFECTO DE LPS SOBRE LA VÍA DE Nrf2 .....	173
5.1.1.	Activación de la vía de Nrf2 por LPS .....	173
5.1.2.	Efecto de LPS sobre Keap1 .....	174
5.1.3.	Efecto de LPS sobre la fosforilación de Nrf2 .....	174
5.2.	MODULACIÓN POR tBHQ DEL EFECTO PROINFLAMATORIO DE LPS.....	175
5.2.1.	Modulación por tBHQ del efecto de LPS sobre la vía de Nrf2.....	175
5.2.2.	Modulación por tBHQ del efecto de LPS sobre el estrés oxidativo.....	178
5.2.3.	Modulación por tBHQ de los efectos proinflamatorios de LPS .....	179
5.2.4.	Modulación por tBHQ del efecto de LPS sobre la migración y la proliferación celular.....	181
6.	ESTUDIO DE LA POSIBLE TOXICIDAD CELULAR INDUCIDA POR LOS FÁRMACOS UTILIZADOS EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO .....	182
	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>187</b>
1.	PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL EFECTO PROINFLAMATORIO DE IL-1 $\beta$ ....	189
2.	PARTICIPACIÓN LA VÍA DE TLR4 EN EL EFECTO PROINFLAMATORIO DE IL-1 $\beta$ .....	193
3.	EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 POR IL-1 $\beta$ .....	195
3.1.	EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA VÍA DE Nrf2 Y PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO	195
3.2.	EFECTO PROTECTOR DE LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 POR IL-1 $\beta$ .....	197

4. MODULACIÓN DE LOS EFECTOS PROOXIDANTES Y PROINFLAMATORIOS DE IL-1 $\beta$ POR LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 POR tBHQ.....	198
5. MODULACIÓN DEL EFECTO PROINFLAMATORIO DE LPS POR LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 POR tBHQ.....	201
<b>CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....</b>	<b>205</b>
CONCLUSIONES .....	207
CONCLUSIONS .....	208
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>209</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>245</b>





# **ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS**



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo de la estructura básica de la pared vascular .....	50
<b>Figura 2.</b> Mediadores vasoactivos.....	53
<b>Figura 3.</b> Esquema de la ruta de síntesis de los prostanoïdes por acción de las ciclooxigenasas y su efecto sobre el tono vascular .....	55
<b>Figura 4.</b> Esquema del sistema renina angiotensina y principales efectos de angiotensina II ...	57
<b>Figura 5.</b> Generación de las diferentes ROS a partir de la reducción secuencial del oxígeno ....	58
<b>Figura 6.</b> Efecto del estrés oxidativo en la pared vascular.....	60
<b>Figura 7.</b> Principales fuentes de producción de ROS .....	60
<b>Figura 8.</b> Esquema representativo del complejo de la enzima NAD(P)H oxidasa no activada y activada .....	61
<b>Figura 9.</b> Esquema representativo de la reacción mediada por la xantina oxidasa .....	62
<b>Figura 10.</b> Modulación fenotípica de las CMLV .....	69
<b>Figura 11.</b> Dominios estructurales proteicos de Nrf2 (Neh1-Neh7) .....	72
<b>Figura 12.</b> Dominios estructurales proteicos de Keap1 .....	72
<b>Figura 13.</b> Modelos de interacción de Keap1 y Nrf2.....	74
<b>Figura 14.</b> Esquema de los diferentes mecanismos de regulación del factor de transcripción Nrf2.....	75
<b>Figura 15.</b> Regulación de Nrf2 por la proteína reguladora de la autofagia p62 .....	76
<b>Figura 16.</b> Regulación de Nrf2 por GSK-3β.....	77
<b>Figura 17.</b> Esquema de las vías de señalización reguladas por el receptor TLR4 .....	87
<b>Figura 18.</b> Esquema de la vía de señalización de IL-1β .....	91
<b>Figura 19.</b> Protocolo experimental utilizado para estudiar el efecto de IL-1β, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y LPS sobre la expresión génica y proteica y el estrés oxidativo .....	103
<b>Figura 20.</b> Protocolo experimental utilizado para estudiar el efecto de IL-1β, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y LPS sobre la migración, la proliferación, la viabilidad, la necrosis y la apoptosis celular .....	103
<b>Figura 21.</b> Protocolo experimental utilizado para estudiar la modulación de los efectos de IL-1β, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y LPS por la activación de Nrf2 con tBHQ.....	104
<b>Figura 22.</b> Condiciones experimentales en los estudios de la función vascular .....	113
<b>Figura 23.</b> Esquema representativo del miógrafo de alambres para la realización de los estudios de función vascular. ....	114
<b>Figura 24.</b> Registro representativo del protocolo experimental realizado en los estudios de función vascular. ....	115
<b>Figura 25.</b> IL-1β aumenta la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa .....	121
<b>Figura 26.</b> IL-1β induce la producción de especies reactivas de oxígeno .....	122

<b>Figura 27.</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> aumenta la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa.....	123
<b>Figura 28.</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induce la producción de anión superóxido.....	123
<b>Figura 29.</b> IL-1 $\beta$ incrementa la expresión de COX-2.....	124
<b>Figura 30.</b> IL-1 $\beta$ incrementa la expresión nuclear de p-c-Jun .....	125
<b>Figura 31.</b> IL-1 $\beta$ incrementa la expresión de p-JNK2 y p-p38 .....	125
<b>Figura 32.</b> JNK participa en el incremento de la expresión de p-c-Jun en el núcleo y de COX-2 inducido por IL-1 $\beta$ .....	126
<b>Figura 33.</b> El estrés oxidativo participa en el incremento de la expresión de COX-2 inducido por IL-1 $\beta$ .....	127
<b>Figura 34.</b> El estrés oxidativo participa en la translocación al núcleo de p-c-Jun inducida por IL-1 $\beta$ .....	127
<b>Figura 35.</b> IL-1 $\beta$ incrementa la migración y proliferación de las CMLV .....	1288
<b>Figura 36.</b> El estrés oxidativo participa en el incremento de la migración celular inducido por IL-1 $\beta$ .....	129
<b>Figura 37.</b> El estrés oxidativo participa en el incremento de la proliferación celular inducido por IL-1 $\beta$ .....	130
<b>Figura 38.</b> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induce la migración de las CMLV.....	130
<b>Figura 39.</b> El anión superóxido participa en el incremento de la migración celular inducida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	131
<b>Figura 40.</b> IL-1 $\beta$ induce disfunción endotelial .....	131
<b>Figura 41.</b> IL-1 $\beta$ no altera la contractilidad vascular .....	132
<b>Figura 42.</b> IL-1 $\beta$ incrementa la expresión de MyD88 .....	133
<b>Figura 43.</b> TLR4 participa en el incremento de la expresión de MyD88 inducido por IL-1 $\beta$ .....	133
<b>Figura 44.</b> TLR4 participa en el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno inducido por IL-1 $\beta$ .....	134
<b>Figura 45.</b> TLR4 participa en el incremento de la expresión de p-JNK2 inducido por IL-1 $\beta$ .....	135
<b>Figura 46.</b> TLR4 participa en la translocación nuclear de p-c-Jun inducida por IL-1 $\beta$ .....	135
<b>Figura 47.</b> TLR4 participa en el incremento de la expresión de COX-2 inducido por IL-1 $\beta$ .....	136
<b>Figura 48.</b> TLR4 participa en el incremento de la migración celular inducido por IL-1 $\beta$ .....	136
<b>Figura 49.</b> TLR4 participa en el incremento de la proliferación celular inducido por IL-1 $\beta$ .....	137
<b>Figura 50.</b> TLR4 participa en disfunción endotelial inducida por IL-1 $\beta$ en aorta de ratón .....	137
<b>Figura 51.</b> TLR4 no altera la contractilidad vascular en aorta de ratón .....	138
<b>Figura 52.</b> IL-1 $\beta$ incrementa la expresión nuclear de Nrf2.....	139
<b>Figura 53.</b> IL-1 $\beta$ incrementa la expresión de HO-1, NQO1, SOD1 y SOD2 .....	140
<b>Figura 54.</b> IL-1 $\beta$ reduce la expresión de Keap1 .....	141
<b>Figura 55.</b> IL-1 $\beta$ incrementa la expresión de p-Nrf2 .....	141

**Figura 56.** JNK participa en el incremento de la expresión de p-Nrf2 inducida por IL-1 $\beta$  ..... 142

**Figura 57.** El estrés oxidativo participa en la activación de Nrf2 inducida por IL-1 $\beta$  ..... 143

**Figura 58.** El estrés oxidativo participa en el incremento de la expresión de HO-1 inducido por IL-1 $\beta$ .....144

**Figura 59.** El estrés oxidativo participa en el incremento de la expresión de SOD2 inducido por IL-1 $\beta$ ..... 144

**Figura 60.** El estrés oxidativo no participa en el incremento de la expresión de p-Nrf2 inducido por IL-1 $\beta$  ..... 145

**Figura 61.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementa la expresión nuclear de Nrf2 ..... 145

**Figura 62.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementa la expresión de HO-1 ..... 146

**Figura 63.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementa la expresión de NQO1 ..... 146

**Figura 64.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementa la expresión de p-Nrf2 ..... 147

**Figura 65.** TLR4 participa en el incremento de la expresión de p-Nrf2 inducido por IL-1 $\beta$  ..... 148

**Figura 66.** TLR4 participa en el incremento de la expresión de HO-1 y SOD2 inducido por IL-1 $\beta$ .....148

**Figura 67.** Brusatol inhibe la activación de Nrf2 inducida por IL-1 $\beta$ ..... 149

**Figura 68.** Brusatol inhibe el incremento de la expresión de HO-1 inducido por IL-1 $\beta$ ..... 150

**Figura 69.** Brusatol inhibe la disminución de la expresión de Keap1 inducida por IL-1 $\beta$  ..... 150

**Figura 70.** Brusatol inhibe el incremento de la expresión de p-Nrf2 inducido por IL-1 $\beta$  ..... 151

**Figura 71.** La inhibición de Nrf2 potencia el incremento de la expresión de p-JNK2 y p-p38 inducido por IL-1 $\beta$  ..... 152

**Figura 72.** La inhibición de Nrf2 potencia el incremento de la migración de las CMLV inducido por IL-1 $\beta$  ..... 152

**Figura 73.** Terbutilhidroquinona incrementa la expresión de Nrf2 ..... 153

**Figura 74.** La inhibición de Nrf2 previene el incremento de la expresión de Nrf2 inducido por terbutilhidroquinona..... 154

**Figura 75.** La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona aumenta la expresión de HO-1 .... 154

**Figura 76.** La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona incrementa la expresión de NQO1, SOD1 y SOD2 ..... 155

**Figura 77.** Terbutilhidroquinona reduce la expresión Keap1 ..... 156

**Figura 78.** Terbutilhidroquinona no modifica la expresión de p-Nrf2 ..... 156

**Figura 79.** La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modula el efecto de IL-1 $\beta$  sobre la expresión nuclear de Nrf2..... 157

**Figura 80.** La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modula el efecto de IL-1 $\beta$  sobre la expresión de HO-1 y NQO1 ..... 158

**Figura 81.** La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona reduce el efecto de IL-1 $\beta$  sobre la expresión de SOD2 ..... 158

<b>Figura 82.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modula el efecto de IL-1 $\beta$ sobre la expresión de Keap1.....	159
<b>Figura 83.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la expresión de p-Nrf2 inducido por IL-1 $\beta$ .....	160
<b>Figura 84.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modifica la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa .....	160
<b>Figura 85.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modifica la producción de especies reactivas de oxígeno.....	161
<b>Figura 86.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa inducido IL-1 $\beta$ .....	162
<b>Figura 87.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno inducido por IL-1 $\beta$ .....	163
<b>Figura 88.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modula el efecto de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la expresión nuclear de Nrf2.....	164
<b>Figura 89.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modula el efecto de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> sobre la expresión de HO-1 y NQO1 .....	165
<b>Figura 90.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la expresión de p-Nrf2 inducida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	165
<b>Figura 91.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa inducido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	166
<b>Figura 92.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la producción de anión superóxido inducido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	166
<b>Figura 93.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la migración de las CMLV inducido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	167
<b>Figura 94.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la expresión de MyD88 inducido por IL-1 $\beta$ .....	168
<b>Figura 95.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la expresión de p-JNK2 y p-p38 inducido por IL-1 $\beta$ .....	169
<b>Figura 96.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la expresión nuclear de p-c-Jun inducido por IL-1 $\beta$ .....	169
<b>Figura 97.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la expresión de COX-2 inducido por IL-1 $\beta$ .....	170
<b>Figura 98.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la migración y proliferación de las CMLV inducido por IL-1 $\beta$ . .....	171
<b>Figura 99.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona mejora la disfunción endotelial inducida por IL-1 $\beta$ en aorta de ratón .....	172
<b>Figura 100.</b> Terbutilhidroquinona no altera la contractilidad vascular .....	172
<b>Figura 101.</b> La activación de TLR4 por LPS incrementa la expresión nuclear de Nrf2 .....	173

<b>Figura 102.</b> La activación de TLR4 por LPS incrementa la expresión de HO-1 y NQO1 .....	174
<b>Figura 103.</b> La activación de TLR4 por LPS reduce la expresión de Keap1.....	174
<b>Figura 104.</b> La activación de TLR4 por LPS incrementa la expresión de p-Nrf2.....	175
<b>Figura 105.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modula el efecto de LPS sobre la expresión nuclear de Nrf2.....	176
<b>Figura 106.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modula el efecto de LPS sobre la expresión de HO-1 y NQO1 .....	176
<b>Figura 107.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modula el efecto de LPS sobre la expresión de Keap1 .....	177
<b>Figura 108.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la expresión de p-Nrf2 inducido por LPS .....	177
<b>Figura 109.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa inducido por LPS .....	178
<b>Figura 110.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno inducido por LPS .....	179
<b>Figura 111.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la expresión de MyD88 inducido por LPS .....	180
<b>Figura 112.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modifica el incremento en la expresión nuclear de p-c-Jun inducido por LPS .....	180
<b>Figura 113.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la expresión de COX-2 inducido por LPS.....	181
<b>Figura 114.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la migración de las CMLV inducido por LPS .....	182
<b>Figura 115.</b> La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modifica el incremento de la proliferación de las CMLV inducido por LPS .....	182
<b>Figura 116.</b> Los estímulos utilizados en este trabajo no afectan a la viabilidad celular .....	183
<b>Figura 117.</b> Los estímulos utilizados en este trabajo no inducen necrosis celular .....	184
<b>Figura 118.</b> De los estímulos utilizados en este trabajo solo tBHQ afecta a la apoptosis celular.....	185
<b>Figura 119.</b> Esquema resumen de los resultados obtenidos en la Tesis Doctoral.....	204

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Activadores e inhibidores de Nrf2.....	80
<b>Tabla 2.</b> Anticuerpos utilizados en los análisis de expresión proteica por Western Blot.....	107
<b>Tabla 3.</b> Cebadores utilizados en los análisis de RT-qPCR .....	109



# **ABREVIATURAS**



AA: ácido araquidónico

ACh: acetil colina

ADN: ácido desoxirribonucleico

Akt/PKB: proteína quinasa B

AMPC: adenosín monofosfato cíclico

Ang II: angiotensina II

AP-1: proteína activadora-1

Apo E: apolipoproteína E

ARE: elementos de respuesta a antioxidantes

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

ASC: proteína tipo Speck asociada a la apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento de caspasa

AT<sub>1</sub>R/ AT<sub>2</sub>R: receptor de angiotensina II de tipo 1/2

Bach1: factor de transcripción con homología a BTB y CNC1

BH<sub>4</sub>: tetrahidrobiopterina

BTB: *Broad complex, Tramtrack, Bric à Brac*

bZIP: cremallera de leucina

Ca<sup>2+</sup>: calcio

CaM: calmodulina

Ca<sup>2+</sup>-CaM: complejo calcio-calmodulina

CBP: proteína de unión a CREB

CDDO: ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9 (11)-dien-28-oico / Bardoxolona

CHD6: proteína helicasa con cromodominio de unión a ADN 6

CMLV: células musculares lisas vasculares

CNC: *cap'n collar*

CO: monóxido de carbono

COX: ciclooxigenasa

CREB: proteína de respuesta a AMPC

CRL: complejo Cul3-Rbx1-E3 ubiquitina ligasa

CTR: extremo C-terminal

Cul1/3: *cullin1/cullin3*

CYP450: citocromo P450

DAMP: patrones moleculares asociados a daños

DCFH-DA: diacetato de diclorofluoresceína

DGR: dominio de dobles repeticiones de glicinia  
DHE: dihidroetidio  
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DMF: dimetilfumarato  
DOCA: acetato de desoxicorticosterona  
ECA: enzima convertidora de angiotensina  
EDHF: factor hiperpolarizante derivado de endotelio  
EGF: factor de crecimiento epidérmico  
eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial  
EpRE: elementos de respuesta a compuestos electrofílicos  
ERK: quinasa regulada por señales extracelulares  
ET: endotelina  
ET<sub>A</sub>/ ET<sub>B</sub>: receptor de endotelina A/B  
FAD: dinucleótido de flavina adenina  
FBS: suero fetal bovino  
FMN: mononucleótido de flavina  
GCs: guanilato ciclasa soluble  
GMPc: guanosín monofosfato cíclico  
GPCR: receptores acoplados a proteínas G  
GPx: glutatión peroxidasa  
GR: glutatión reductasa  
GSH: glutatión  
GSK-3 $\beta$ : glucógeno sintasa quinasa-3 $\beta$   
GST: glutatión S transferasa  
GTP: trifosfato de guanosina  
GTPCH-1: GTP ciclohidrolasa-1  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno  
HDAC3: histona desacetilasa 3  
HMGB1: proteína de alta movilidad perteneciente al grupo de caja 1  
HO-1: hemoxigenasa-1  
Hsp: proteínas de choque térmico  
ICAM-1: molécula de adhesión intracelular-1  
IFN: interferón  
IL: interleuquina  
IL-1R1/IL-1R2/ IL-1R3: receptor de IL-1 de tipo 1/2/3

IL-1RacP: proteína accesoria del receptor de IL-1  
IL-1Ra: antagonista del receptor de IL-1  
iNOS: óxido nítrico sintasa inducible  
IRAK: proteína quinasa asociada al receptor de IL-1  
IVR: dominio intermedio  
JNK: proteína quinasa del extremo N-terminal de c-Jun  
Keap1: proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch  
KHS: solución de Krebs-Henseleit  
KLF4: factor 4 similar a Krüppel  
LDL: lipoproteína de baja densidad  
LOX: lipoxigenasas  
LPB: proteína de unión a LPS  
LPS: lipopolisacárido bacteriano  
LRR: dominio rico en repeticiones de leucina  
MAF: fibrosarcoma aponeurótico muscular  
MAL: proteína adaptadora de MyD88  
MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos  
MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos-1  
MD2: factor de diferenciación mieloide 2  
MEC: matriz extracelular  
miARN: micro ARN  
MMF: monometilfumarato  
MMP: metaloproteinasas de matriz  
MyD88: factor de diferenciación mieloide 88  
MYOCD: miocardina  
NAD(P)H: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
NES: secuencias de exportación nuclear  
NF- $\kappa$ B: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera  $\kappa$  de linfocitos B  
NLRP3: proteína 3 que contiene dominios NOD, LRR y PYD  
NLS: secuencias de localización nuclear  
nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal  
NO: óxido nítrico  
NOS: óxido nítrico sintasa  
NOX: NAD(P)H oxidasa  
NQO1: NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1

Nrf2: factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2  
NTR: extremo N-terminal  
 $O_2^{\cdot -}$ : anión superóxido  
OH $\cdot$ : radical hidroxilo  
ONOO $^-$ : peroxinitrito  
Ox-LDL: lipoproteínas de baja densidad oxidadas  
p38: quinasa p38  
PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos  
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas  
PGE $_2$ /F $_{2\alpha}$ /H $_2$ : prostaglandina E $_2$ /F $_{2\alpha}$ /H $_2$   
PGHS: prostaglandina (PG)-endoperóxido H sintasa  
PGI $_2$ : prostaciclina o prostaglandina I $_2$   
PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa  
PKC: proteína quinasa C  
PL: fosfolipasa  
PPAR: receptor activador de la proliferación de peroxisomas  
PRR: receptores de reconocimiento de patrones  
PS: fosfatidilserina  
PVAT: tejido adiposo perivascular  
qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real  
RAS: sistema renina angiotensina  
Rbx1: proteína Ring Box 1  
RE: retículo endoplasmático  
ROS: especies reactivas de oxígeno  
RXR $\alpha$ : receptor X de retinoides  $\alpha$   
SCF: complejo Skp1-Cul1-F-box-E3 ubiquitina ligasa  
SHR: ratas espontáneamente hipertensas  
SHR-SP: ratas espontáneamente hipertensas propensas a sufrir ictus  
Skp1: proteína asociada a la quinasa de fase S  
sMAF: proteínas MAF pequeñas  
SM-MHC: miosina de cadena pesada del músculo liso  
SOD: superóxido dismutasa  
SQSTM1: sequestosoma 1  
SRF: factor de respuesta sérica  
tBHQ: terbutilhidroquinona

TGF: factor de crecimiento transformante  
TIR: dominio con homología al receptor de IL-1  
TIRAP: proteína adaptadora que contiene dominio TIR  
TLR: receptor de tipo toll  
TNF: factor de necrosis tumoral  
TRIF: adaptador inductor de interferón- $\beta$  que contienen dominios TIR  
TRx: tiorredoxina  
TXA<sub>2</sub>: tromboxano A<sub>2</sub>  
UGT: UDP glucuronosiltransferasa  
VCAM-1: molécula de adhesión vascular-1  
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular  
VSMC: *vascular smooth muscle cells*  
XDH: xantina deshidrogenasa  
XO: xantina oxidasa  
XOR: xantina oxidorreductasa  
 $\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -actina del músculo liso  
 $\beta$ -TrCP: proteína de reconocimiento de repeticiones de  $\beta$ -transducina





# **RESUMEN/ABSTRACT**



## RESUMEN

La inflamación de la pared vascular es una característica clave de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, la aterosclerosis o la diabetes, las cuales son consideradas patologías inflamatorias crónicas y están asociadas con niveles elevados de citoquinas y enzimas proinflamatorias, como interleuquina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) o ciclooxigenasa-2 (COX-2), así como de especies reactivas de oxígeno (ROS), entre otras. Estudios recientes sugieren un importante papel de IL-1 $\beta$  en la respuesta inflamatoria de los vasos, así como en las alteraciones vasculares asociadas a estas patologías.

Los receptores de membrana tipo toll (TLR), que pueden reconocer tanto patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), como patrones moleculares asociados a daños (DAMP), participan en la regulación de la respuesta inflamatoria. TLR4 es uno de los TLR más estudiados y se expresa en la membrana de varios tipos de células, entre ellas las células endoteliales y las células musculares lisas vasculares (CMLV) de la pared vascular. La activación de TLR4 conduce a la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B (factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera  $\kappa$  de linfocitos B) y AP-1 (proteína activadora 1), que van a dar lugar a la transcripción de genes proinflamatorios, de diversas citoquinas y de COX-2. La activación de TLR4 está asociada al desarrollo de alteraciones vasculares como el remodelado vascular y la disfunción endotelial. Recientemente se ha descrito una posible relación entre este receptor y la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ , ya que se ha observado que esta citoquina puede inducir la activación de la vía de señalización mediada por TLR4.

Tanto la inflamación como el estrés oxidativo contribuyen al desarrollo de alteraciones estructurales y funcionales en la pared vascular, entre las que destacan la rigidez vascular, el remodelado vascular o la disfunción endotelial. Por lo tanto, los mecanismos que participan en la regulación del equilibrio redox en el organismo podrían ejercer un efecto beneficioso frente a estos procesos. Uno de los principales mecanismos que participan en el mantenimiento del equilibrio redox en las células es el llevado a cabo por Nrf2 (factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2), un factor de transcripción sensible a estrés oxidativo y compuestos electrófilos que regula la transcripción de genes que codifican para proteínas con actividad antioxidante y antiinflamatoria.

La hipótesis de este trabajo es que la vía de TLR4 podría participar en el efecto inflamatorio y en el estrés oxidativo inducidos por IL-1 $\beta$  y que la activación de Nrf2 actuaría reduciendo los efectos deletéreos causados por esta citoquina en la pared vascular, de manera que podría tener un efecto beneficioso en determinadas patologías cardiovasculares.

El objetivo general de este trabajo ha sido estudiar si la vía de TLR4 participa en los efectos proinflamatorios y prooxidantes inducidos por IL-1 $\beta$  y el posible papel protector de la activación del factor de transcripción Nrf2 frente a estos efectos. Para llevar a cabo este objetivo se han realizado experimentos en una línea celular de CMLV de aorta de ratón y en segmentos de aorta de ratón, tras el tratamiento con IL-1 $\beta$ .

Los principales resultados de este trabajo son:

- IL-1 $\beta$  aumenta MyD88 y activa la NAD(P)H oxidasa, generando estrés oxidativo, el cual está implicado en la activación de la vía proinflamatoria de MAPK/AP-1/COX-2 en CMLV, así como en el aumento de la proliferación y la migración de estas células. Además, esta citoquina induce disfunción endotelial en aorta de ratón. La inhibición de TLR4 reduce estos efectos inducidos por IL-1 $\beta$ , indicando la participación de la vía de señalización TLR4/MyD88 en los efectos de la citoquina.
- IL-1 $\beta$ , a través del estrés oxidativo y de TLR4, activa el factor de transcripción Nrf2 en las CMLV, induciendo un aumento de su translocación al núcleo y de la expresión de las proteínas diana HO-1, NQO1 y SOD. Además, IL-1 $\beta$  reduce la expresión de Keap1 y estimula la fosforilación de Nrf2 por JNK, mecanismos que pueden estar implicados en la activación del factor de transcripción.
- La inhibición farmacológica de Nrf2 con brusatol potencia el efecto activador de IL-1 $\beta$  sobre las MAPK JNK y p38, y sobre la migración de las CMLV, lo que sugiere que la activación de Nrf2 por IL-1 $\beta$  actúa como mecanismo compensatorio frente a los efectos inflamatorios de la citoquina.
- El activador de Nrf2 tBHQ revierte el estrés oxidativo, el aumento de expresión de los mediadores proinflamatorios MyD88, JNK, p38, AP-1 y COX-2, y la proliferación y la migración celular inducidos por IL-1 $\beta$  en CMLV. Además, tBHQ mejora la disfunción endotelial inducida por esta citoquina en aorta de ratón. De esta manera, la activación farmacológica del factor de transcripción Nrf2 protege frente a los efectos deletéreos de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ , al menos en parte, mediante la interferencia con la vía de TLR4/MyD88
- LPS, principal ligando del receptor TLR4, activa la vía de Nrf2 en las CMLV, aumentando su translocación nuclear e induciendo la expresión de las proteínas diana HO-1, NQO1 y SOD. Además, LPS reduce la expresión de Keap1 y estimula la fosforilación de Nrf2, mecanismos que pueden contribuir a la activación del factor de transcripción.
- El activador de Nrf2 tBHQ abole el estrés oxidativo, el aumento de expresión de los mediadores proinflamatorios MyD88 y COX-2, y la migración celular inducidos por LPS en CMLV, mostrando un papel protector de la activación de Nrf2 frente a los efectos deletéreos inducidos por la estimulación de la vía TLR4/MyD88.

En resumen, los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral muestran que TLR4 participa en los efectos prooxidantes y proinflamatorios de la citoquina IL-1 $\beta$ . Por otra parte, la activación farmacológica del factor de transcripción Nrf2 protege frente a los efectos deletéreos de IL-1 $\beta$ , al menos en parte, a través de la interferencia con la vía de TLR4/MyD88.

## ABSTRACT

Vascular wall inflammation is a key feature of cardiovascular diseases such as hypertension, atherosclerosis, or diabetes. These are considered chronic inflammatory pathologies with elevated levels of cytokines and proinflammatory enzymes, such as interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) or cyclooxygenase-2 (COX-2), as well as reactive oxygen species (ROS), among others. Recent studies have suggested an important role of IL-1 $\beta$  in vessels' inflammatory response, as well as in vascular alterations associated with these pathologies.

Toll-like receptors (TLR) are membrane receptors which can recognize both pathogen-associated molecular patterns (PAMP) and damage-associated molecular patterns (DAMP). TLR are involved in the regulation of the inflammatory response. Among them, TLR4 is one of the best studied, which is expressed in the membrane of several cell types, including vascular cells such as endothelial and vascular smooth muscle cells (VSMC). TLR4 activation leads to the upregulation of transcription factors such as NF- $\kappa$ B (Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells) and AP-1 (activator protein 1), which result in the transcription of proinflammatory genes, several cytokines and COX-2. In addition, TLR4 activation is associated with the development of vascular alterations such as vascular remodeling and endothelial dysfunction. A possible relationship between this receptor and the proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$  has recently been described. Thus, it has been reported that this cytokine can induce the activation of TLR4-mediated signaling pathway.

Both inflammation and oxidative stress contribute to the development of structural and functional alterations in the vascular wall, including vascular stiffness and remodeling, as well as endothelial dysfunction. Therefore, mechanisms involved in the regulation of the redox balance would have a beneficial effect on these processes. One of the most important mechanisms involved in the maintenance of the cellular redox balance is the one operated by Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2), a transcription factor sensitive to oxidative stress and electrophilic compounds that regulates the transcription of antioxidant and anti-inflammatory genes.

The **hypothesis** of this study is that TLR4 pathway would participate in IL-1 $\beta$ -induced prooxidant and proinflammatory effects, and that Nrf2 activation would reduce the detrimental effects of this cytokine in the vascular wall, so it would have a beneficial role in some cardiovascular pathologies.

The **main objective** of this study has been to study whether TLR4 pathway contributes to the proinflammatory and prooxidant effects induced by IL-1 $\beta$  and the possible protective role of Nrf2 activation against these effects. For this purpose, we performed experiments in a mouse aortic VSMC cell line and in mouse aortic segments after treatment with IL-1 $\beta$ .

The **main findings** of this Thesis are:

- IL-1 $\beta$  increases MyD88 expression and NAD(P)H oxidase activity, generating oxidative stress, which contributes to the activation of the proinflammatory MAPK/AP-1/COX-2 pathway in VSMC, as well as to the increased proliferation and migration of these cells. Furthermore, this cytokine induces endothelial dysfunction in mouse aorta. TLR4

inhibition reduces those IL-1 $\beta$ -induced effects, indicating the involvement of the TLR4/MyD88 signaling pathway in the effects of the cytokine.

- IL-1 $\beta$ , through oxidative stress and TLR4, activates Nrf2 in VSMC, thus inducing an increase in its nuclear translocation and in the expression of its target proteins HO-1, NQO1 and SOD. In addition, IL-1 $\beta$  reduces Keap1 expression while stimulates Nrf2 phosphorylation by JNK; both mechanisms might be involved in the activation of the transcription factor.
- Pharmacological inhibition of Nrf2 with brusatol potentiates IL-1 $\beta$ -induced effects on JNK and p-38 MAPK activation and VSMC migration, suggesting that Nrf2 activation by IL-1 $\beta$  acts as a compensatory mechanism against the inflammatory effects of the cytokine.
- The Nrf2 activator tBHQ reverses oxidative stress, increased expression of proinflammatory mediators MyD88, JNK, p38, AP-1 and COX-2, as well as IL-1 $\beta$ -induced cell proliferation and migration in VSMC. Furthermore, tBHQ ameliorates IL-1 $\beta$ -induced endothelial dysfunction in mouse aorta. Thus, pharmacological activation of Nrf2 protects against the deleterious effects of the proinflammatory cytokine, at least in part, by interfering with the TLR4/MyD88 pathway.
- LPS, the main ligand of the TLR4 receptor, activates Nrf2 pathway in VSMC, increasing its nuclear translocation and inducing the expression of its target proteins HO-1, NQO1 and SOD. In addition, LPS reduces Keap1 expression and stimulates Nrf2 phosphorylation, mechanisms that might contribute to the transcription factor activation.
- The Nrf2 activator tBHQ abolishes oxidative stress, increased expression of proinflammatory mediators MyD88 and COX-2, and cellular migration induced by LPS in VSCM, revealing a protective role of Nrf2 activation against the deleterious effects induced by TLR4/MyD88 pathway stimulation.

In summary, the results of this Doctoral Thesis indicate that TLR4 participates in the pro-oxidant and pro-inflammatory effects of IL-1 $\beta$ . Moreover, pharmacological activation of Nrf2 transcription factor protects against the deleterious effects of IL-1 $\beta$ , at least in part, through interference with the TLR4/MyD88 pathway.

# **INTRODUCCIÓN**





La inflamación de la pared vascular es una característica clave de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión o la aterosclerosis, entre otras, las cuales son consideradas **enfermedades inflamatorias** crónicas (Senoner and Dichtl., 2019; Krzemińska *et al.*, 2022). Estas patologías se asocian con niveles elevados de citoquinas y enzimas proinflamatorias, como interleuquina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) o ciclooxigenasa 2 (COX-2), entre otras. En la pared vascular, la infiltración de células del sistema inmune conduce a la producción de estos mediadores proinflamatorios, aunque también las propias células de la pared, como las células endoteliales, las células musculares lisas vasculares (CMLV) o los fibroblastos pueden producirlos (Dinh *et al.*, 2014; Goswami *et al.*, 2021). Las citoquinas generadas durante la inflamación modulan la expresión de moléculas de adhesión, quimioquinas y enzimas productoras de especies reactivas de oxígeno (**ROS**), como la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa [NAD(P)H oxidasa]. De esta forma, la inflamación vascular se asocia a la inducción de **estrés oxidativo** (Senoner and Dichtl, 2019; Griendling *et al.*, 2021; Krzemińska *et al.*, 2022), el cual, a su vez, contribuye al desarrollo de inflamación, generando así un círculo vicioso entre estos dos procesos que afecta al mantenimiento del tono vascular, al crecimiento y la diferenciación celular, a la apoptosis y a la deposición de proteínas de matriz extracelular (Senoner and Dichtl, 2019; Touyz *et al.*, 2020; Krzemińska *et al.*, 2022). De esta manera, los mecanismos inflamatorios que tienen lugar en la pared vascular participan activamente en la disfunción endotelial y el remodelado vascular que caracterizan las enfermedades cardiovasculares (Renna *et al.*, 2013a; Gimbrone and García-Cardeña, 2016; Konukoglu and Uzun, 2016; Jaminon *et al.*, 2019), procesos que constituyen factores predictivos independientes de eventos cardiovasculares adversos (Rizzoni and Agabiti-Rosei, 2012; Ambrosino *et al.*, 2022).

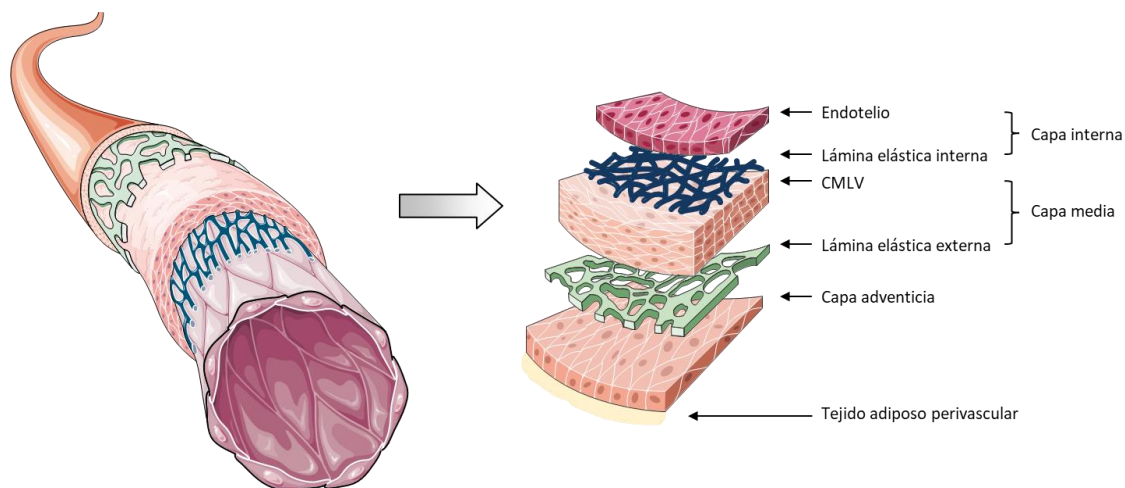
El receptor de membrana de tipo toll 4 (TLR4) es miembro de la familia de receptores de reconocimiento de patrones (PRR), cuya activación por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), o por patrones moleculares asociados a daños (DAMP), estimula la respuesta inflamatoria. Además de expresarse en las células inmunes, TLR4 se expresa en otros tipos celulares, incluidas las células endoteliales y las CMLV de la pared vascular (Vaure and Liu, 2014). La activación de TLR4 conduce a la activación de NF- $\kappa$ B (factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera  $\kappa$  de linfocitos B) y AP-1 (proteína activadora-1) y a la consecuente transcripción de genes proinflamatorios, que codifican para diversas citoquinas y COX-2. La activación de este receptor se relaciona con el desarrollo de patologías cardiovasculares y de las alteraciones vasculares asociadas (Kawai and Akira, 2007; Hernanz *et al.*, 2015; Roshan *et al.*, 2016; Nunes *et al.*, 2019).

Para contrarrestar el estrés oxidativo y la inflamación, el organismo presenta una serie de mecanismos antioxidantes. Uno de los principales mecanismos que contribuye al mantenimiento del equilibrio redox celular es el mediado por el factor de transcripción Nrf2 (factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2), que activa la transcripción de genes que codifican para diferentes proteínas antioxidantes y detoxificantes (Tonelli *et al.*, 2018; Yamamoto *et al.*, 2018). De esta manera, la activación farmacológica de este factor de transcripción podría ser una buena estrategia para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares que cursen con estrés oxidativo e inflamación.

En la presente introducción se realizará una revisión del proceso inflamatorio en la pared vascular y su implicación en diversas enfermedades cardiovasculares. Se hará énfasis en los mecanismos inflamatorios activados por IL-1 $\beta$  y por el receptor TLR4, y se analizará el papel del estrés oxidativo, así como la importancia de la vía de Nrf2.

## 1. ESTRUCTURA DE LA PARED VASCULAR

La estructura de la pared vascular varía dependiendo del tipo de vaso sanguíneo y de la función específica del mismo, pero existe una conformación básica que es común a todos ellos consistente en tres capas o tunicas concéntricas bien diferenciadas, tanto a nivel estructural como funcional: la capa interna, la capa media y la capa adventicia. Todas ellas están formadas por células y por componentes de la matriz extracelular (MEC) que sirven de soporte y de comunicación intercelular (**Figura 1**). Entre las funciones que poseen los componentes de la pared vascular tenemos la de soporte mecánico, actividad vasomotora, función metabólica e interacción con los elementos de la sangre.



**Figura 1. Esquema representativo de la estructura básica de la pared vascular.** CMLV: células musculares lisas vasculares. Elaboración propia. Creada con smart.servier.com.

- **La capa interna** (*túnica íntima*) está formada por una monocapa de células endoteliales que se encuentran en contacto directo con la sangre circulante. Estas células endoteliales descansan sobre una matriz extracelular rica en colágeno, fibronectina, laminina y proteoglicanos, conocida como lámina o membrana basal, y que tiene un importante papel en el control de la estructura de los vasos. La *túnica íntima* se encuentra separada de la *túnica media* por la lámina elástica interna, una fina capa elástica y fenestrada que proporciona flexibilidad y estabilidad a las células endoteliales (Pugsley and Tabrizchi, 2000). Esta capa interna de los vasos sanguíneos es fuente de moléculas tanto vasodilatadoras como vasoconstrictoras, por lo que tiene un importante papel en la regulación del tono vascular. La *túnica íntima*, además, regula otras funciones como la trombosis, la angiogénesis, la diferenciación y la función de las CMLV y la inflamación, debido a su interacción con las células inflamatorias del torrente sanguíneo (Halper, 2018).

- **La capa media** (*túnica media*) está formada por CMLV dispuestas de manera concéntrica y embebidas en una matriz extracelular compuesta por fibras de elastina y colágeno. Está separada de la *túnica externa* por la lámina elástica externa, que proporciona soporte estructural. La *túnica media* es más o menos gruesa dependiendo de los diferentes tipos de vasos sanguíneos, de su diámetro y de su función (Gao, 2017). Esta capa se encarga de modular el tono vascular, ya que las CMLV se relajan o se contraen en función de diferentes factores como son las fuerzas hemodinámicas o los mediadores vasoactivos liberados por las capas adyacentes. Además, las CMLV sintetizan los componentes de la MEC en la que están embebidas, los cuales, junto con estas células, confieren resistencia ante la presión ejercida por la sangre circulante (Gao, 2017; Frisantiene *et al.*, 2018).
- **La capa adventicia** (*túnica externa*) está formada principalmente por fibroblastos embebidos en una densa MEC constituida por fibras elásticas y colágeno, que actúa como soporte mecánico. También forman parte de esta capa pequeños vasos sanguíneos (*vasa vasorum*) que transportan oxígeno y nutrientes a las células de la pared vascular, vasos linfáticos, fibras nerviosas y células del sistema inmune como macrófagos o células dendríticas (Stenmark *et al.*, 2013; Cautivo *et al.*, 2020). La *túnica externa* es capaz de reaccionar ante una gran variedad de estímulos provenientes de las capas adyacentes, por lo que se dice que, aparte de actuar como soporte mecánico de los vasos, también funciona como “sensor de daños” en la pared vascular. En respuesta a estímulos hormonales, inflamatorios o hipoxia, las células de la capa adventicia son las primeras en activarse dando lugar a la liberación de diferentes factores como quimioquinas, citoquinas, factores de crecimiento, etc., que actúan sobre las CMLV de la capa media regulando la estructura y la función vascular (Stenmark *et al.*, 2013; Cautivo *et al.*, 2020).

La **matriz extracelular** es un componente esencial de la pared vascular que participa en la modulación de la señalización celular y confiere soporte mecánico y elasticidad, manteniendo la estructura de los vasos. Está formada por elastina, fibras de colágeno, glicoproteínas (fibronectina, laminina, fibrinógeno, entre otros) y glicosaminoglicanos. Estos componentes de la MEC son sintetizados en mayor o menor medida por las diferentes células de la pared de los vasos (Gupta and Grandeallen, 2006; Wagenseil and Mecham, 2009). La elastina, sintetizada principalmente por las CMLV, es el elemento mayoritario de la MEC arterial (en las arterias constituye hasta el 90% de las mismas) y confiere elasticidad a la pared vascular. Las fibras elásticas están dispuestas en láminas concéntricas que se conectan entre sí por microfibrillas y entre las que se disponen las CMLV, lo que ayuda a la contracción/relajación de los vasos. El colágeno (mayoritariamente tipos I y III) forma fibras rígidas que limitan la distensión vascular y dan resistencia a la pared (Wagenseil and Mecham, 2009). Además, la MEC induce señales que regulan funciones celulares como el crecimiento, la migración y la proliferación celular, de manera que la MEC participa en el control de la modulación fenotípica de las CMLV y de la angiogénesis (Eble and Niland, 2009; Gao, 2017).

El **tejido adiposo perivascular (PVAT)** recubre la mayoría de los vasos sanguíneos y está compuesto, principalmente, por adipocitos y células del sistema inmune que se encuentran embebidas en el mismo, como los macrófagos (Guzik *et al.*, 2007). Inicialmente se pensaba que

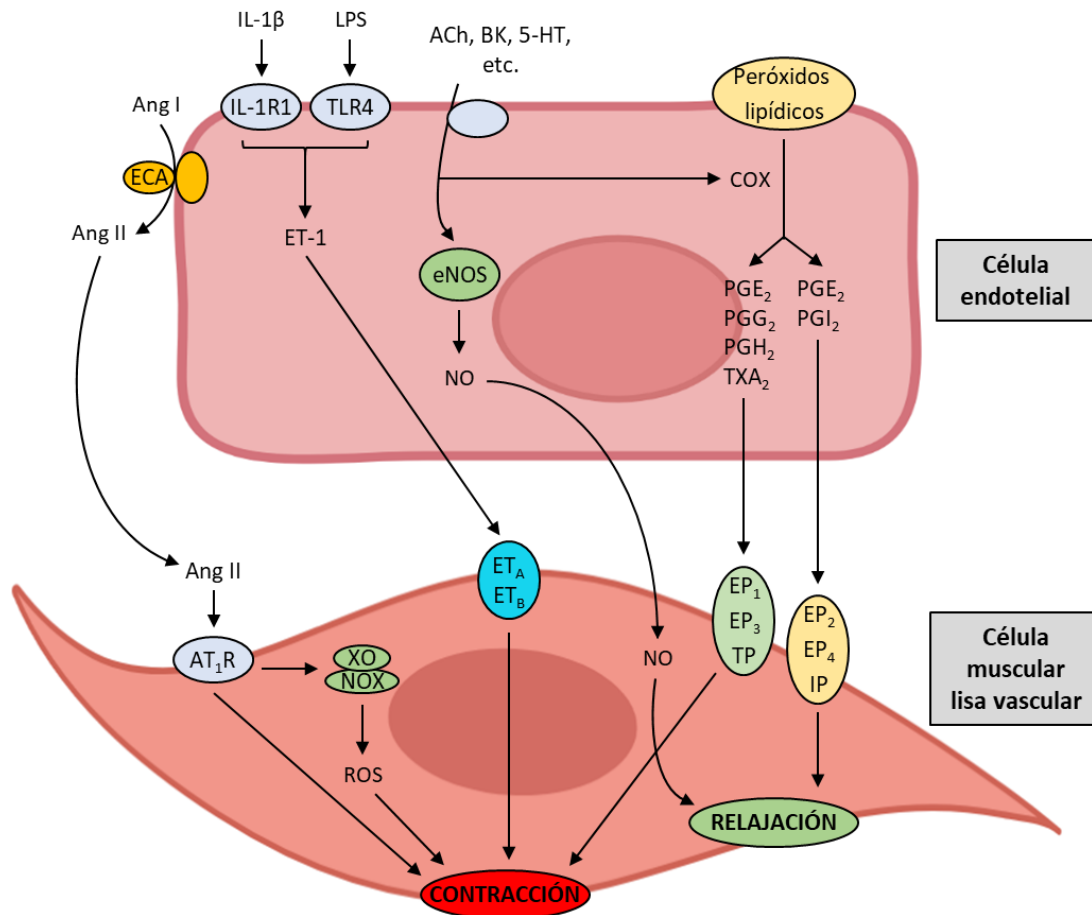
el PVAT solo conferiría resistencia mecánica a los vasos, pero actualmente se sabe que, además, participa activamente en la regulación de la función vascular, ya que libera diferentes moléculas que participan en la regulación del tono vascular e influyen en los procesos de proliferación celular e inflamación (Gao, 2017).

En condiciones fisiológicas el PVAT libera moléculas vasodilatadoras y antiinflamatorias como el óxido nítrico (NO) o la adiponectina, mientras que, en situaciones patológicas, el PVAT puede liberar adipoquinas proinflamatorias como la leptina, citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ , factores de crecimiento como TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante  $\beta$ ) o VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), contribuyendo así a la disfunción vascular. Un PVAT disfuncional se ha asociado a diferentes patologías cardiovasculares como la aterosclerosis, la hipertensión, la diabetes o la obesidad (Guzik *et al.*, 2007; Nosalski and Guzik, 2017; Chang *et al.*, 2020).

## 2. FACTORES QUE REGULAN LA FUNCIÓN VASCULAR

La regulación del tono vascular depende de una compleja interacción entre una gran variedad de estímulos. Estos estímulos pueden ser fuerzas físicas que afectan a la pared vascular (Haga *et al.*, 2007; Krüger-Genge *et al.*, 2019), el sistema nervioso (Fernández-Tresguerres *et al.*, 2020) y mediadores vasoactivos, tanto vasodilatadores como vasoconstrictores, liberados, principalmente, por las células endoteliales y las CMLV (Loh *et al.*, 2018; Krüger-Genge *et al.*, 2019).

El endotelio vascular participa de manera activa en la regulación del tono vascular mediante la producción de mediadores vasoactivos en respuesta a estímulos neuronales, humorales, químicos o mecánicos. Así, las células endoteliales liberan diversas sustancias que actúan sobre las CMLV induciendo vasodilatación, como el NO, la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y el factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF), o que inducen vasoconstricción, como la endotelina-1 (ET-1), el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), la prostaglandina F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) o la angiotensina II (Ang II) (Figura 2). Además, las ROS generadas por las células vasculares también participan en la modulación del tono vascular. En condiciones fisiológicas, la relación entre la liberación de mediadores vasodilatadores y vasoconstrictores por parte de las células vasculares está en equilibrio, lo que permite mantener la homeostasis vascular. Sin embargo, un desequilibrio entre la producción de los mismos puede dar lugar a situaciones patológicas (Loh *et al.*, 2018; Krüger-Genge *et al.*, 2019).



**Figura 2. Mediadores vasoactivos.** Efecto sobre el tono vascular de diversos mediadores liberados por las células endoteliales. ACh: acetilcolina; Ang I/II: angiotensina I/II; AT<sub>1</sub>R: receptor de angiotensina II tipo 1; BK: bradiquinina; COX: ciclooxigenasa; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; EP<sub>1</sub>, 2, 3, 4: receptor de prostaglandina E<sub>2</sub> 1, 2, 3, 4; ET<sub>A</sub>, B: receptores de endotelina A/B; ET-1: endotelina-1; IL-1 $\beta$ : interleuquina-1 $\beta$ ; IL-1R1: receptor de IL-1 tipo 1; IP: receptor de prostaglandina I<sub>2</sub>; LPS: lipopolisacárido bacteriano; NO: óxido nítrico; NOX: NAD(P)H oxidasa; PG: prostaglandinas; ROS: especies reactivas de oxígeno; TLR4: receptor de tipo toll 4; TP: receptor de tromboxano; XO: xantina oxidasa; 5-HT: 5-Hidroxitriptamina. Modificado de Rang *et al.*, 2020. Creada con BioRender.

## 2.1. ÓXIDO NÍTRICO

El NO es uno de los mediadores clave de la relajación vascular. Es un radical libre generado por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir de L-arginina, oxígeno y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato [NAD(P)H], utilizando como cofactores el dinucleótido de flavina adenina (FAD), el mononucleótido de flavina (FMN), la calmodulina (CaM) y la tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>). Existen tres isoformas de la NOS, una isoforma inducible (iNOS) y dos isoformas que se expresan de manera constitutiva, la neuronal (nNOS) y la endotelial (eNOS), siendo la eNOS la isoforma mayoritaria en el sistema vascular. La activación de la eNOS puede deberse a diferentes estímulos entre los que se encuentran las fuerzas mecánicas que ejerce la sangre sobre la pared de los vasos, la acetilcolina, la bradiquinina, la histamina, el estradiol, la Ang II o las citoquinas proinflamatorias (Zhao *et al.*, 2015b; Tejero *et al.*, 2019).

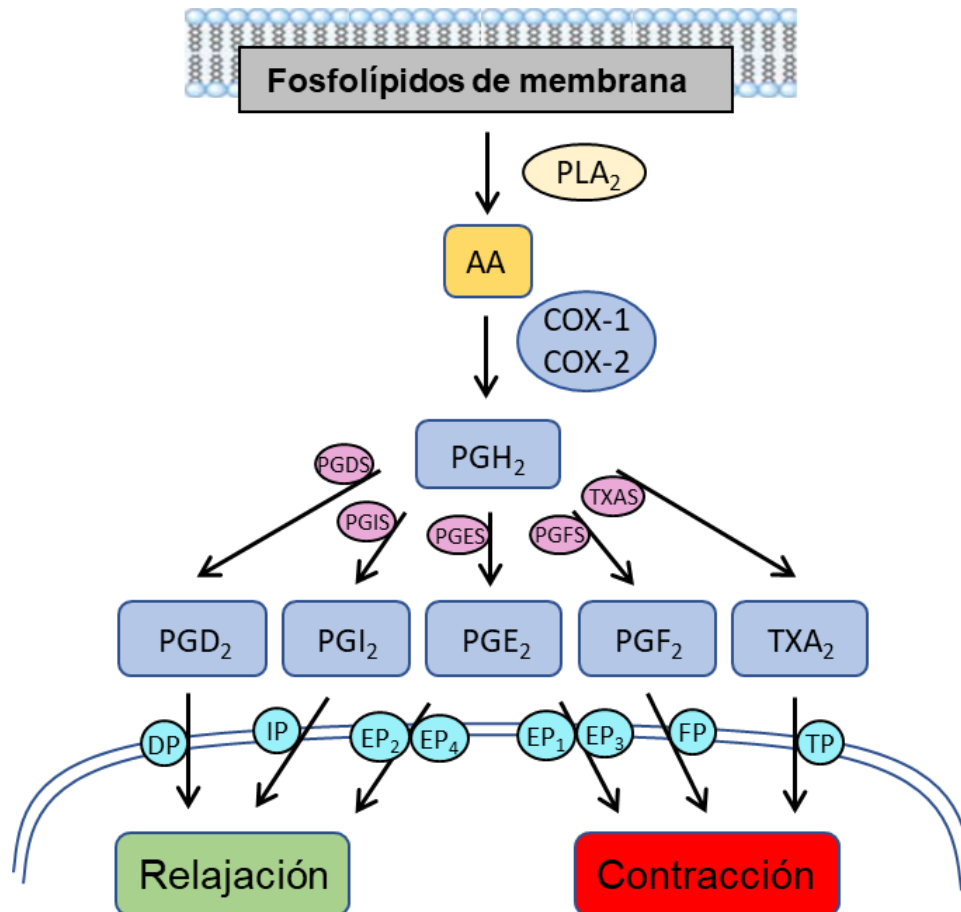
El NO generado en el endotelio por la eNOS difunde hasta las CMLV, donde activa la guanilato ciclasa soluble (GCs), que induce la formación de guanosin monofosfato cíclico (GMPc), dando lugar a vasodilatación (Tousoulis *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2015b). Otras funciones del NO son la inhibición de la agregación plaquetaria, la reducción de la adhesión de los leucocitos y las plaquetas a las paredes de los vasos, la inhibición de la liberación de factores de crecimiento, la inhibición de la inflamación, al reducir la síntesis y la expresión de quimioquinas y citoquinas proinflamatorias, y la inhibición de la proliferación de las CMLV (Tousoulis *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2015b)

En la pared vascular también puede estar presente la iNOS. Esta isoforma se expresa a niveles muy bajos en condiciones fisiológicas y su expresión es inducida por diversos estímulos inflamatorios como IL-1 $\beta$ , Ang II o LPS (Teng *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2013; de Lima *et al.*, 2019). Una vez se expresa, la iNOS empieza a producir NO de manera constante. La inducción de la expresión de la iNOS en las células endoteliales puede contribuir a la disfunción vascular al limitar la biodisponibilidad de BH<sub>4</sub> para la eNOS (Zhao *et al.*, 2015b; Tejero *et al.*, 2019).

## 2.2. PROSTANOIDES

Los prostanoideos son mediadores lipídicos que participan en diversos procesos celulares, entre ellos, la modulación del tono vascular y la agregación plaquetaria. Se sintetizan por acción de las ciclooxigenasas (COX), también conocidas como prostaglandina (PG)-endoperóxido H sintasas (PGHS), a partir del ácido araquidónico (AA) procedente de los fosfolípidos de la membrana celular, el cual es liberado al citosol por acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Una vez en el citosol, la COX cataliza la conversión del AA a prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) que, por acción de prostaglandina sintasas específicas (PGS o TXS), dará lugar a las prostaglandinas (prostaciclina o prostaglandina I<sub>2</sub> - PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) y al tromboxano (TXA<sub>2</sub>). Estos realizan sus funciones a través de la interacción con receptores acoplados a proteínas G (GPCR) específicos denominados IP, EP, DP, FP y TP (Beccacece *et al.*, 2023).

Los prostanoideos tienen diferentes efectos en el sistema cardiovascular. Así, PGI<sub>2</sub> y PGD<sub>2</sub>, a través de sus respectivos receptores IP y DP, inducen la relajación de los vasos; PGI<sub>2</sub>, además, inhibe la activación de las plaquetas. PGE<sub>2</sub> es el prostanoide más abundante en el organismo y puede interactuar con cuatro subtipos de receptores (EP<sub>1</sub>-EP<sub>4</sub>). La interacción con sus receptores EP<sub>1</sub> y EP<sub>3</sub> induce vasoconstricción, mientras que la interacción con sus receptores EP<sub>2</sub> y EP<sub>4</sub> induce vasodilatación. Los receptores EP también están implicados en la agregación plaquetaria, en la proliferación y la migración de las CMLV, en la producción de citoquinas y en la activación de las metaloproteinasas de matriz (MMP). Por su parte, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , a través de su receptor FP, induce vasoconstricción. TXA<sub>2</sub>, a través del receptor TP, induce vasoconstricción y está involucrado también en la agregación plaquetaria, en la inducción de la expresión de moléculas de adhesión y en la infiltración de monocitos/macrófagos (Figura 3) (Hernanz *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2015b; Zhu *et al.*, 2020a; Beccacece *et al.*, 2023).



**Figura 3. Esquema de la ruta de síntesis de los prostanoideos por acción de las ciclooxigenasas y su efecto sobre el tono vascular.** AA: ácido araquidónico; COX: ciclooxigenasa; DP: receptor de PGD<sub>2</sub>; EP 1, 2, 3, 4: receptores de PGE<sub>2</sub> 1, 2, 3, 4, respectivamente; FP: receptor de PGF<sub>2α</sub>; IP: receptor de PGI<sub>2</sub>; PGD<sub>2</sub>, I<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>: prostaglandina D<sub>2</sub>, I<sub>2</sub>, E<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>, respectivamente; PGDS, IS, ES, FS: Prostaglandina sintasas; PGH<sub>2</sub>: prostaglandina H<sub>2</sub>; PLA<sub>2</sub>: fosfolipasa A<sub>2</sub>; TP: receptor de TXA<sub>2</sub>; TXA<sub>2</sub>: tromboxano; TXAS: tromboxano sintasa. Elaboración propia.

Existen tres isoformas de la COX, COX-1, COX-2 y COX-3, siendo las isoformas 1 y 2 las más conocidas, con un 60 % de homología, y COX-3 una variante de COX-1, generada por *splicing* alternativo. COX-1 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de los tejidos y está implicada en el mantenimiento de la homeostasis celular. En el sistema cardiovascular se expresa, principalmente, en las plaquetas, donde da lugar a la formación de TXA<sub>2</sub>, y en el endotelio vascular, donde da lugar a la síntesis de PGI<sub>2</sub>. Aunque COX-1 se expresa de manera constitutiva, sus niveles pueden aumentar en las células endoteliales por acción de factores de crecimiento o estrés mecánico (Mitchell *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2021). Por su parte, COX-2 es una isoforma inducible, regulada por un gen de respuesta temprana, cuya expresión se induce por estímulos inflamatorios y por niveles elevados de ROS. COX-2 regula la producción localizada de prostanoideos e induce, a su vez, un aumento en la producción de ROS, principalmente anión superóxido (Félétoú *et al.*, 2011; Mitchell *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2021). Niveles elevados de COX-2 se relacionan, generalmente, con vasoconstricción y se asocian con diversas patologías cardiovasculares como hipertensión, diabetes o aterosclerosis (Zhao *et al.*, 2021). Más adelante, en el apartado 5.3 de esta introducción, se realiza una revisión más detallada sobre la COX-2.

### 2.3. ENDOTELINA-1

La familia de las endotelinas (ET) está formada por un grupo de péptidos, de los cuales ET-1 es el más abundante y el único presente en la pared vascular, donde es producido, principalmente, por las células endoteliales, aunque también pueden producirlo las CMLV en respuesta a diferentes estímulos (Khimji and Rockey, 2010). La expresión de ET-1 es inducida por estímulos como TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, Ang II, ROS, trombina, bradiquinina e insulina y es inhibida por estrés mecánico, NO o prostaciclina (Khimji and Rockey, 2010; Houde *et al.*, 2016).

ET-1 ejerce sus efectos mediante la interacción con dos tipos de GPCR, el receptor de endotelina A (ET<sub>A</sub>) y el receptor de endotelina B (ET<sub>B</sub>). ET<sub>A</sub> es el receptor mayoritario en las CMLV, donde media respuestas vasoconstrictoras. Además, la activación de este receptor desencadena una respuesta inflamatoria y proliferativa mediante la activación de factores proinflamatorios como AP-1 o NF- $\kappa$ B, diversas quinasas y un incremento en la producción de ROS (Khimji and Rockey, 2010; Houde *et al.*, 2016; Palacios-Ramírez *et al.*, 2019). ET<sub>B</sub> está presente, principalmente, en las células endoteliales, donde, por lo general, media una respuesta vasodilatadora mediante la estimulación de la liberación de NO y prostaciclina (Khimji and Rockey, 2010). ET<sub>B</sub> también está presente, aunque en mucha menor medida, en las CMLV, donde induce vasoconstricción y proliferación celular (Lu *et al.*, 2006; Palacios-Ramírez *et al.*, 2019).

### 2.4. ANGIOTENSINA II

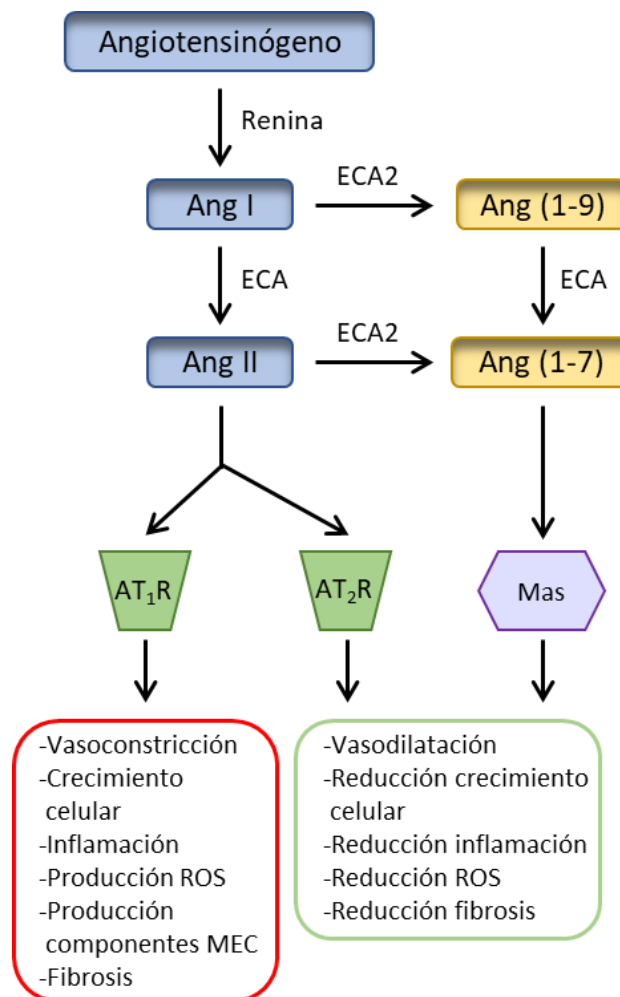
El sistema renina angiotensina (RAS) es un sistema endocrino que tiene como principal péptido efector a la Ang II. La Ang II es el producto final de una cadena de reacciones enzimáticas secuenciales que se inician con el procesamiento del angiotensinógeno que es transformado en angiotensina I (Ang I) por acción de la renina circulante liberada por las células renales; la Ang I, a su vez, es transformada en Ang II por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Forrester *et al.*, 2018). Además de la ECA, existen otras vías por las que la Ang I se puede transformar en Ang II (Montezano *et al.*, 2014; Verma *et al.*, 2021). Sobre la Ang también puede actuar la enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA2), que cataliza la formación de los péptidos Ang (1-9) y Ang (1-7) a partir de Ang I y Ang II, respectivamente. Tanto el péptido Ang (1-9) como el péptido Ang (1-7), este último a través de la interacción con el receptor específico Mas, inducen efectos vasodilatadores, antiproliferativos y antiinflamatorios (Montezano *et al.*, 2014; Cantero-Navarro *et al.*, 2021). Las funciones principales del RAS son la regulación de la presión arterial, de la concentración de sodio en el organismo, del volumen extracelular y de la función vascular (Montezano *et al.*, 2014).

Ang II media su acción a través de la interacción con dos tipos de GPCR: el receptor de angiotensina tipo 1 (AT<sub>1</sub>R) y el receptor de angiotensina tipo 2 (AT<sub>2</sub>R). AT<sub>1</sub>R es el receptor mayoritario y en el sistema cardiovascular se expresa principalmente en las CMLV, aunque también está presente en las células endoteliales. Cuando Ang II interacciona con AT<sub>1</sub>R activa múltiples vías de señalización celular, que incluyen la activación de fosfolipasas C, D, A (PLC, PLD, PLA), proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y canales de Ca<sup>2+</sup>; también induce la producción de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o TGF- $\beta$ , de citoquinas como TNF- $\alpha$ , interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) o IL, y de ROS mediante la activación de la NAD(P)H oxidasa, y aumenta la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1 (Forrester *et al.*, 2018; Cantero-



Navarro *et al.*, 2021; Verma *et al.*, 2021). Así, la acción de Ang II a través de este receptor induce vasoconstricción y un aumento de la migración y proliferación celular, la expresión de genes proinflamatorios, la producción de ROS, la producción de componentes de la MEC y la fibrosis (Montezano *et al.*, 2014; Forrester *et al.*, 2018). Por todas estas acciones, la activación de AT<sub>1</sub>R está implicada en enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, la aterosclerosis, el infarto de miocardio o la diabetes, donde se han encontrado niveles elevados de Ang II (Forrester *et al.*, 2018; Verma *et al.*, 2021).

La expresión de AT<sub>2</sub>R en condiciones fisiológicas es baja, pero se incrementa en condiciones patológicas. Cuando Ang II interacciona con AT<sub>2</sub>R, induce, generalmente, vasodilatación mediante la activación de la eNOS y la consecuente producción de NO (Verma *et al.*, 2021). También induce apoptosis, inactivación de las MAPK, supresión de la inflamación y de la producción de ROS, inhibición del crecimiento celular y efectos antifibróticos (Forrester *et al.*, 2018; Cantero-Navarro *et al.*, 2021) (Figura 4).

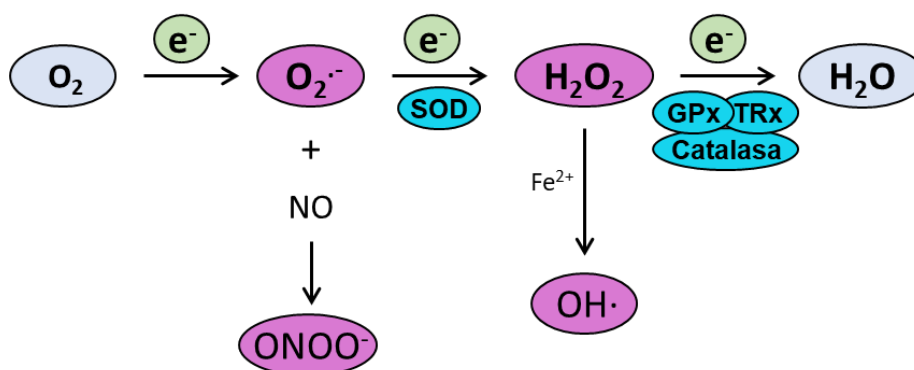


**Figura 4. Esquema del sistema renina angiotensina y principales efectos de angiotensina II (Ang II).** Ang (1-9), (1-7): angiotensina 1-9, 1-7; AT<sub>1</sub>R: receptor de angiotensina II tipo 1; AT<sub>2</sub>R: receptor de angiotensina II tipo 2; ECA, enzima convertidora de angiotensina; Mas: receptor de Ang (1-7). Elaboración propia.

## 2.5. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las **ROS** son moléculas reactivas que se producen como resultado del metabolismo del oxígeno ( $O_2$ ). Son producidas por todos los tipos celulares presentes en la pared vascular, incluyendo las células endoteliales, las CMLV y los fibroblastos, principalmente por acción de la enzima NAD(P)H oxidasa, la xantina oxidasa (XO) y la cadena de transporte electrónico mitocondrial, como veremos posteriormente (Brown and Griendling, 2015; Griendling *et al.*, 2021).

Entre las especies reactivas de oxígeno cabe destacar el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno o agua oxigenada ( $H_2O_2$ ), el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ). Las ROS se generan como productos intermedios en las reacciones redox que generan  $H_2O$  a partir del  $O_2$  (Figura 5) (Brown and Griendling, 2015). El  $O_2^{\cdot-}$  es muy reactivo, tiene una vida media muy corta y debido a su carga no difunde a través de las membranas biológicas, salvo, en algunos casos, a través de canales iónicos. Este anión se transforma rápidamente en  $H_2O_2$  por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Existen tres isoformas de SOD, SOD1 o Cu/Zn-SOD, que se expresa en el citosol, SOD2 o Mn-SOD2, que se expresa en las mitocondrias, y SOD3 o EC-SOD, que se expresa en el exterior celular. Todas ellas catalizan la dismutación de dos moléculas de  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$ . El  $H_2O_2$  también puede formarse por acción de la NAD(P)H oxidasa y por acción de la XO. El  $H_2O_2$  es más estable, tiene una vida media mayor que el  $O_2^{\cdot-}$  y, además, puede atravesar las membranas biológicas gracias a las acuaporinas presentes en las mismas. Es rápidamente metabolizado a  $H_2O$  por acción de diversas enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa, o el sistema tiorredoxina (TRx). En presencia de  $Fe^{2+}$ , el  $H_2O_2$  puede convertirse en  $OH\cdot$ , altamente reactivo e inducir daño molecular. Por otro lado, el  $ONOO^-$  se origina por la reacción del  $O_2^{\cdot-}$  con el NO e induce alteraciones en la estructura y la función de las proteínas (Brown and Griendling, 2015; Dubois-Deruy *et al.*, 2020) (Figura 5).



**Figura 5. Generación de las diferentes ROS a partir de la reducción secuencial del oxígeno ( $O_2$ ).**  $O_2^{\cdot-}$ : anión superóxido;  $ONOO^-$ : peroxinitrito;  $OH\cdot$ : radical hidroxilo; SOD: superóxido dismutasa; GPx: glutatión peroxidasa; TRx: tiorredoxina;  $H_2O_2$ : peróxido de hidrógeno;  $H_2O$ : agua. Adaptada de Dubois-Deruy *et al.*, 2020.

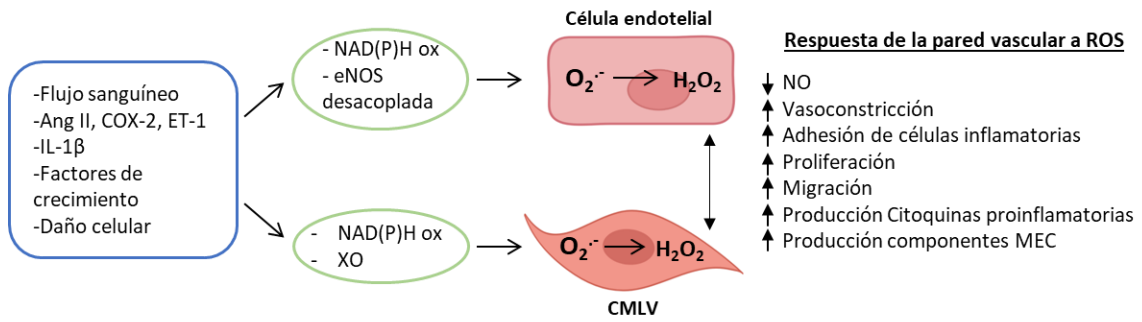
En condiciones fisiológicas, las ROS actúan como mensajeros secundarios y participan en la regulación de numerosas vías de señalización. Algunos de los procesos biológicos regulados por las ROS son la respuesta inmune, el crecimiento, la diferenciación, la migración y la proliferación celular, la producción de componentes de la MEC, la apoptosis y la angiogénesis, lo que las hace necesarias para el correcto funcionamiento de las células. Las ROS también pueden modificar

postraduccionalmente múltiples proteínas como quinasas [MAPK, proteína quinasa B (Akt/PKB)], factores de transcripción (NF- $\kappa$ B, AP-1 o Nrf2), MMP o lipoproteínas (LDL). Además, las ROS son moléculas de señalización a través de las cuales otros mediadores vasoactivos como los prostanoídes, la ET-1 o la Ang II ejercen sus efectos celulares (Dröge, 2002; Montezano and Touyz, 2012; Dubois-Deruy *et al.*, 2020; Touyz *et al.*, 2020).

Las ROS también tienen un papel importante en la regulación del tono vascular, de manera que el  $O_2^{\cdot -}$  induce vasoconstricción, ya sea a través de su efecto directo o a través de la reducción de la biodisponibilidad de NO al interactuar con este para formar ONOO $^-$ . Por su parte,  $H_2O_2$  puede tener efectos vasodilatadores o vasoconstrictores en función del lecho vascular (Brown and Griendling, 2015). Así, por un lado, se ha descrito que el  $H_2O_2$  induce vasoconstricción en arterias mesentéricas de resistencia, probablemente a través del aumento en la producción de  $O_2^{\cdot -}$  (García-Redondo *et al.*, 2009a; García-Redondo *et al.*, 2009b); por otro lado, se ha descrito que el  $H_2O_2$  puede inducir un aumento en la producción de NO por parte de la eNOS, lo que contribuye a la vasodilatación en arterias coronarias y en arterias cerebrales (Miura *et al.*, 2003; Paravicini *et al.*, 2006).

Las ROS son detoxificadas por sistemas de defensa antioxidante, que pueden ser de carácter enzimático (GPx, SOD, catalasa o TRx) o de carácter no enzimático (bilirrubina, tocoferoles o el ácido ascórbico) (Dubois-Deruy *et al.*, 2020). Si se altera su equilibrio, bien por un exceso en la producción de ROS o por una deficiencia en los mecanismos de detoxificación, se produce lo que se denomina **estrés oxidativo**. Niveles elevados de ROS de manera crónica generan daños tisulares y tienen un importante papel en la desregulación de la inflamación, la hipertrofia, la migración y la proliferación, la peroxidación lipídica, la apoptosis, la fibrosis o la angiogénesis, procesos todos ellos que participan en el remodelado vascular y en la disfunción endotelial, y que pueden contribuir a la aparición de patologías cardiovasculares (Montezano and Touyz, 2012; García-Redondo *et al.*, 2016; Marchio *et al.*, 2019; Shaito *et al.*, 2022) y otras patologías como enfermedades neurodegenerativas (Singh *et al.*, 2019), cáncer (Moloney and Cotter, 2018), enfermedades renales (Daenen *et al.*, 2019) o enfermedades metabólicas (Incalza *et al.*, 2018) (Figura 6).

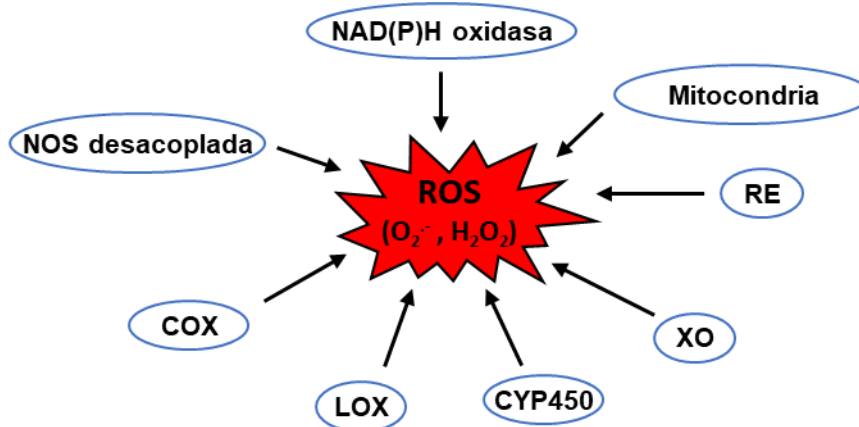
Mediadores proinflamatorios como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LPS o Ang II, y factores de crecimiento como VEGF, entre otros, pueden inducir un aumento en la producción de ROS generando estrés oxidativo (Figura 6). El incremento en la producción de ROS puede dar lugar a su vez a la activación de otros mediadores proinflamatorios como los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1, las MAPK (la proteína quinasa el extremo N-terminal de c-Jun, JNK, la proteína quinasa p38 y la quinasa regulada por señales extracelulares, ERK), COX-2, moléculas de adhesión celular y factores de crecimiento, entre otros. Esto genera un ciclo de retroalimentación positiva entre la inflamación y el estrés oxidativo que contribuye al desarrollo y la progresión de patologías cardiovasculares (Marchio *et al.*, 2019; Senoner and Dichtl, 2019; Krzemińska *et al.*, 2022). De hecho, diversos estudios utilizando tanto antioxidantes como inhibidores farmacológicos de las diferentes fuentes de ROS, han demostrado que la reducción del estrés oxidativo es beneficiosa y mejora las alteraciones vasculares asociadas al desarrollo de patologías cardiovasculares (Malekmohammad *et al.*, 2019; Griendling *et al.*, 2021; Amponsah-Offeh *et al.*, 2023).



**Figura 6. Efecto del estrés oxidativo en la pared vascular.** Ang II: angiotensina II; CMLV: célula muscular lisa vascular; COX-2: ciclooxigenasa 2; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; ET-1: endotelina-1; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno; IL-1β: interleuquina-1β; NAD(P)H ox: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa; NO: óxido nítrico. O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: anión superóxido; XO: xantina oxidasa. Elaboración propia. Creada con BioRender.

### 2.5.1. Fuentes de producción de ROS

En el sistema cardiovascular, las ROS pueden ser generadas por diferentes sistemas enzimáticos, entre los cuales cabe destacar la NAD(P)H oxidasa (NOX), la XO, la eNOS desacoplada, la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias y la COX-2 (Brown and Griendling, 2015; Dubois-Deruy *et al.*, 2020) (Figura 7).

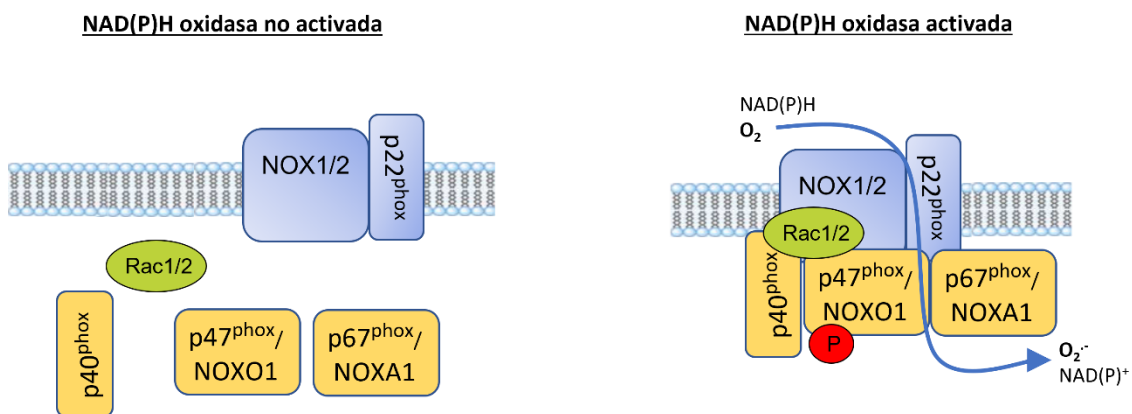


**Figura 7. Principales fuentes de producción de ROS.** COX: ciclooxigenasa; CYP450: citocromo P450; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno; LOX: lipoxigenasa; NOS: óxido nítrico sintasa; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: anión superóxido; RE: retículo endoplasmático; XO: xantina oxidasa. Elaboración propia.

#### ▪ NAD(P)H OXIDASA

Las NAD(P)H oxidasas presentes en la pared de los vasos sanguíneos son la principal fuente de ROS en el sistema cardiovascular. La NAD(P)H oxidasa es un complejo enzimático presente en las diferentes membranas de la célula, que utiliza NADH/NAD(P)H como donante de electrones para reducir el O<sub>2</sub> y generar O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, aunque también puede generar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Actualmente hay descritas siete isoformas de las NAD(P)H oxidasa: NOX1-5 y DUOX1-2, siendo NOX2 la primera que se describió (Chocry and Leloup, 2020). La localización celular de las isoformas de esta enzima puede variar (García-Redondo *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020).

El complejo enzimático de la NAD(P)H oxidasa está formado por las subunidades citosólicas p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, Rac1/2, el organizador de NOX1 (NOXO1) y el activador de NOX1 (NOXA1), que se unen a las subunidades transmembrana p22<sup>phox</sup>, subunidad estabilizadora de membrana, y gp91<sup>phox</sup> (NOX1/2), subunidad catalítica, para formar la enzima funcional. El complejo formado por las dos subunidades transmembrana en las isoformas NOX1-4, se conoce como citocromo b558. Las isoformas NOX5 y DUOX1-2 no requieren p22<sup>phox</sup>, están formadas únicamente por una subunidad transmembrana (Bedard and Krause, 2007; Chocry and Leloup, 2020). Una diferencia entre las subunidades catalíticas que conforman las diferentes isoformas de la enzima reside en las ROS que producen: NOX1, NOX2, NOX3 y NOX5 producen O<sub>2</sub><sup>-</sup>, mientras que NOX4, DUOX1 y DUOX2 producen, preferentemente, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tras la estimulación con agonistas, la subunidad citosólica p47<sup>phox</sup> se fosforila y sufre un cambio conformacional que le permite unirse a la subunidad transmembrana p22<sup>phox</sup>/NOX1/2. A continuación, se produce el reclutamiento de las subunidades p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> y Rac1/2 al complejo, lo que termina de activar la enzima NAD(P)H oxidasa (Bedard and Krause, 2007; Chocry and Leloup, 2020) (Figura 8).



**Figura 8. Esquema representativo del complejo de la enzima NAD(P)H oxidasa no activada y activada.** Adaptada de Bedard and Krause, 2007.

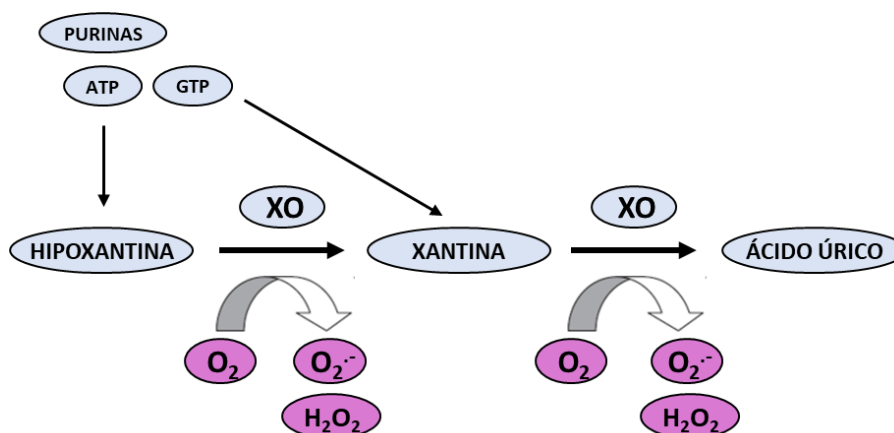
Las isoformas de la NAD(P)H oxidasa expresadas en el sistema cardiovascular son NOX1, NOX2, NOX4 y NOX5, esta última únicamente en humanos. Su localización en la pared vascular varía en función del tipo celular, de manera que en las células endoteliales se expresa principalmente NOX2, aunque también pueden expresarse las otras isoformas, y en las CMLV se expresan principalmente NOX1 y NOX4, y en menor medida NOX5 (Zhang *et al.*, 2020).

La activación de las NAD(P)H oxidasas tiene lugar por una gran cantidad de estímulos, entre los que cabe destacar factores de crecimiento como TGF- $\beta$ , PDGF o EGF, citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$  y agonistas de GPCR como Ang II o ET-1, entre otros (García-Redondo *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020). Así, en las CMLV NOX-1 aumenta su expresión y actividad por la estimulación con Ang II, ET-1, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , trombina o PDGF (Manea *et al.*, 2010; Maheswaranathan *et al.*, 2011; Jagadeesha *et al.*, 2012; Martín *et al.*, 2012; Aguado *et al.*, 2016; Palacios-Ramírez *et al.*, 2019). Por su parte, NOX-2 puede ser activada por Ang II en células endoteliales (Bendall *et al.*, 2007), mientras que NOX4 puede ser inducida en CMLV, además de por Ang II (Wingler *et al.*, 2001; Briones *et al.*, 2011), por hipoxia (Diebold *et al.*, 2010).

Se han descrito niveles elevados de las diferentes isoformas de las NOX en varias patologías cardiovasculares como la aterosclerosis, la hipertensión o la diabetes. Las ROS derivadas de la acción de estas enzimas, principalmente de NOX1 y NOX2, contribuyen al estrés oxidativo, la inflamación vascular, la disfunción endotelial y el remodelado vascular característico de estas patologías (Dikalova *et al.*, 2005; Murdoch *et al.*, 2011; Sheenan *et al.*, 2011; Gray *et al.*, 2013). Por otro lado, hay datos que sugieren que NOX4 puede tener un papel vasoprotector en determinadas situaciones por su capacidad de producir  $H_2O_2$ , que actúa, generalmente, como factor vasodilatador, aunque esta isoforma puede también estar implicada en el remodelado vascular en condiciones patológicas como hipertensión o diabetes (García-Redondo *et al.*, 2016; Viridis, 2016; Zhang *et al.*, 2020). En este sentido, se ha descrito que NOX1 y NOX2, pero no NOX4, contribuyen al aumento en la producción de ROS y a la inducción de disfunción endotelial en aortas de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) (Wind *et al.*, 2010) y en arterias renales de ratas obesas (Muñoz *et al.*, 2020). NOX1 también está implicada en la disfunción vascular de la arteria pudenda interna que se observa en diabetes (Alves-Lopes *et al.*, 2016). Por su parte, la delección de NOX4 potencia la disfunción endotelial inducida por Ang II en aortas de ratón (Schröder *et al.*, 2012). Adicionalmente, se ha descrito que NOX1 y NOX2, a través de la producción de  $O_2^{\cdot-}$ , están implicadas en el desarrollo y la progresión de la lesión aterosclerótica (Judkins *et al.*, 2010; Gray *et al.*, 2013), mientras que NOX4, a través de la producción de  $H_2O_2$ , posee un efecto protector vascular frente al desarrollo de esta patología (Gray *et al.*, 2016).

#### ▪ XANTINA OXIDORREDUCTASA

La xantina oxidorreductasa (XOR) es una enzima importante en la degradación de las purinas, pues cataliza la conversión de hipoxantina en xantina y, a continuación, de esta en ácido úrico. La XOR pertenece a la familia de las molibdoflavoenzimas y tiene como cofactores una molibdo proteína (Mo-Co), dos centros hierro-azufre ( $Fe_2-S_2$ ) y un grupo FAD. Existen dos formas interconvertibles de la XOR: la xantina deshidrogenasa (XDH) y la XO (Berry and Hare, 2004; Nishino *et al.*, 2008). En condiciones fisiológicas, la forma predominante es la XDH, que reduce el  $NAD^+$  a NADH. La XO aparece como forma predominante en condiciones de estrés oxidativo o inflamación y utiliza el  $O_2$  como aceptor de electrones, dando lugar a la producción de ROS, principalmente  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  (Incalza *et al.*, 2018) (Figura 9).



**Figura 9. Esquema representativo de la reacción mediada por la xantina oxidasa.**  $H_2O_2$ : peróxido de hidrógeno;  $O_2$ : oxígeno molecular;  $O_2^{\cdot-}$ : anión superóxido; XO: xantina oxidasa. Elaboración propia.

La XO es una fuente importante de estrés oxidativo en el sistema cardiovascular, aunque se expresa de forma mayoritaria en el hígado (Berry and Hare, 2004). La Ang II, las citoquinas proinflamatorias y la hipoxia inducen un aumento en la expresión de esta enzima (Berry and Hare, 2004; Landmesser *et al.*, 2007). Se ha descrito, además, que un aumento del estrés oxidativo debido, por ejemplo, a la incrementada actividad de la NAD(P)H, da lugar a la activación de la XO, produciendo aún más cantidad de ROS (Landmesser *et al.*, 2007). La actividad reductasa de la XO resulta en niveles elevados de ácido úrico y ROS, los cuales se asocian con el daño oxidativo en la pared vascular, con los cambios vasculares inflamatorios y proliferativos y con el desarrollo de patologías cardiovasculares como diabetes, aterosclerosis e hipertensión (Doehner and Landmesser, 2011; Schuchardt *et al.*, 2017; Incalza *et al.*, 2018).

#### ▪ ÓXIDO NÍTRICO SINTASA DESACOPLADA

Como ya se ha comentado, la NOS es la enzima que, a partir de L-arginina, genera NO. El cofactor BH<sub>4</sub>, que deriva del trifosfato de guanosa (GTP) y es generado por la acción de la enzima GTP ciclohidrolasa-1 (GTPCH-1), es esencial para el correcto funcionamiento de las NOS, ya que aumenta la afinidad de estas por su sustrato, participa en la transferencia de electrones y estabiliza la formación de dímeros de NOS (Zhao *et al.*, 2015b). Por ello, cuando los niveles de BH<sub>4</sub> se reducen, se produce un desacoplamiento del dímero funcional de la enzima y se generan monómeros de NOS, lo que hace que se altere la actividad catalítica, dando lugar a lo que se conoce como NOS desacoplada. La NOS desacoplada no es capaz de llevar a cabo de manera correcta la reducción del O<sub>2</sub>, y genera O<sub>2</sub><sup>·-</sup> en lugar de NO, lo que contribuye al aumento del estrés oxidativo (Zhao *et al.*, 2015b).

Uno de los factores que afectan a la biodisponibilidad de BH<sub>4</sub> es el propio estrés oxidativo, generado, principalmente, por acción de la NAD(P)H oxidasa. Así, el O<sub>2</sub><sup>·-</sup> producido por esta enzima interacciona con el NO dando lugar a la formación de ONOO<sup>-</sup>, que oxida BH<sub>4</sub> a BH<sub>2</sub>, desestabilizando la NOS (Landmesser *et al.*, 2003). Otro de los factores implicados en la reducción de los niveles de BH<sub>4</sub> es la Ang II, que inhibe la GTPCH-1 (Zhang *et al.*, 2012b).

En resumen, la reducción en los niveles de BH<sub>4</sub> da lugar al desacoplamiento de la eNOS y contribuye a la disminución de los niveles de NO, al aumento de la producción de ROS y a la disfunción endotelial. Niveles elevados de eNOS desacoplada se han descrito en modelos de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, la aterosclerosis o la diabetes (Förstermann and Li, 2011; Li and Förstermann, 2013; Youn *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2017).

#### ▪ MITOCONDRIAS

Otra fuente celular muy importante de ROS son las **mitocondrias**. Estas producen energía en forma de ATP mediante un proceso que acopla la fosforilación oxidativa y la cadena de transporte de electrones a través de cinco complejos proteicos (complejos I-IV y complejo V o ATP sintasa), la coenzima Q y el citocromo C. El flujo de electrones a través de los diferentes complejos induce la liberación de protones al espacio intermembrana de las mitocondrias, lo que genera un gradiente electroquímico que permite, posteriormente, acoplar el restablecimiento de ese gradiente a la síntesis de ATP. En este proceso, el 1-2% del O<sub>2</sub> total se reduce a O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, principalmente en los complejos I y III (Tang *et al.*, 2014b).

Las ROS mitocondriales, cuando se producen en concentraciones fisiológicas, participan en la señalización celular regulando el crecimiento y la diferenciación celular, la apoptosis y la autofagia (Tang *et al.*, 2014b; Incalza *et al.*, 2018). Sin embargo, cuando hay un daño mitocondrial, generalmente relacionado con una disminución en la producción de ATP y una generación de niveles elevados de ROS, se produce la activación de vías inflamatorias. Se ha descrito que el daño mitocondrial se traduce en disfunción endotelial, contribuyendo así a la patogénesis de enfermedades cardiovasculares como hipertensión y aterosclerosis (Dikalova *et al.*, 2010; Kattoor *et al.*, 2017). Uno de los mecanismos por los cuales las ROS mitocondriales inducen disfunción endotelial viene determinado por su capacidad para inducir el desacoplamiento de la eNOS (Topal *et al.*, 2006) o por la activación de la NAD(P)H oxidasa (Martínez-Revelles *et al.*, 2013; Nazarewicz *et al.*, 2013), generando así niveles aún más elevados de ROS.

#### ▪ OTRAS FUENTES DE ROS

Estímulos inflamatorios como el LPS, IL-1 $\beta$ , Ang II o ET-1, inducen la expresión de **COX-2** a nivel vascular, en muchos casos, por mecanismos en los que participan las ROS (Hernanz *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2012; Pérez-Girón *et al.*, 2014; Palacios-Ramírez *et al.*, 2019). Además, la COX-2 puede provocar la producción de más ROS, generalmente a través de mecanismos que implican un aumento en los niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup>; así, a través de su actividad peroxidasa puede oxidar NAD(P)H generando O<sub>2</sub><sup>-</sup> a la vez que produce prostaglandinas (Wolin, 2000; Wu *et al.*, 2011; Viridis *et al.*, 2013; Hernanz *et al.*, 2014; Jurk *et al.*, 2014; Kim and Shim, 2016). Por otra parte, los prostanoides derivados de COX-2 también pueden estimular la producción de ROS por otras fuentes celulares. En este sentido, se ha descrito que la inhibición o la supresión de COX-2 conduce a una disminución del estrés oxidativo vascular, asociado, principalmente, a una reducción en la actividad y/o expresión de la NAD(P)H oxidasa (Féléto *et al.*, 2011; Hernanz *et al.*, 2014).

El **retículo endoplasmático (RE)**, un orgánulo multifuncional que regula el plegamiento de las proteínas, es también una fuente importante de ROS en el sistema cardiovascular. Durante dicho plegamiento se pueden producir O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; si hay una alteración en el RE que hace que su capacidad para plegar y procesar las proteínas de nueva síntesis se vea comprometida, se puede generar lo que se conoce como estrés del RE (Hernanz *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2021). Alteraciones metabólicas, dislipidemia, inflamación o el propio estrés oxidativo, pueden dar lugar a estrés del RE (Ren *et al.*, 2021). Una de las fuentes de estrés oxidativo del RE son las NAD(P)H oxidasas, concretamente la NOX2 y NOX4, que se encuentran presentes en la membrana interna del mismo (Hernanz *et al.*, 2014; Ochoa *et al.*, 2018). Además, el estrés oxidativo del RE puede estimular la producción de ROS por la mitocondria, que se encuentra estrechamente relacionada con este. Cuando se produce estrés del RE se liberan cantidades más elevadas de lo normal de calcio, el cual se transloca a la mitocondria produciendo despolarización de la membrana mitocondrial dando lugar a alteraciones en la cadena de transporte de electrones, e incrementando así la producción de ROS (Ochoa *et al.*, 2018).

Las ROS también pueden generarse como subproducto durante el paso de oxidación del ácido araquidónico por el **citocromo P450** (Sato *et al.*, 2011) y por las **lipoxigenasas** (Cho *et al.*, 2011). La oxidación del AA por las lipoxigenasas da lugar a la generación de hidroperóxidos, que pueden



ser posteriormente reducidos a hidróxidos. Además, se ha visto que las lipoxigenasas producen ROS a través de la activación de las NOX (Cho *et al.*, 2011; Cervantes-Gracia *et al.*, 2017).

### 3. ALTERACIONES DE LA PARED VASCULAR

Las enfermedades cardiovasculares, en general, cursan con alteraciones funcionales, estructurales y mecánicas en los vasos sanguíneos. Entre las alteraciones estructurales y mecánicas de la pared vascular, se encuentran el remodelado y el incremento de la rigidez vascular, y dentro de las alteraciones funcionales destaca la disfunción endotelial. Algunos factores asociados al desarrollo de alteraciones en la pared vascular son los cambios en el flujo sanguíneo, el aumento en la producción y secreción de mediadores proinflamatorios y el estrés oxidativo (Touyz and Montezano, 2015).

#### 3.1. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

Como hemos comentado, las células endoteliales producen una gran variedad de factores que participan en la regulación del tono vascular, en la adhesión celular, en la agregación plaquetaria, en la migración y la proliferación de las CMLV, en la inflamación y en el estrés oxidativo de la pared vascular, lo que las hace esenciales para el mantenimiento de la homeostasis vascular. Además, el endotelio participa en la defensa del organismo frente a microorganismos patógenos o daños (Konukoglu and Uzun, 2016; Xu *et al.*, 2021). La **disfunción endotelial** se define como una reducida vasodilatación dependiente de endotelio originada por el desequilibrio entre la producción y/o la biodisponibilidad de factores vasodilatadores y vasoconstrictores, que va acompañada por la activación proinflamatoria y protrombótica del endotelio (Xu *et al.*, 2021).

Alteraciones hemodinámicas (alteraciones en las fuerzas mecánicas generadas por el flujo sanguíneo que circula por el interior de los vasos), un metabolismo lipídico alterado, el estrés oxidativo y la inflamación, son factores críticos que pueden a su vez alterar la función de las células endoteliales, dando lugar a la aparición de disfunción endotelial y contribuyendo así al desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, la aterosclerosis, la diabetes o la obesidad (Gimbrone and García-Cardena, 2016; Konukoglu and Uzun, 2016; Shi and Vanhoutte, 2017). Además, la disfunción endotelial es un marcador pronóstico de eventos cardiovasculares en pacientes con enfermedades cardiovasculares (Ambrosino *et al.*, 2022).

La disfunción endotelial se caracteriza principalmente por una reducción en la liberación y/o en la biodisponibilidad de NO, directamente asociada esta última al aumento en la producción de  $O_2^{\cdot-}$  (Landmesser *et al.*, 2003; Brown and Griendling, 2015; Zhang *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2021). Como hemos comentado previamente, la formación de ONOO<sup>-</sup> por la interacción del  $O_2^{\cdot-}$  y el NO oxida al cofactor BH<sub>4</sub> e induce el desacoplamiento de la eNOS, lo que provoca la producción de más  $O_2^{\cdot-}$ . En este sentido, alteraciones en la actividad de la eNOS se han descrito en varias patologías cardiovasculares como aterosclerosis e hipertensión (Gliozzi *et al.*, 2019; Griendling *et al.*, 2021). Además, el tratamiento farmacológico con suplementos de BH<sub>4</sub> mejora la disfunción endotelial en pacientes diabéticos, hipertensos o con hipercolesterolemia (Stroes *et al.*, 1997; Heitzer *et al.*, 2000; Higashi *et al.*, 2002).

También los prostanoideos vasoconstrictores derivados de COX-1 o COX-2 son mediadores responsables de la disfunción endotelial observada en diversas patologías cardiovasculares, en muchos casos asociada a un aumento en la expresión de COX-2 (Widlansky *et al.*, 2003; Miyata *et al.*, 2013; Muñoz *et al.*, 2015; de Oliveira *et al.*, 2021). Como se ha comentado anteriormente, el estrés oxidativo actúa como inductor de COX-2, aumentando la producción de prostanoideos y de más ROS. Este círculo de retroalimentación positiva está estrechamente relacionado con patologías cardiovasculares (Féléto *et al.*, 2011; Martínez-Revelles *et al.*, 2013; Hernanz *et al.*, 2014).

La disfunción endotelial favorece, a su vez, la inflamación vascular al inducir la producción y secreción de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión vascular (VCAM-1), la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1), MCP-1, citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento, ROS y agentes vasoconstrictores como Ang II, ET-1 y TXA<sub>2</sub>, las cuales también estimulan la producción de ROS (Konukoglu and Uzun, 2016; Xu *et al.*, 2021). Además, mediadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$  son capaces de estimular a las células endoteliales induciendo la secreción por parte de estas de más mediadores proinflamatorios y de ROS, contribuyendo así a la disfunción endotelial. Todo esto promueve la atracción de células del sistema inmune, la migración y proliferación de las CMLV y genera un estado de estrés oxidativo y de inflamación (Konukoglu and Uzun, 2016; Xu *et al.*, 2021).

### 3.2. REMODELADO VASCULAR

El **remodelado vascular** se refiere a cambios en la estructura de la pared de los vasos sanguíneos que se generan en respuesta a lesiones, envejecimiento y a diversas enfermedades, con el fin de mantener un diámetro adecuado del lumen y una adecuada resistencia vascular. Este proceso, en el que se producen modificaciones en el grosor de la pared vascular y en el diámetro de la luz, es inicialmente adaptativo, pero puede convertirse en patológico e irreversible en caso de alteración sostenida (Jaminon *et al.*, 2019; Xia *et al.*, 2023).

El remodelado vascular es un proceso sensible a estrés oxidativo, aunque también puede ser inducido por factores de crecimiento, citoquinas proinflamatorias, mediadores vasoactivos y estímulos hemodinámicos. Alteraciones en la estructura y la función de las CMLV, que pueden ser causadas por los factores anteriormente descritos, provocan un aumento en la migración y la proliferación celular, favoreciendo el desarrollo de hipertrofia y de remodelado vascular. Además, cambios en la composición de la MEC, como la degradación de alguno de sus componentes por acción de las MMP, también contribuyen al remodelado (Renna *et al.*, 2013a; García-Redondo *et al.*, 2016; Jaminon *et al.*, 2019; Xia *et al.*, 2023).

El remodelado vascular puede producirse con o sin crecimiento celular. En función de esto, el remodelado se puede clasificar en remodelado hipertrófico, generalmente asociado con un aumento en el grosor de la capa media debido a un aumento en el crecimiento o en el número de células y/o a un incremento en la producción de componentes de la MEC, que conlleva un aumento en la relación media/luz; remodelado hipotrófico, asociado a una disminución en el número de células presentes en la pared vascular, que puede deberse a un aumento en la apoptosis celular, y que conlleva una disminución de la relación media/luz; y remodelado eutrófico, que se caracteriza por la reordenación de los componentes de la pared vascular, pero

que no conlleva ni aumento ni disminución en el número de células, aunque se produce un aumento en el grosor de la media y de la relación media/luz. A su vez, el remodelado vascular puede producirse hacia dentro (*inward remodeling*), caracterizado por una disminución del diámetro de los vasos, hacia fuera (*outward remodeling*), con un aumento del diámetro de los vasos, o compensado, asociado a vasos de tamaños similares (Laurent and Boutouyrie, 2015; Touyz and Montezano, 2015; García-Redondo *et al.*, 2016). Las modificaciones en el grosor de la pared vascular y en la relación media/luz que se producen en el remodelado vascular son factores pronóstico de eventos cardiovasculares en patologías como la hipertensión, enfermedades renales o el cáncer (Rizzoni and Agabiti-Rosei, 2012; Chen *et al.*, 2018; Tasoulas *et al.*, 2018).

Dependiendo del lecho vascular y de la patología, el remodelado puede ser de un tipo o de otro. Así, por ejemplo, el remodelado hipertrófico es característico de las arterias elásticas en el envejecimiento y en patologías cardiovasculares como la hipertensión (Aguado *et al.*, 2015), la obesidad y la diabetes (Endemann *et al.*, 2004; Briones *et al.*, 2014), la aterosclerosis o laestenosis (Renna *et al.*, 2013a; Jaminon *et al.*, 2019). El remodelado eutrófico se relaciona con la hipertensión esencial (Schiffrin, 2004). Por su parte, el remodelado hipotrófico se ha observado en la hipertensión inducida por ouabaína (Briones *et al.*, 2006) y en ratas SHR (Nørrelund *et al.*, 1994).

### 3.3. RIGIDEZ VASCULAR

Como ya se ha comentado, la pared de los vasos está compuesta por varios tipos celulares embebidos en una matriz extracelular, que contribuyen a su rigidez intrínseca, resultante de la contribución individual de cada uno de estos componentes (Boutouyrie *et al.*, 2021). El aumento de la **rigidez vascular** provocado por la acción de diferentes fuerzas modifica las propiedades del vaso, conlleva una distensibilidad arterial disminuida y desempeña un papel clave en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares, contribuyendo al remodelado vascular característico de estas (Palombo and Kozakova, 2016; Boutouyrie *et al.*, 2021).

Las células vasculares producen y secretan componentes de la MEC que, además de proporcionar soporte estructural a los vasos, definen las propiedades mecánicas de los mismos. Alteraciones, tanto cualitativas como cuantitativas, en los componentes de la MEC (elastina, colágeno, proteínas de la MEC y MMP) son responsables, en parte, del aumento en la rigidez vascular. Entre los mecanismos implicados en el aumento de la rigidez está un incremento en la deposición de colágeno, que limita la elasticidad y la distensión de los vasos, y una degradación de las fibras de elastina por acción de las MMP, lo que disminuye la flexibilidad y extensibilidad de la pared vascular (Zieman *et al.*, 2005; Vatner *et al.*, 2021). Además de participar en las funciones mecánicas, los componentes de la MEC participan también en la regulación de la adhesión celular, la migración y la proliferación, contribuyendo al aumento de la rigidez vascular (Briones *et al.*, 2010). Como se comentará a continuación, las CMLV, debido a su plasticidad fenotípica y su capacidad de producir y secretar componentes de la MEC, participan de forma importante en el aumento de la rigidez vascular (Lacolley *et al.*, 2017).

### 3.4. CAMBIOS FENOTÍPICOS DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES

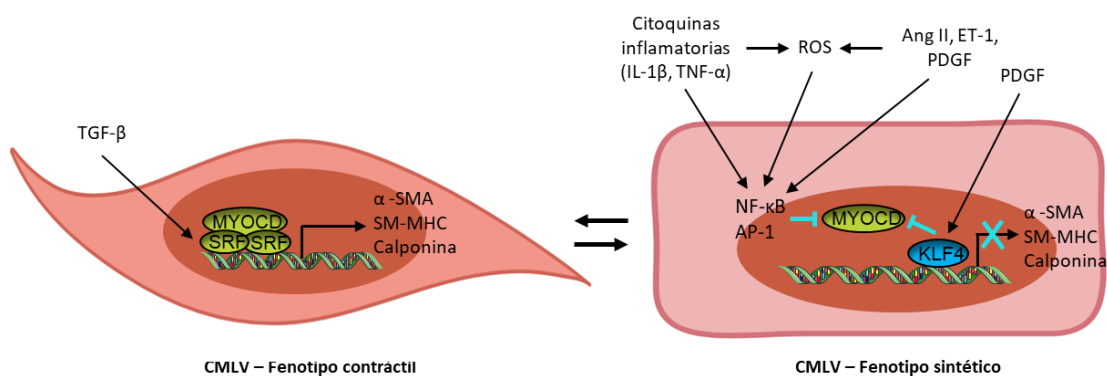
Las CMLV mantienen la estructura y la función vascular y regulan el tono vascular, la presión sanguínea, la migración, la proliferación, el crecimiento celular (hiperplasia/hipertrofia), la apoptosis, la producción de componentes de la MEC, la fibrosis y la inflamación (Touyz *et al.*, 2018; Grootaert and Bennett, 2021). Estas células presentan una membrana rica en canales iónicos, uniones célula-célula y uniones célula-MEC, generando una muy buena comunicación entre las diferentes células y entre las células y la matriz extracelular, lo que permite realizar la función de contracción/relajación de manera coordinada. El aparato contráctil de las CMLV está constituido, fundamentalmente, por fibras de actina y miosina que atraviesan toda la célula. La contracción de las CMLV es regulada principalmente por el aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y su estimulación puede deberse a diferentes factores como los péptidos vasoactivos Ang II, noradrenalina, ET-1, factores humorales como la acetilcolina, factores de crecimiento como PDGF o EGF, fuerzas mecánicas, citoquinas proinflamatorias o las ROS. La relajación de las CMLV tiene lugar cuando disminuyen los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, ya sea por la recaptación de este en el retículo sarcoplásmico o por su salida al exterior celular (Touyz *et al.*, 2018; Zhuge *et al.*, 2020).

Las CMLV son células muy dinámicas y con elevada plasticidad fenotípica, ya que tienen capacidad para diferenciarse y adquirir un fenotipo contráctil, o desdiferenciarse y adquirir lo que se conoce como fenotipo “sintético o proliferativo”; a este proceso se le denomina modulación fenotípica. El proceso de diferenciación-desdiferenciación de las CMLV es esencial para el desarrollo vascular, que engloba los cambios funcionales, estructurales y mecánicos que sufren estas células en función de los cambios en el entorno (Frismaniente *et al.*, 2018). Así, en condiciones fisiológicas, las CMLV se encuentran en un estado diferenciado y presentan fenotipo contráctil; tienen forma fusiforme y se caracterizan por una baja tasa de migración y proliferación, y por la expresión de proteínas contráctiles específicas como  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ -SMA), la miosina de cadena pesada del músculo liso (SM-MHC) y la calponina. Estas células, además, producen y secretan componentes de la MEC como elastina, colágeno y proteoglicanos, y mediadores proinflamatorios (Allahverdian *et al.*, 2018; Frismaniente *et al.*, 2018; Basatemur *et al.*, 2019). Bajo condiciones de estrés, las CMLV pueden sufrir una desdiferenciación y pasan a tener un fenotipo sintético o proliferativo, que se caracteriza por una elevada tasa de migración y proliferación, una menor expresión de marcadores contráctiles específicos y una mayor producción de citoquinas proinflamatorias y de componentes de la MEC como colágeno y MMP, lo que facilita la migración de estas células (Allahverdian *et al.*, 2018; Frismaniente *et al.*, 2018; Basatemur *et al.*, 2019).

Las CMLV contráctiles pueden pasar a un fenotipo sintético para participar en procesos de reparación tisular. Una vez finalizada la reparación, las CMLV recuperan su fenotipo contráctil no proliferante, de manera que la desdiferenciación de las CMLV es un proceso reversible (Frismaniente *et al.*, 2018). En este sentido, se ha observado una disminución transitoria de la expresión de proteínas contráctiles después de un daño vascular, pero la expresión de estas proteínas vuelve a hacerse presente cuando el daño ha sido reparado (Owens, 1995; Frismaniente *et al.*, 2018; Basatemur *et al.*, 2019; Grootaert and Bennett, 2021).

La modulación del fenotipo de las CMLV es llevada a cabo por diferentes factores. A nivel transcripcional, el factor de respuesta sérica (SRF) es el principal regulador de la modulación fenotípica de las CMLV que, junto con su cofactor, la miocardina (MYOCD), aumentan la expresión de genes como  $\alpha$ -SMA, SM-MHC y calponina, controlando así la diferenciación de estas células (Zhou *et al.*, 2017; Frisantiene *et al.*, 2018). Otro factor importante es el factor 4 similar a Krüppel (KLF4), que reprime la expresión de genes implicados en la diferenciación y en la contracción de las CMLV, por lo que induce su desdiferenciación (Shankman *et al.*, 2015; Frisantiene *et al.*, 2018); de hecho, uno de los mecanismos a través de los cuales KLF4 reprime la diferenciación de las CMLV es a través de la inhibición de la expresión de MYOCD, lo que impide la interacción de esta con SRF (Liu *et al.*, 2005). Citoquinas proinflamatorias como IL-1 y TNF- $\alpha$ , factores de crecimiento como PDGF, factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1, proteínas de la MEC o la heparina, también regulan la modulación fenotípica de las CMLV induciendo un fenotipo sintético (Basatemur *et al.*, 2019).

Otro factor importante que participa en la regulación del fenotipo de las CMLV son las ROS (Badran *et al.*, 2020). Así, niveles elevados de ROS contribuyen a la desdiferenciación de estas células dando lugar a CMLV con fenotipo sintético. En este sentido, se ha descrito que la activación de NF- $\kappa$ B, debida a la acción de las ROS, induce un aumento de expresión de marcadores de fenotipo desdiferenciado a través de la inhibición de MYOCD (Tang *et al.*, 2008). Asimismo, una aumentada actividad de NOX1 por acción de estímulos prooxidantes como Ang II, PDGF o IL-1 $\beta$ , promueve la activación de vías de señalización intracelular que reducen la expresión de marcadores contráctiles e inducen el aumento en la migración y proliferación de las CMLV, procesos implicados en la desdiferenciación (Lee *et al.*, 2009; Brown and Griendling, 2015; Zhao *et al.*, 2015a; Aguado *et al.*, 2016) (Figura 10). Por otra parte, una actividad aumentada de NOX4, que puede deberse a la acción de TGF- $\beta$  o MAPK como p38, y que produce principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, contribuye al mantenimiento del estado diferenciado y contráctil de las CMLV, ya que induce la activación del factor de transcripción SRF, dando lugar a la expresión de marcadores contráctiles específicos de estas células (Clempus *et al.*, 2007; Brown and Griendling, 2015).



**Figura 10. Modulación fenotípica de las CMLV.** Ang II: angiotensina II; AP-1: proteína activadora-1; CMLV: célula muscular lisa vascular; ET-1: endotelina-1; IL-1 $\beta$ : interleuquina-1 $\beta$ ; KLF4: factor 4 similar a Krüppel; MYOCD: miocardina; NF- $\kappa$ B: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera  $\kappa$  de linfocitos B; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; SM-MHC: miosina de cadena pesada del músculo liso;  $\alpha$ -SMA:  $\alpha$ -actina del músculo liso. Adaptada de Basatemur *et al.*, 2018. Creada con BioRender.

En situaciones fisiológicas, la desdiferenciación de las CMLV se produce de manera reversible y a un ritmo bajo, lo que garantiza la continua renovación de la pared vascular o la reparación del tejido dañado en caso de lesión (Owens, 1995; Frismantiene *et al.*, 2018). Sin embargo, bajo condiciones de estrés sostenido o en situaciones patológicas, donde hay una alteración en el flujo sanguíneo, en los niveles de mediadores vasoactivos o un aumento en la producción de ROS o de la inflamación, se producen alteraciones en los mecanismos de regulación de la transición fenotípica, dando lugar a la adopción persistente por parte de las CMLV del fenotipo sintético, contribuyendo así al aumento de rigidez, al remodelado y a la disfunción vascular característicos de patologías cardiovasculares (Lacolley *et al.*, 2017; Brown *et al.*, 2018; Frismantiene *et al.*, 2018; Touyz *et al.*, 2018; Basatemur *et al.*, 2019; Jaminon *et al.*, 2019).

#### 3.4.1. Migración y proliferación celular

La **migración** de las CMLV desempeña un papel importante en la formación y la reparación de los vasos. Es un proceso que implica la activación del citoesqueleto para permitir la contracción celular, la formación y disolución de adhesiones focales entre las células y la degradación de diversos componentes de la MEC. Así, tras un daño vascular, que generalmente se relaciona con niveles aumentados de ROS, se produce un aumento de expresión del factor de crecimiento PDGF y la activación de las GTPasas Rho y Rac, implicadas en la polimerización de la actina y en la formación de adhesiones focales, respectivamente (Heo and Campbell, 2005; Gerthoffer, 2007; Aghajanian *et al.*, 2009). Además, estas GTPasas participan en la activación de diferentes NOX, principalmente NOX1 y NOX2, lo que induce un aumento aun mayor de las ROS (Acevedo and González-Billault, 2018). Se ha descrito que las ROS, a través de la vía Akt/NF- $\kappa$ B, activan las MMP, proteínas que intervienen en la degradación de los componentes de la MEC permitiendo así la migración celular (Lee *et al.*, 2008; Zhong *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2016). La migración celular, cuando se produce de manera descontrolada, contribuye al desarrollo de patologías cardiovasculares (Shi *et al.*, 2020).

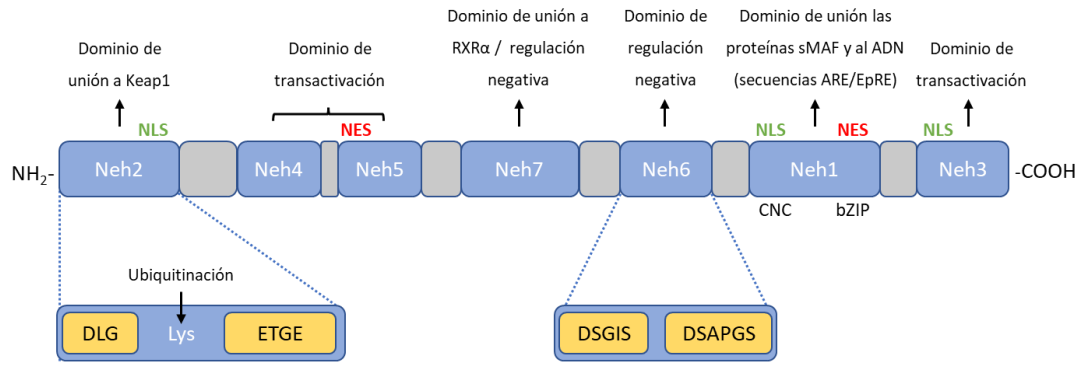
Por otro lado, la **proliferación** celular es un proceso importante durante la cicatrización y la reparación de heridas; sin embargo, una proliferación celular excesiva de las CMLV contribuye a la aparición de patologías cardiovasculares (Owens, 1995; Shi *et al.*, 2020). Diversos mecanismos participan en la inducción de la proliferación. Así, factores de crecimiento como PDGF, en parte a través de ROS, inducen la activación de la vía de señalización Src/PI3K/Akt. PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa) fosforila PIP<sub>2</sub> dando lugar a PIP<sub>3</sub>, proceso que puede ser revertido por la fosfatasa de PIP<sub>3</sub>, PTEN, que es inhibida por ROS; Akt, una vez activada por acción de PIP<sub>3</sub>, puede formar complejos con las p38 MAPK, sensibles a ROS, lo que induce la activación de NF- $\kappa$ B y AP-1, dando lugar a la regulación de la proliferación celular (Brown and Griendling, 2015). También se ha visto que la actividad incrementada de NOX1 estimulada por Ang II participa en el aumento de la proliferación de las CMLV, lo que puede acabar generando hipertrofia vascular (Dikalova *et al.*, 2005).

## 4. Nrf2

Como se ha comentado, existen diversos mecanismos antioxidantes, como la SOD, catalasa, GPx, TRx, ácido ascórbico, que se encargan de mantener un equilibrio entre la producción de ROS y su eliminación (Brown and Griendling, 2015; Dubois-Deruy *et al.*, 2020). Otro importante

sistema antioxidante es el factor de transcripción sensible a estrés oxidativo Nrf2, el cual activa la transcripción de genes que presentan en su promotor una secuencia de respuesta a antioxidantes (ARE) y que codifican para proteínas antioxidantes como la hemoxigenasa-1 (HO-1), la NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), la GPx, la TRx, la SOD o la catalasa. Nrf2 está codificado por el gen NFE2L2, tiene una vida media corta, de entre 15 y 40 minutos dependiendo del tipo celular, y se expresa de manera constitutiva en una gran variedad de tejidos, incluyendo el sistema cardiovascular, aunque los niveles de este factor de transcripción pueden variar en función del tipo celular (Yamamoto *et al.*, 2018; Lee and Hu, 2020; Crisman *et al.*, 2023).

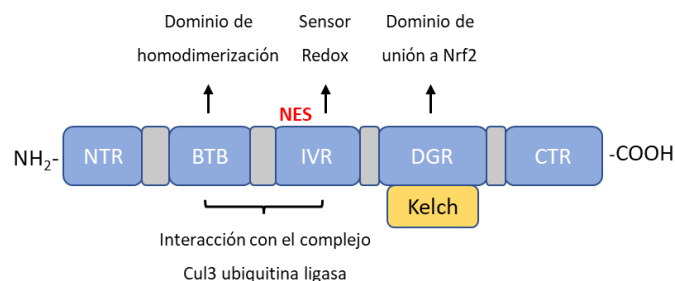
Nrf2 es un miembro de la familia de factores de transcripción de dominio básico y cremallera de leucina (bZIP) y pertenece a la subfamilia “*cap'n collar*” (CNC). Es una proteína constituida por 605 residuos de aminoácidos muy conservados entre las diferentes especies. El peso molecular de la proteína de Nrf2 es de 66 kDa; sin embargo, su movilidad electroforética indica un peso molecular de entre de 96-118 kDa, lo que se debe a la abundancia de residuos ácidos presentes en su estructura y a la susceptibilidad que tiene este factor de transcripción de sufrir modificaciones postraduccionales como, por ejemplo, fosforilaciones (Lau *et al.*, 2013; Silva-Islas and Maldonado, 2018; Shaw and Chattopadhyay, 2020; Ulasov *et al.*, 2022). Nrf2 presenta siete dominios funcionales, Neh1-Neh7 (dominios Nrf2 con homología ECH). **Neh1** contiene un motivo básico de cremallera de leucina (bZIP/CNC) y es el responsable de la unión de este factor de transcripción al ADN al interactuar con las secuencias ARE o las secuencias de respuesta a compuestos electrofílicos (EpRE). Es además el encargado de la heterodimerización de Nrf2 con las proteínas MAF (fibrosarcoma aponeurótico muscular) pequeñas, sMAF, interacción que es indispensable para que se produzca la unión al ADN. **Neh2** es el dominio de interacción con Keap1 (proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch), el regulador negativo de Nrf2 presente en el citoplasma. La unión Nrf2-Keap1 es posible gracias a dos motivos presentes en este dominio Neh2: el motivo de unión de alta afinidad ETGE (“bisagra”) y el motivo de unión de baja afinidad DLG (“pestillo”). El dominio Neh2 presenta también residuos de lisina, que actúan como sustratos para la ubiquitinación de Nrf2 y la degradación por la vía del proteasoma (Ulasov *et al.*, 2022). El dominio **Neh3** se encuentra en el extremo C-terminal (CTR) de Nrf2 y, junto con los dominios Neh4 y Neh5, su función es la transactivación o activación transcripcional de este factor de transcripción, acción que se lleva a cabo a través de su unión a la proteína helicasa con cromodominio de unión a ADN 6 (CHD6). Los dominios **Neh4** y **Neh5** interactúan con los diferentes cofactores necesarios para la activación de Nrf2, como la proteína CBP [proteína de unión a CREB (proteína de respuesta a adenosín monofosfato cíclico, AMPc)] o la proteína p300, ambas proteínas modificadoras de histonas que acetilan Nrf2 potenciando así su actividad. El dominio **Neh6** es un dominio rico en serina implicado en la regulación negativa de Nrf2 independiente de Keap1, mediante la modulación de la fosforilación de dos motivos muy conservados, DSGIS y DSAPGS, y la interacción con la proteína E3 ubiquitina ligasa de reconocimiento de  $\beta$ -Transducina ( $\beta$ -TrCP). El dominio **Neh7** también está implicado en la regulación negativa de Nrf2 mediante la interacción y la activación del receptor X de retinoides  $\alpha$  (RXR  $\alpha$ ) (Silva-Islas and Maldonado, 2018; Tonelli *et al.*, 2018; He *et al.*, 2020; Ulasov *et al.*, 2022). Además, Nrf2 contiene unas secuencias que regulan su localización subcelular, tres secuencias de localización nuclear (**NLS**) presentes en los dominios Neh1, Neh2 y Neh3, y dos secuencias de exportación nuclear (**NES**), presentes en los dominios Neh1 y Neh5 (Ulasov *et al.*, 2022) ([Figura 11](#)).



**Figura 11. Dominios estructurales proteicos de Nrf2 (Neh1-Neh7).** ARE: elementos de respuesta a antioxidantes; EpRE: elementos de respuesta a compuestos electrofílicos; Neh1: dominio de interacción con las proteínas sMAF y al ADN; Neh2: dominio de unión a Keap1; Neh3: dominio de transactivación; Neh4 y Neh5: dominios de transactivación; Neh6: dominio de regulación negativa de Nrf2; Neh7: dominio de interacción con el receptor RXRα; NES: secuencias de exportación nuclear; NLS: secuencias de localización nuclear. Adaptada de Ulasov *et al.*, 2022.

En condiciones fisiológicas, los niveles de Nrf2 no son muy elevados, puesto que se encuentra en el citosol unido a un dímero de su proteína represora Keap1, que induce la ubiquitinación de Nrf2, marcándolo así para su degradación por el proteasoma 26S (Yamamoto *et al.*, 2018).

**Keap1** es una proteína de 627 aminoácidos constituida por cinco dominios: un dominio N-terminal (NTR), un dominio BTB (*Broad complex, Tramtrack, Bric à Brac*), un dominio intermedio (IVR), un dominio de dobles repeticiones de glicina (DGR) y un dominio CTR (Lee and Hu, 2020). El dominio **BTB** participa en la homodimerización de Keap1 necesaria para el reconocimiento de Nrf2, y contribuye a la interacción con el complejo CRL [Cul3-Rbx-1 (proteína *Ring Box 1*)-E3 ubiquitina ligasa] implicado en la ubiquitinación de Nrf2. El dominio **IVR**, que se localiza entre los dominios BTB y DGR, presenta un número alto de residuos de cisteína y actúa como sensor de estrés oxidativo. Este dominio contribuye también a la interacción entre Keap1 y el complejo CRL (Lee and Hu, 2020). El dominio **IVR** presenta, además, una secuencia consenso de exportación nuclear importante para la localización de Keap1 en el citosol (Bellezza *et al.*, 2018). El dominio **DGR**, que presenta 6 repeticiones del motivo Kelch, junto con el dominio **CTR**, son los encargados de la interacción con Nrf2 gracias a su unión a los motivos ETGE y DLG del dominio Neh2 de este factor de transcripción (Lee and Hu, 2020) (Figura 12).



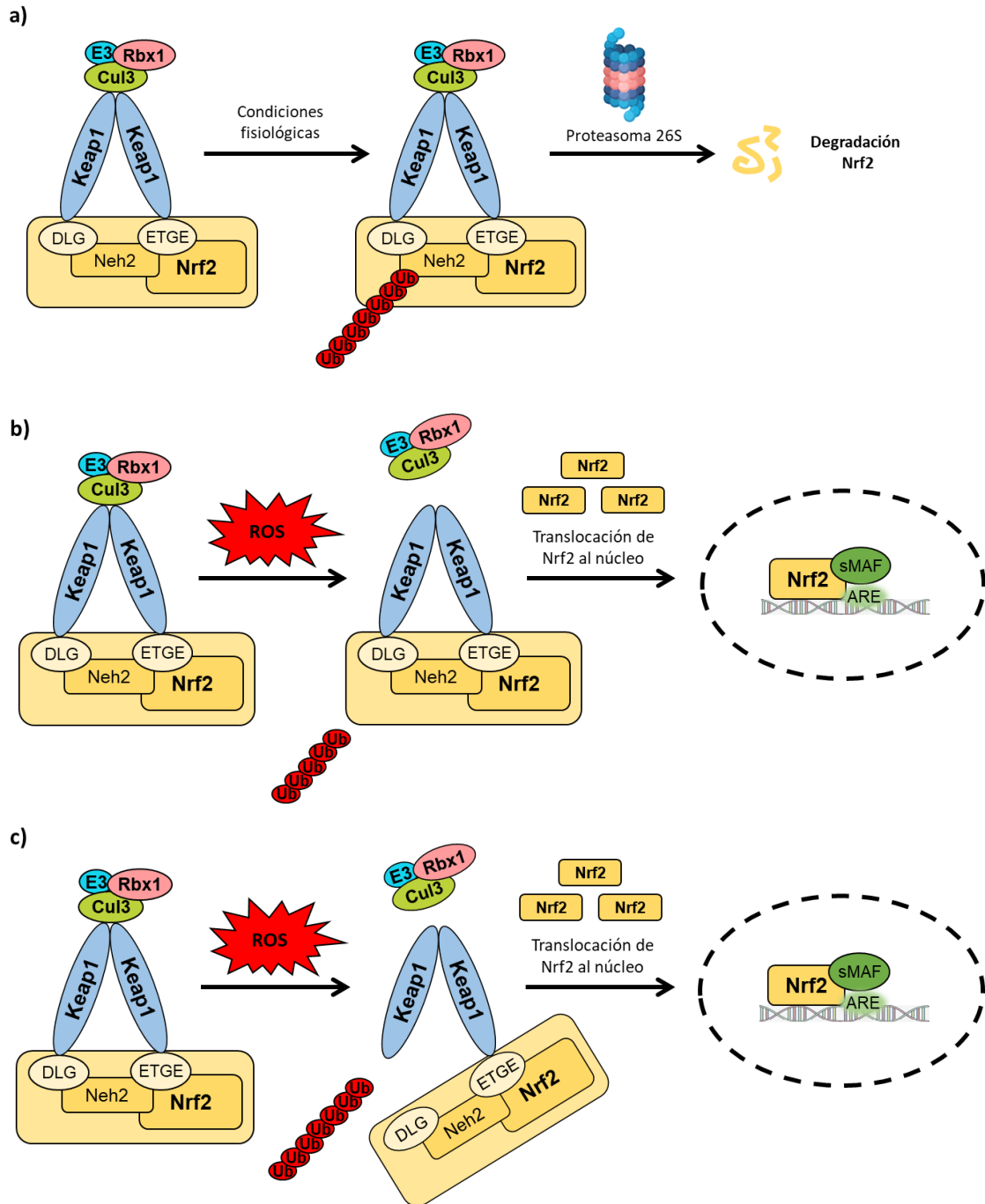
**Figura 12. Dominios estructurales proteicos de Keap1.** BTB: *Broad complex, Tramtrack, Bric à Brac*, dominio de homodimerización y unión con el complejo CRL; CTR: extremo C-terminal; DGR: dominio rico en repeticiones de glicina y de unión a Nrf2; IVR: región intermedia, sensor redox; NES: secuencias de exportación nuclear; NES: secuencias de exportación nuclear; NTR: extremo N-terminal. Adaptada de Ulasov *et al.*, 2022.



#### 4.1. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN Nrf2/ARE

En condiciones fisiológicas, el homodímero de Keap1 presente en el citoplasma interacciona, a través de los motivos Kelch del dominio DGR, con el dominio Neh2 del factor de transcripción Nrf2. Por un lado, Nrf2 interacciona con uno de los dos miembros del homodímero de Keap1 a través del motivo ETGE, generando lo que se conoce como “conformación abierta” del homodímero de Keap1. Por otro lado, la interacción de Nrf2 con el otro miembro del homodímero se produce a través del motivo DLG, dando lugar a lo que se conoce como “conformación cerrada” (Dinkova-Kostova *et al.*, 2017; Baird and Yamamoto, 2020). Análisis por resonancia magnética nuclear de la interacción Keap1-Nrf2 han revelado que los motivos ETGE y DLG de Nrf2 tienen sitios de unión solapados en una misma molécula de Keap1, lo que sugiere que cada motivo puede unirse a un sitio similar en cada miembro del dímero de Keap1 (Tong *et al.*, 2006). Cuando se genera la conformación cerrada del homodímero de Keap1 es cuando se produce la interacción con el complejo CRL, dando lugar a la poliubiquitinación de Nrf2 en varios residuos de lisina presentes en el dominio Neh2 y a la consiguiente degradación del mismo por la vía del proteasoma 26S (Figura 13a) (Dinkova-Kostova *et al.*, 2017; Baird and Yamamoto, 2020). Una vez degradado Nrf2, los dímeros de Keap1 libres pueden unirse a otras proteínas de Nrf2, lo que permite la regulación y el mantenimiento de niveles bajos de este factor de transcripción en el citosol (Dinkova-Kostova *et al.*, 2017; Baird and Yamamoto, 2020).

Keap1 contiene varios residuos de cisteína que actúan como sensores redox. La Cys151 en el dominio BTB, las Cys226, Cys273 y Cys288 en el dominio IVR y la Cys613 en el dominio DGR son altamente reactivas y susceptibles de sufrir modificaciones. Algunas de las cisteínas, además, están localizadas al lado de aminoácidos más básicos, lo que les hace ser más reactivas (Yamamoto *et al.*, 2008; Baird and Yamamoto, 2020; Crisman *et al.*, 2023). En condiciones de estrés oxidativo o en presencia de compuestos electrofílicos, se producen modificaciones en los residuos de cisteína del dominio BTB o del dominio IVR que inducen un cambio conformacional de Keap1 dando lugar a la ruptura de la interacción de este con Nrf2 y/o con el complejo CRL, permitiendo así la activación del factor de transcripción Nrf2. Esta vía de activación de Nrf2 se conoce como vía de **activación canónica de Nrf2** y se han propuesto dos modelos para explicarla: 1) el modelo de disociación del complejo CRL, en el que las ROS y las especies electrofílicas inducen un cambio conformacional de Keap1 que impide la interacción de este con el complejo CRL y, por lo tanto, evita la ubiquitinación y degradación por el proteasoma de Nrf2 (Figura 13b) y 2) el modelo “bisagra-pestillo”, en el cual el cambio conformacional de Keap1 inducido por ROS hace que Nrf2 deje de interactuar con este a través de los motivos DLG (“pestillo”), aunque se mantenga la interacción a través de los motivos ETGE (“bisagra”). Este cambio conformacional también impide la interacción con el complejo CRL, e inhibe la ubiquitinación de Nrf2 (Figura 13c) (Dinkova-Kostova *et al.*, 2017; Baird and Yamamoto, 2020; Horie *et al.*, 2021; Crisman *et al.*, 2023). En ambos modelos, Keap1 se inactiva y, en consecuencia, las proteínas de Nrf2 recién sintetizadas quedan libres en el citoplasma y se translocan al núcleo, donde afectan a la expresión de casi 500 genes (Bellezza *et al.*, 2018; Crisman *et al.*, 2023). Existen otros mecanismos que regulan la activación de Nrf2 y que se expondrán más adelante.



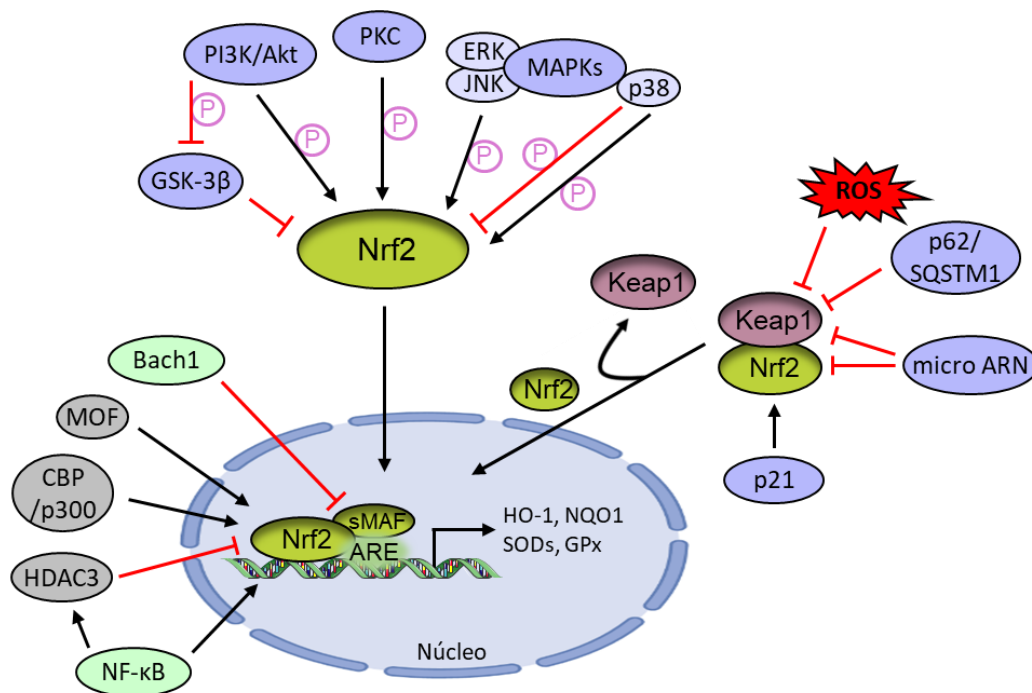
**Figura 13. Modelos de interacción de Keap1 y Nrf2.** (a) Interacción Nrf2-Keap1 en condiciones fisiológicas. (b) Inhibición de la interacción de Keap1 con el complejo CRL (modelo de disociación del complejo CRL). (c) Disociación parcial de Nrf2 del inhibidor Keap1 (modelo “bisagra-pestillo”). ARE: elementos de respuesta a antioxidantes; ROS: especies reactivas de oxígeno; sMAF: proteínas MAF pequeñas. El complejo CRL aparece representado como E3-Rbx1-Cul3. Elaboración propia.

Una vez se encuentra en el núcleo, Nrf2 forma heterodímeros con las proteínas de la familia sMAF que incluyen MafF, MafG y MafK, siendo esta unión indispensable para que este factor de transcripción reconozca a las secuencias ARE o EpRE presentes en los promotores de los genes de respuesta antioxidante (Yamamoto *et al.*, 2018). Las proteínas sMAF pueden formar homodímeros, pero estos carecen del dominio de transactivación necesario para poder llevar a cabo su acción, por lo que funcionan como represores transcripcionales. Es por esto que las

proteínas sMAF han de formar los heterodímeros con Nrf2 (Yamamoto *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2022). La unión del dímero Nrf2/sMAF con las secuencias ARE/EpRE da lugar a la activación de la transcripción de genes que codifican para proteínas implicadas en mecanismos de defensa antioxidante, entre las que destacan las enzimas de detoxificación de fase II como la NQO1, la glutatión S transferasa (GST) o la UDP glucuronosiltransferasa (UGT), las proteínas de respuesta a estrés como la HO-1 (Drummond *et al.*, 2019) y enzimas antioxidantes como TRx, SOD1 y 2, GPx, glutatión reductasa (GR) o catalasa, entre otras (Yamamoto *et al.*, 2018). La activación del factor de transcripción Nrf2 también puede actuar sobre el promotor del propio gen de Nrf2, ya que este posee secuencias ARE, lo que daría lugar a un ciclo de retroalimentación positiva en el cual Nrf2 activa su propia transcripción (Liu *et al.*, 2022).

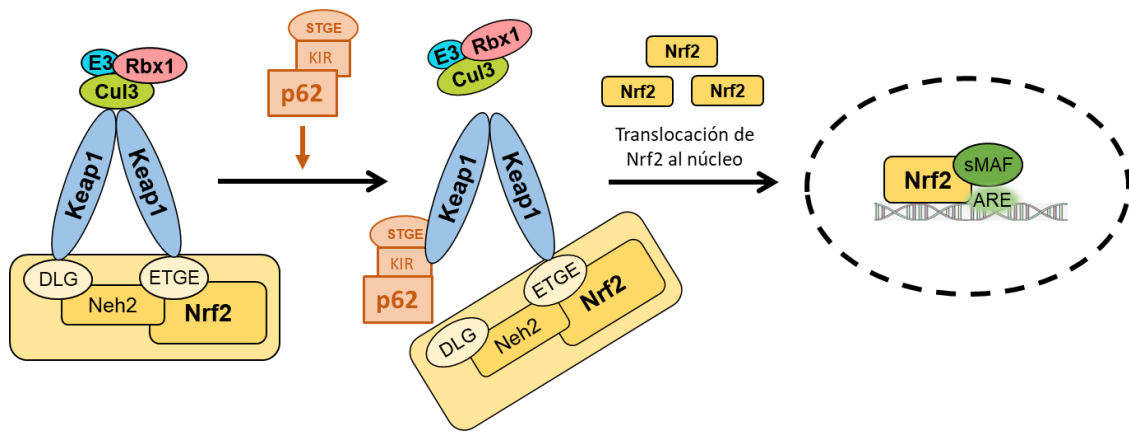
#### 4.2. OTROS MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN Nrf2

Las vías no canónicas de activación de Nrf2 incluyen modificaciones traduccionales, postraduccionales o por microRNAs, entre otros mecanismos (Tonelli *et al.*, 2018; Shaw and Chattopadhyay, 2020) (Figura 14).



**Figura 14. Esquema de los diferentes mecanismos de regulación del factor de transcripción Nrf2.** ARE: elemento de respuesta a antioxidantes; Bach1: factor de transcripción con homología a BTB y CNC1; CBP/p300: proteína de unión a CREB/p300; ERK: quinasa regulada por señales extracelulares; GPx: glutatión peroxidasa; GSK-3β: glucógeno sintasa quinasa-3β; HDAC3: histona desacetilasa 3; HO-1: hemoxigenasa-1; JNK: quinasa c-Jun N-terminal; Keap1: proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch; MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos; MOF: histona H4 lisina 16 acetiltransferasa; NF-κB: factor nuclear activador de la transcripción de la cadena ligera κ de linfocitos B; NQO1: NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1; Nrf2: factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa; PKC: proteína quinasa C; ROS: especies reactivas de oxígeno; sMAF: fibrosarcoma aponeurótico muscular pequeño; SOD: superóxido dismutasa; SQSTM1/p62: sequestosoma. Adaptada de Tonelli *et al.*, 2018.

La chaperona o proteína adaptadora de la autofagia **p62** (también conocida como sequestosoma 1, SQSTM1) reconoce proteínas ubiquitinadas como Keap1 (Jiang *et al.*, 2015; Baird and Yamamoto, 2020). p62 actúa como represora de Keap1 a través de dos mecanismos. En el primero de ellos, p62 interactúa directamente con Keap1 gracias al motivo STGE de su dominio KIR (región de interacción con Keap1), inhibiendo de manera competitiva la unión de Nrf2 a Keap1 a través de los motivos DLG (Figura 15). Esto impide la ubiquitinación de Nrf2 y, por lo tanto, inhibe su degradación por la vía del proteasoma. Además, niveles elevados de p62 pueden interrumpir las uniones entre Keap1 y los motivos ETGE de Nrf2 (Horie *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022). El segundo mecanismo conlleva la degradación de Keap1. En este caso, la interacción p62-Keap1 induce el transporte de Keap1 hasta los autofagosomas donde va a ser degradado por autofagia (Jiang *et al.*, 2015; Horie *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022).



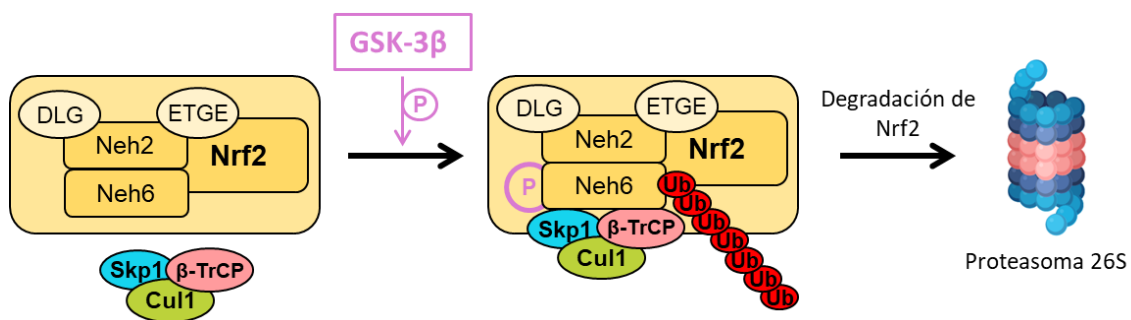
**Figura 15. Regulación de Nrf2 por la proteína reguladora de la autofagia p62.** ARE: elementos de respuesta a antioxidantes; sMAF: proteínas MAF pequeñas. El complejo CRL aparece representado como E3-Rbx1-Cul3. Elaboración propia.

Otra proteína capaz de regular la activación de Nrf2 es la proteína inhibidora de la quinasa dependiente de ciclinas (CDK) **p21**, que interactúa con el motivo DLG de este factor de transcripción, impidiendo su unión a Keap1. Esta interacción p21-Nrf2 no afecta a la unión Keap1-Nrf2 a través del motivo ETGE, pero inhibe la ubiquitinación de Nrf2 dando lugar a su estabilización (Chen *et al.*, 2009; Silva-Islas and Maldonado, 2018; Tonelli *et al.*, 2018) (Figura 14).

También la fosforilación en el dominio Neh2 de Nrf2 regula la actividad del factor de transcripción al modificar su interacción con el represor Keap1 (Liu *et al.*, 2021). Así, **PKC** fosforila residuos de serina presentes en el dominio Neh2 e induce la liberación de Keap1 (Huang *et al.*, 2002), siendo este uno de los mecanismos de acción de terbutilhidroquinona (tBHQ), un activador sintético de Nrf2 (Huang *et al.*, 2000). La fosforilación de Nrf2 por miembros de la familia de las **MAPK**, como ERK y JNK, también provoca la liberación de Nrf2 de Keap1. Por otro lado, la fosforilación de Nrf2 por p38 puede reducir la estabilidad de este factor de transcripción o inducir la activación del mismo (Shaw and Chattopadhyay, 2020; Liu *et al.*, 2021) (Figura 14).

Existen también **mecanismos de regulación de Nrf2 independientes de Keap1**. Uno de ellos es la regulación negativa de Nrf2 por la proteína  $\beta$ -TrCP. El dominio Neh6 de Nrf2 contiene dos

motivos muy conservados, DSGIS y DSAPGS, que presentan repeticiones de  $\beta$ -transducina, lo que permite su interacción con la proteína  $\beta$ -TrCP, la cual, a su vez, interacciona con el complejo E3 ubiquitina ligasa Skp1-Cul1-F-box (SCF), dando lugar a la ubiquitinación de Nrf2 y a su degradación por la vía del proteasoma (Hayes *et al.*, 2015; He *et al.*, 2020) (Figura 16). La fosforilación de DSGIS por **GSK-3 $\beta$**  aumenta la afinidad de  $\beta$ -TrCP por Nrf2, estimulando así la degradación del factor de transcripción (Chowdhry *et al.*, 2013; Hayes *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2021). GSK-3 $\beta$  es inhibida mediante su fosforilación por **Akt** tras la activación de la vía PI3K/Akt por diversos factores, regulando esta vía la actividad de Nrf2 de manera positiva (Hayes *et al.*, 2015; He *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021).



**Figura 16. Regulación de Nrf2 por GSK-3 $\beta$ .** Regulación de Nrf2 por fosforilación por la quinasa GSK-3 $\beta$ . El complejo SCF aparece representado como Skp1-Cul1. Elaboración propia.

Otros mecanismos postraduccionales de regulación de Nrf2 modulan su traslocación al núcleo y la unión al ADN. Así, la **acetilación** de Nrf2 por la histona acetiltransferasa MOF induce la acumulación en el núcleo de este factor y su acetilación por CBP/p300 potencia su unión al ADN (Shaw and Chattopadhyay, 2020). Este proceso puede ser regulado de manera negativa mediante la **desacetilación** de Nrf2 por HDAC3 (histona desacetilasa 3) que puede ser activada por NF- $\kappa$ B, entre otros (Bellezza *et al.*, 2018; Shaw and Chattopadhyay, 2020) (Figura 14).

Otro de los mecanismos implicados en la regulación de Nrf2, que interfiere con la unión de este al ADN, es el llevado a cabo por **Bach1** (factor de transcripción con homología a BTB y CNC1). Bach1, al igual que Nrf2, es miembro de la familia de factores de transcripción bZIP y pertenece a la subfamilia CNC. También, al igual que Nrf2, Bach1 puede formar heterodímeros con las proteínas sMAF, lo que le permite unirse a las secuencias ARE presentes en los promotores de genes de respuesta antioxidante, donde actúa como represor transcripcional inhibiendo la expresión de estos genes (Reichard *et al.*, 2007; Kaspar and Jaiswal, 2010; Liu *et al.*, 2022). Así, Bach1 es uno de los principales reguladores negativos de Nrf2, con quien compete a dos niveles: 1) por la unión a las proteínas sMAF; 2) una vez consigue formar heterodímeros con las proteínas sMAF, compete con los heterodímeros Nrf2-sMAF por la unión a las secuencias ARE del ADN. Bajo condiciones de estrés oxidativo, se produce un aumento de los grupos hemo, lo que induce la translocación de Bach1 desde el núcleo al citoplasma, ya que participa en el metabolismo de dichos grupos; así, libera a las proteínas sMAF, que pueden interaccionar con Nrf2 para formar heterodímeros y unirse a las secuencias ARE del ADN, incrementando su actividad (Shaw and Chattopadhyay, 2020; Liu *et al.*, 2022) (Figura 14).

Además, la expresión de Nrf2 también puede estar regulada por otros factores de transcripción. En este sentido, **NF-κB**, activado por citoquinas proinflamatorias, puede inducir Nrf2 como mecanismo antiinflamatorio (Figura 14). Por otro lado, la activación de Nrf2 provoca la inhibición de NF-κB, generando un ciclo de retroalimentación negativa entre estos dos factores de transcripción (Buelna-Chontal and Zazueta, 2013; Ahmed *et al.*, 2017). Otros factores de transcripción que pueden regular la expresión de Nrf2 son c-Jun (AP-1), c-Myc, PPRγ, p53 y el propio Nrf2 (Silva-Islas and Maldonado, 2018).

Por otra parte, la expresión proteica de Nrf2 también puede ser regulada por **microARNs** (miARN) (Figura 14). Los miARN son ARN no codificantes monocatenarios y endógenos con una longitud media de 22 nucleótidos que se unen al ARN mensajero induciendo su desestabilización y, por consiguiente, inhibiendo la traducción de proteínas (He *et al.*, 2020; Padmavathi and Ramkumar, 2021). La sobreexpresión de algunos microARN como miR-27a, miR-28, miR-34a, miR-142-5p, miR-144 o miR-153, ya sea de forma individual o en grupo, puede reducir los niveles de ARNm y proteína de Nrf2 (He *et al.*, 2020). Por otra parte, otros miARN como miR 24-3p o miR 200a inducen la degradación del ARNm de Keap1, lo que aumenta la activación de Nrf2 (He *et al.*, 2020; Padmavathi and Ramkumar, 2021).

#### 4.3. SUSTANCIAS REGULADORAS DE Nrf2

Muchos de los compuestos que activan Nrf2 son compuestos electrofílicos que modifican de manera covalente los residuos de cisteína presentes en Keap1 (principalmente los residuos Cys151, Cys273 y Cys288), lo que impide su unión a Nrf2. Estos compuestos electrofílicos pueden ser reguladores farmacológicos sintéticos o naturales (Robledinos-Antón *et al.*, 2019; Yagishita *et al.*, 2020). Entre los compuestos naturales cabe destacar el sulforafano, la curcumina, el resveratrol o la quercetina. El **sulforafano**, un isotiocianato presente en las plantas crucíferas, y la **curcumina**, un polifenol procedente de la cúrcuma, se han sugerido como protectores en enfermedades que cursan con estrés oxidativo, como algunas enfermedades cardiovasculares o enfermedades neurodegenerativas en modelos de roedores, debido a su capacidad para activar Nrf2 (Robledinos-Antón *et al.*, 2019; Yagishita *et al.*, 2020). El **resveratrol**, por su parte, es un compuesto polifenólico presente en las uvas, el vino o la soja, entre otros, y es conocido tanto por sus propiedades antioxidantes como antiinflamatorias debidas, en gran parte, a la activación del factor de transcripción Nrf2 (Breuss *et al.*, 2019). El itaconato, metabolito intermedio aislado del ciclo del ácido tricarboxílico, y algunos otros compuestos como el dietil-malato y el NO, también son compuestos de origen natural capaces de activar Nrf2 (Mills *et al.*, 2018; Robledinos-Antón *et al.*, 2019).

Aparte de los compuestos naturales, existe una gran variedad de compuestos sintéticos que actúan como activadores electrofílicos de Nrf2. Uno de los más importantes es el éster de ácido fumárico conocido como dimetilfumarato (**DMF**), que es casi completamente transformado en el derivado monometilfumarato (**MMF**) por acción de las esterasas intestinales. Ambos pueden interactuar con el residuo Cys151 de Keap1, lo que induce la inactivación de este e inhibe su interacción con el complejo E3 ubiquitina ligasa dando lugar a la activación de Nrf2 (Brennan *et al.*, 2015; Yagishita *et al.*, 2020; Crisman *et al.*, 2023). El mismo mecanismo tiene **oltipraz** (4-metil-5-(pirazin-2-il)-3H-1,2-ditio-3-tiona), otro activador sintético de Nrf2, que induce el aumento de la biosíntesis de glutatión (GSH) y de enzimas de detoxificación de fase II como

NQO1 (Kensler *et al.*, 2003; Robledinos-Antón *et al.*, 2019). Otro activador de Nrf2 es la **bardoxolona**, también conocida como **CDDO** (ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9 (11)-dien-28-oico). CDDO es un compuesto triterpenoide pentacíclico sintético derivado del ácido oleanólico que también interacciona con la Cys151 de Keap1. En este caso, Keap1 y Nrf2 se mantienen unidos, lo que impide la unión de Keap1 a las moléculas de Nrf2 de nueva síntesis, y permite que estas se transloquen al núcleo (Cleasby *et al.*, 2014). Este fármaco y sus derivados, los triterpenoides sintéticos procedentes del ácido oleanólico como CDDO-Metil (Bardoxolona metil) o CDDO-Imidazol (Bardoxolona imidazol), son considerados de los inductores más potentes de Nrf2 (Naidu *et al.*, 2018; Robledinos-Antón *et al.*, 2019).

**Terbutilhidroquinona** es el principal metabolito del butilhidroxianisol y se ha utilizado ampliamente como aditivo/conservante alimenticio para evitar la oxidación de los alimentos, aumentando así su valor nutricional. tBHQ induce la activación del factor de transcripción Nrf2 y de proteínas antioxidantes como la HO-1 y la NQO1 (Wang *et al.*, 2010; Park and Kim, 2014). Se han propuesto varios mecanismos por los que el tBHQ induce la activación de Nrf2 entre los cuales se incluyen: 1) la disociación del complejo Keap1-Nrf2 por acción directa del propio tBHQ sobre el residuo de Cys151 presente en el dominio BTB de Keap1 (Zhang and Hannink, 2003); 2) la estabilización de Nrf2 inducida por la activación de la vía PI3K/Akt que va a dar lugar a la inhibición del regulador negativo de Nrf2 GSK-3 $\beta$  (Hayes *et al.*, 2015); y 3) la estabilización de Nrf2 inducida por la fosforilación llevada a cabo por las MAPK (Gharavi *et al.*, 2007) o por la PKC (Huang *et al.*, 2002). Además, se ha visto que tBHQ es capaz de inducir la exclusión nuclear de Bach1, lo que permite la interacción de sMAF-Nrf2 con las secuencias ARE (Kaspar and Jaiswal, 2010; Liu *et al.*, 2022). tBHQ también puede activar Nrf2 al inducir la ubiquitinación y posterior degradación de Keap1 (Zhang *et al.*, 2005). De esta manera, se ha descrito que tBHQ, a través de la activación del factor de transcripción Nrf2, reduce el estrés oxidativo y la expresión de citoquinas proinflamatorias, a la vez que induce un aumento de los mecanismos antioxidantes (Zhao *et al.*, 2020b).

Existen también compuestos que activan Nrf2 al interferir con la unión del motivo ETGE de Nrf2 y los motivos Kelch de Keap1, impidiendo así la interacción entre Nrf2 y Keap1. Entre ellos destacan la tetrahidroisoquinolona, la tiopirimidina, el naftaleno y algunos derivados de la urea. Al interaccionar de manera directa con Nrf2 o Keap1, estos compuestos son más selectivos que los compuestos electrofílicos, ya que estos últimos pueden interaccionar con cisteínas redox sensibles distintas de las de Keap1 (Richardson *et al.*, 2015; Robledinos-Antón *et al.*, 2019).

Adicionalmente, existen compuestos que inhiben a Nrf2. Algunos, como la dexametasona, inhiben la actividad transcripcional de Nrf2 (Ki *et al.*, 2005). Otros, como el compuesto natural brusatol, reducen los niveles proteicos de Nrf2 al promover la ubiquitinación y la subsecuente degradación del mismo (Ren *et al.*, 2011). Los flavonoides naturales luteolina y wogonina reducen la estabilidad del transcrito de Nrf2 (Tang *et al.*, 2011; Zhong *et al.*, 2013) y el ácido ascórbico, un conocido barredor de ROS, disminuye los niveles del complejo Nrf2/ARE (Tarumoto *et al.*, 2004) (**Tabla 1**).

SUSTANCIAS REGULADORAS DE Nrf2	
ACTIVADORES	INHIBIDORES
<p><b>Compuestos naturales</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Isotiocianatos (Sulforafano)</li> <li>• Polifenoles (Curcumina, Resveratrol)</li> <li>• Flavonoides (Quercetina)</li> </ul> <p><b>Compuestos sintéticos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• DMF/MMF</li> <li>• Bardoxolona / CDDO</li> <li>• Oltipraz</li> <li>• tBHQ</li> </ul>	<p><b>Compuestos naturales</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Brusatol</li> <li>• Luteolina</li> <li>• Wogonina</li> <li>• Ácido ascórbico</li> </ul> <p><b>Compuestos sintéticos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dexametasona</li> </ul>

Tabla 1. Activadores e inhibidores de Nrf2

#### 4.4. EFECTOS DE LA ACTIVACIÓN DE Nrf2

Como se ha mencionado anteriormente, la unión de Nrf2 con las secuencias ARE/EpRE del ADN da lugar a la activación de la transcripción de genes que codifican para proteínas implicadas en mecanismos de defensa antioxidante, entre las que destacan las enzimas de detoxificación de fase II como la NQO1, GST o UGT, que reducen la electrofilicidad de los metabolitos generados en la fase I por conjugación con compuestos como el GSH, las proteínas de respuesta a estrés como HO-1, y enzimas antioxidantes como TRx, SOD1 y 2, GPx, GR o catalasa, entre otras (Yamamoto *et al.*, 2018).

**HO-1** es la enzima limitante en el catabolismo del grupo hemo, proceso enzimático que da lugar a la formación de biliverdina, hierro y monóxido de carbono (CO). La biliverdina es rápidamente convertida en bilirrubina por acción de la biliverdina reductasa (Drummond *et al.*, 2019). HO-1 puede ser inducida por diferentes estímulos como estatinas, prostaglandinas, citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$  y estrés oxidativo. En la pared vascular, HO-1 se expresa principalmente en las células endoteliales, aunque también se expresa en el resto de tipo celulares (Medina *et al.*, 2020). Tanto HO-1 como la biliverdina y la bilirrubina que se generan por su actividad, son potentes antioxidantes. Por su parte, CO actúa como segundo mensajero y tiene funciones vasodilatadoras y antiinflamatorias (Martínez-Casales *et al.*, 2021; Ryter, 2022).

**NQO1** es una enzima que se expresa principalmente en el hígado, en el riñón y en el sistema cardiovascular; puede ser inducida por gran variedad de estímulos, entre los que se encuentran compuestos oxidantes, electrofílicos y fenólicos, estatinas o citoquinas proinflamatorias. NQO1 es una oxidorreductasa citosólica que cataliza la reducción de diversas quinonas hasta sus correspondientes hidroquinonas, usando como donadores tanto NADH como NAD(P)H, previniendo así la formación de semiquinonas y ROS (Lee *et al.*, 2021). En este sentido, Zhu *et al.* (2007) observaron que NQO1 ejercía un papel antioxidante por la eliminación de  $O_2^{\cdot-}$ .

Las **SOD** son oxidorreductasas que participan en la regulación del equilibrio redox catalizando la dismutación del  $O_2^{\cdot-}$  a  $O_2$  y  $H_2O_2$ . Como se ha comentado, en mamíferos existen tres isoformas de esta enzima, citosólica (SOD1 o Cu/Zn-SOD), mitocondrial (SOD2 o Mn-SOD) y extracelular



(SOD3 o EC-SOD). Estas enzimas son inducidas principalmente por ROS, aunque su expresión también puede estar regulada por el factor de transcripción Nrf2 (Lee and Hu, 2020).

Como hemos mencionado a lo largo de esta introducción, Nrf2 desempeña un papel fundamental en la defensa **antioxidante**. A este respecto, se ha descrito que la activación de Nrf2 reduce el estrés oxidativo inducido por Ang II, tanto en CMLV como en arterias de ratas espontáneamente hipertensas propensas a sufrir ictus (SHR-SP) (Lopes *et al.*, 2015). También se ha visto que el aumento de la expresión de Nrf2/HO-1 protege frente al daño hepático a través de la reducción en la producción de ROS (Yang *et al.*, 2022). Asimismo, la activación de Nrf2/HO-1/NQO1 reduce la producción de ROS y la peroxidación lipídica inducida por palmitato en células endoteliales y mejora la disfunción endotelial en aorta de ratón (Mahmoud *et al.*, 2017). Por otro lado, la inhibición de Nrf2 en ratones tratados con compuestos oxidantes agrava el estrés oxidativo, contribuyendo a la generación de daños renales (Farooqui *et al.*, 2021). Además, en ratones ApoE deficientes en HO-1 se produce un aumento en el grosor de la capa íntima de las arterias que contribuye al desarrollo de la lesión aterosclerótica, probablemente debido al aumento del estrés oxidativo (Yet *et al.*, 2003). Por otra parte, la reducción del estrés oxidativo tras la activación de Nrf2 está implicada en la reducción de la **migración** y la **proliferación** descontrolada de las CMLV inducida por factores como TNF- $\alpha$  o PDGF (Choi *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2022).

Recientemente se han descrito nuevos genes diana de Nrf2 y se han revelado nuevas funciones de este factor de transcripción que van más allá de su capacidad de regular el equilibrio redox. Entre estas funciones cabe destacar la regulación de varios procesos como son la inflamación, a través de la reducción de la expresión de mediadores proinflamatorios como NF- $\kappa$ B, la autofagia, a través de la inducción de genes que regulan este proceso como p62/SQSTM1, el metabolismo celular, la función mitocondrial o los procesos de migración y proliferación celular, entre otras (Jiang *et al.*, 2015; Ahmed *et al.*, 2017; He *et al.*, 2020). Por lo tanto, además del efecto antioxidante, cabe destacar también el efecto **antiinflamatorio** de Nrf2 (Ahmed *et al.*, 2017). Así, se ha descrito que ratones deficientes en Nrf2 son hipersensibles al shock séptico (Thimmulappa, 2006), muestran una inflamación pulmonar más severa inducida por el humo de los cigarrillos (Iizuka *et al.*, 2005), son muy susceptibles a diferentes modelos de inflamación hepática (Tang, 2014a) y presentan elevada expresión de COX-2, iNOS, IL-6 y TNF- $\alpha$  en enfermedades como el Parkinson (Rojo *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha visto que la activación de Nrf2 previene la inflamación en aortas de ratón tratadas con LPS al inhibir la señalización p38-VCAM-1 y la consecuente activación de las células endoteliales vasculares (Zakkar *et al.*, 2009). Además, la activación de Nrf2 protege frente a la inflamación característica de patologías cardiovasculares y metabólicas (Mimura and Itoh, 2015; Breuss *et al.*, 2019; Da Costa *et al.*, 2019; He *et al.*, 2020; Tanase *et al.*, 2022).

En cultivos celulares, se ha descrito que la activación de Nrf2 conduce a una reducción de la expresión de COX-2 e iNOS en CMLV (Ho *et al.*, 2007) y de IL-6, TNF- $\alpha$ , COX-2 e iNOS en condrocitos estimulados con la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  (Wu *et al.*, 2018). También se ha visto que la activación de Nrf2 inhibe la producción y secreción de citoquinas proinflamatorias inducidas por oxihemoglobina (Zhao *et al.*, 2013) y por lipoproteínas de baja densidad oxidadas (ox-LDL) en CMLV (Zhao *et al.*, 2020a). Del mismo modo, la activación de este factor de transcripción reduce la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 y MCP-1 inducidas

por TNF- $\alpha$  (Chen *et al.*, 2006) y la señalización p38-VCAM-1 (Zakkar *et al.*, 2009) en células de endotelio vascular. En macrófagos, la activación de Nrf2 y de sus proteínas diana HO-1 y NQO1 protege eficazmente frente a la inflamación inducida por LPS (Rushworth *et al.*, 2008). Además, se ha observado una mayor susceptibilidad a la inflamación inducida por LPS en macrófagos obtenidos de ratones Nrf2<sup>-/-</sup>, asociada a niveles elevados de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , COX-2 e iNOS (Lin *et al.*, 2008).

Nrf2 también puede actuar inhibiendo de manera directa la transcripción de genes que codifican para citoquinas proinflamatorias. Así, Nrf2 se une directamente a las regiones próximas al promotor de los genes que codifican para IL-6 e IL-1 $\beta$ , bloqueando la unión de la ARN polimerasa II e impidiendo la expresión de estos genes (Kobayashi *et al.*, 2016). Además, se ha descrito que Nrf2 inhibe la transcripción inducida por ROS del inflammasoma NLRP3 (proteína 3 que contiene dominios, NOD, LRR y PYD), encargado de la síntesis y el procesamiento de IL-1 $\beta$  e IL-18 (Liu *et al.*, 2017). Por otra parte, Nrf2 regula negativamente la señalización del factor de transcripción NF- $\kappa$ B reduciendo el estrés oxidativo, que es una de las señales de activación de NF- $\kappa$ B (Chen *et al.*, 2017) o inhibiendo la degradación del regulador negativo de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B- $\alpha$ , impidiendo así su translocación al núcleo (Yerra *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2017).

Por otro lado, Nrf2 también participa en la regulación de la **autofagia**. La autofagia es un mecanismo por el cual las proteínas o agregados proteicos y los orgánulos viejos o dañados presentes en el citosol son incluidos en vesículas conocidas como autofagosomas. Estas vesículas se fusionan con los lisosomas formando autofagolisosomas, los cuales eliminan, por degradación proteolítica, los componentes celulares que se encuentran en mal estado y reciclan aquellos que se encuentran en buen estado (Moreau *et al.*, 2010). Nrf2 induce la expresión de la proteína reguladora de la autofagia p62/SQSTM1 en respuesta al estrés oxidativo, dando lugar a la activación de este proceso que participa en la regulación del correcto metabolismo de las células (Pajares *et al.*, 2016). p62, a su vez, a través de la represión de Keap1, activa Nrf2, tal y como se ha comentado anteriormente, creando así un bucle de retroalimentación positiva (Jiang *et al.*, 2015; He *et al.*, 2020).

Nrf2 también participa en la regulación de la **apoptosis** o muerte celular programada. Así, se ha descrito que la activación de este factor de transcripción inhibe el aumento de la apoptosis inducido por Ang II en cardiomiocitos (Wang *et al.*, 2022). Por otro lado, la activación de Nrf2 induce la apoptosis de las CMLV con el objetivo de eliminar las células innecesarias (por ejemplo, aquellas que han aumentado su tasa de migración y proliferación tras un daño) para mantener la homeostasis en la pared celular (Ashino *et al.*, 2016).

#### 4.5. Nrf2 Y ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Como se ha comentado anteriormente, el estrés oxidativo y la inflamación juegan un papel importante en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares, por lo que la activación de Nrf2, factor clave en la defensa antioxidante y antiinflamatoria del organismo, podría constituir un mecanismo beneficioso frente a las alteraciones que tienen lugar en estas patologías, como el remodelado, la rigidez vascular o la disfunción endotelial (Mimura and Itoh, 2015; Da Costa *et al.*, 2019; Tanase *et al.*, 2022). En este sentido, la desregulación del factor de transcripción Nrf2 está estrechamente relacionada con diversas enfermedades cardiovasculares

(Satta *et al.*, 2017), neurodegenerativas o el cáncer (Liu *et al.*, 2021); aunque los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de Nrf2 en estas enfermedades son a veces contradictorios (Harada *et al.*, 2012; Gómez-Guzmán *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2015; Mimura and Itoh, 2015; Wang *et al.*, 2023), cada vez cobra más importancia el papel protector de este factor de transcripción (Alonso-Piñeiro *et al.*, 2021; Tanase *et al.*, 2022).

Los activadores de Nrf2 parecen ser beneficiosos en el tratamiento de la **obesidad** y de la **diabetes** (Da Costa *et al.*, 2019). Así, la activación de Nrf2 por CDDO-Imidazol, a través de la reducción de estrés oxidativo, protege frente al desarrollo de obesidad en ratones tratados con dieta alta en grasa (Shin *et al.*, 2009), un modelo de obesidad en el cual se ha observado una reducción de la activación de Nrf2, acompañada de aumentados niveles de Keap-1 y de una disminución en la expresión y actividad de diversas enzimas reguladas por este factor de transcripción (Costa *et al.*, 2022). En ratones obesos deficientes para Nrf2, se ha observado un aumento en la acumulación de lípidos y en la producción de ROS (Tanaka *et al.*, 2008). Por su parte, curcumina redujo el estrés oxidativo, la inflamación y la hipertrofia en células cardíacas tratadas con palmitato (Zeng *et al.*, 2015) y sulforafano redujo la proliferación descontrolada de las CMLV inducida por leptina (Shawky *et al.* 2016). Adicionalmente, se ha descrito una reducida activación de Nrf2 en modelos experimentales de cardiomiopatía diabética (Satta *et al.*, 2017). La activación de Nrf2 mejora la disfunción endotelial asociada a esta patología (Alves-Lopes *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2017) a través de mecanismos que implican la reducción del estrés oxidativo vascular y el aumento de la disponibilidad de NO (Pereira *et al.*, 2017). Además, la activación de Nrf2 reduce el estrés oxidativo y la fibrosis en cardiomiocitos en modelos experimentales de cardiomiopatía diabética (Li *et al.*, 2019).

La **aterosclerosis** es una enfermedad que cursa con estrés oxidativo e inflamación, y se asocia a factores de riesgo como la obesidad, la diabetes o la hipertensión. Durante el proceso de aterogénesis, la acumulación de lípidos en la capa íntima de los vasos da lugar a la activación de las células endoteliales, al reclutamiento y la activación de células del sistema inmune que producen y secretan citoquinas y ROS de manera persistente induciendo la oxidación de las LDL, la migración y la proliferación de CMLV y la disfunción endotelial. Las citoquinas proinflamatorias y las ox-LDL contribuyen al reclutamiento de monocitos mediante la inducción de un aumento en la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1, o MCP-1 (Zhu *et al.*, 2018). Todo ello contribuye al estrés oxidativo, a la inflamación, a la formación de células espumosas y al desarrollo de la placa aterosclerótica (Zhu *et al.*, 2018; Libby *et al.*, 2019). Numerosos estudios señalan el efecto beneficioso de la activación de Nrf2 en esta enfermedad. Por una parte, se ha descrito que la activación de Nrf2 atenúa la progresión de la placa de ateroma al inducir la expresión de genes antioxidantes (Mimura and Itoh, 2015). En este sentido, la deficiencia de GPx o la delección de HO-1 aumentan la formación de células espumosas y, en consecuencia, la producción de ROS y citoquinas proinflamatorias (Cheng *et al.*, 2013; Orozco *et al.*, 2007). Además, el desarrollo de lesiones ateroscleróticas y el estrés oxidativo se han visto agravados en ratones ApoE<sup>-/-</sup> deficientes para HO-1 (Yet *et al.*, 2003). Por su parte, la activación de HO-1 reduce la expresión de moléculas de adhesión por las células endoteliales (Zhang *et al.* 2013a), y los niveles de ROS evitando la oxidación de las LDL, lo que contribuye a prevenir la formación de las placas ateroscleróticas (Yao *et al.*, 2022). Adicionalmente, Tan *et al.* (2014) observaron que la activación de Nrf2 con el análogo de bardoxolona dh404 atenúa la aterosclerosis en ratones ApoE<sup>-/-</sup>. Sin embargo, la supresión del gen Nrf2 en ratones ApoE<sup>-/-</sup> disminuye las lesiones

ateroscleróticas en una fase tardía, lo que sugiere que la inhibición de Nrf2 en fases avanzadas de esta enfermedad sería ateroprotectora (Harada *et al.*, 2012). El aumento de la expresión de Nrf2 y de sus proteínas diana también protege frente a la aterosclerosis debido a su capacidad para mantener el fenotipo diferenciado y contráctil de las CMLV y para reducir la migración y la proliferación de estas células (Xu *et al.*, 2015).

La fisiopatología de la **hipertensión** se asocia también con un aumento del estrés oxidativo y de la inflamación, que va a dar lugar a disfunción endotelial y a remodelado vascular. Es por esto por lo que la activación del factor de transcripción Nrf2 podría tener efectos beneficiosos frente a las alteraciones que tienen lugar en esta enfermedad (Tanase *et al.*, 2022). Los niveles de Nrf2 pueden variar en función de los diferentes modelos de hipertensión. Así, mientras que en el modelo de hipertensión de ratas DOCA-*salt*, los niveles de Nrf2 y sus proteínas diana en diversos tejidos como aorta, riñón o corazón son más elevados que en sus correspondientes controles normotensos (Gómez-Guzmán *et al.*, 2012; Biernacki *et al.*, 2018a; Biernacki *et al.*, 2018b), Nrf2 se expresa en menor medida tanto en arterias y CMLV de ratas SHR-SP (Lopes *et al.*, 2015), como en células epiteliales renales de ratas SHR (Javkhedkar and Banday, 2015), en comparación con sus controles normotensos. Por otro lado, la activación de Nrf2 con bardoxolona y sulforafano, mejora la disfunción endotelial en ratas SHR-SP mediante la reducción del estrés oxidativo inducido por Ang II (Lopes *et al.*, 2015). Por su parte, la activación de Nrf2 con tBHQ previene el remodelado vascular, la disfunción endotelial y la elevada presión arterial en ratones hipertensos por infusión de Ang II, efectos que desaparecen en ratones Nrf2<sup>-/-</sup> (Wang *et al.*, 2018). Además, el tratamiento de ratas SHR con resveratrol redujo el estrés oxidativo, la inflamación renal, la expresión de Ang II y la presión arterial (Javkhedkar and Banday, 2015), mientras que tBHQ atenuó la hipertrofia cardíaca, la elevada presión arterial y los niveles plasmáticos de citoquinas inflamatorias observados en ratas hipertensas por ingesta de sal (Bai *et al.*, 2017).

## 5. INFLAMACIÓN VASCULAR

La inflamación es una respuesta del organismo para intentar restaurar la homeostasis tras estímulos nocivos, como una infección o un daño tisular. Una respuesta inflamatoria controlada y puntual actúa como mecanismo de defensa del organismo, pero puede acabar siendo perjudicial si se desregula y se mantiene en el tiempo, dando lugar a un estado de inflamación crónica (Medzhitov, 2008). En los últimos años se ha descrito que un estado inflamatorio crónico, generado por un desequilibrio entre los factores pro- y anti- inflamatorios, puede ser responsable de las alteraciones vasculares asociadas a enfermedades cardiovasculares como el infarto de miocardio, la hipertensión, la aterosclerosis, la obesidad o la diabetes. Muchas de estas enfermedades, como se ha comentado, también se han relacionado con niveles elevados de ROS en la pared vascular (Marchio *et al.*, 2019; Senoner and Dichtl, 2019; Goswami *et al.*, 2021; Krzemińska *et al.*, 2022).

Existen varios mecanismos/estímulos implicados en la regulación de la inflamación en la pared vascular, entre los que cabe destacar alteraciones en el flujo sanguíneo que dan lugar a cambios hemodinámicos, un aumento en los niveles de marcadores proinflamatorios, un aumento en la concentración de ácidos grasos o LDL y/o un aumento en los niveles de activación del sistema

renina angiotensina (Libby *et al.*, 2019; Xiao and Harrison, 2020). La inflamación vascular se inicia, generalmente, con la activación de las células endoteliales en respuesta a los estímulos mencionados, lo que induce un aumento de la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1 y MCP-1 y de la permeabilidad vascular, dando lugar a la atracción y reclutamiento de células del sistema inmune. Estas células infiltradas, así como las células del sistema inmune residentes en el tejido vascular (principalmente en el PVAT y en la capa adventicia), secretan citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  que, a través de la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B o AP-1, median la respuesta inflamatoria (Norlander *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2018; Xiao and Harrison, 2020). Además, estas citoquinas pueden ser producidas también por las células endoteliales, CMLV y fibroblastos de la pared vascular (Vila and Salaices, 2005; Loppnow *et al.*, 2008). Los mediadores proinflamatorios liberados por las células inmunes y las células de la pared vascular inducen un aumento de la producción y secreción de componentes de la MEC como las MMP (Wang and Khalil, 2018) y un aumento en la producción de ROS. Las ROS, a su vez, estimulan la producción de mediadores proinflamatorios y de más ROS, generando un bucle de retroalimentación positivo entre la inflamación y el estrés oxidativo (Dinh *et al.*, 2014). Además, la respuesta inflamatoria vascular induce el fenotipo sintético o proliferativo de las CMLV, aumentando su migración y proliferación y provocando un aumento en la secreción de componentes de la MEC por parte de estas (Frismaniene *et al.*, 2018; Basatemur *et al.*, 2019; Melton and Qiu, 2021). Todo ello participa en los procesos de remodelado vascular por aumento del grosor de la pared vascular, en la disfunción endotelial y en las alteraciones en la capacidad de contracción/relajación de los vasos (Laurent and Boutouyrie, 2015; Gimbrone and García-Cardena, 2016; Konukoglu and Uzun, 2016; Wang and Khalil, 2018; Zhu *et al.*, 2018; Libby *et al.*, 2019; Krzemińska *et al.*, 2022).

En resumen, las células de la pared vascular en coordinación con las células del sistema inmune pueden amplificar la señal inflamatoria al incrementar la secreción de citoquinas proinflamatorias, ROS y MMP, entre otros, dando lugar a alteraciones que contribuyen al desarrollo y la progresión de diversas patologías cardiovasculares (Loppnow *et al.*, 2008; Norlander *et al.*, 2018).

### 5.1. TLR4

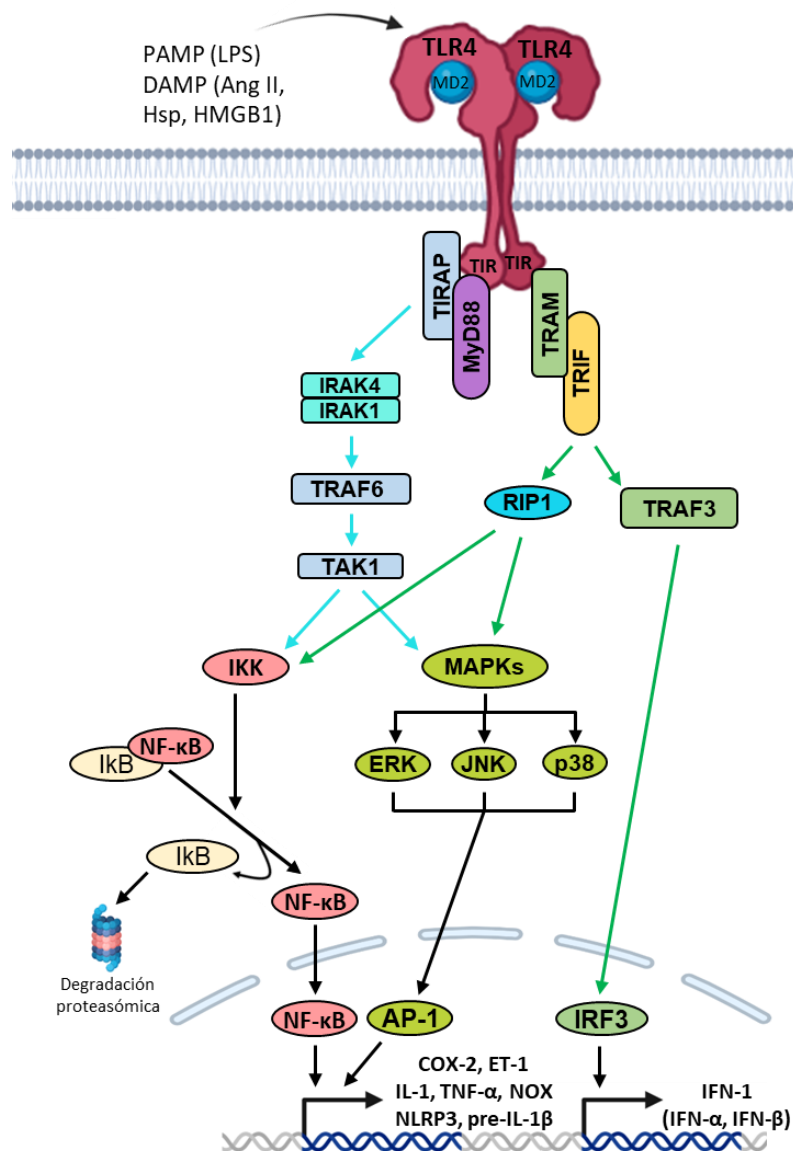
Los TLR son receptores pertenecientes a la familia de los PRR, que desempeñan un importante papel en la inmunidad innata y que reconocen tanto PAMP como DAMP. Los PRR pueden estar presentes tanto en la membrana celular como en compartimentos intracelulares y se clasifican en dos grandes grupos, PRR endocíticos o PRR de señalización. Entre los PRR de señalización se incluyen los TLR, receptores transmembrana presentes en la membrana celular (Kawai and Akira, 2007; Lu *et al.*, 2008).

Los TLR se caracterizan por presentar un dominio extracelular rico en repeticiones de leucina (LRR) en su extremo N-terminal, una región transmembrana y un dominio intracelular con homología al receptor de IL-1, el dominio TIR. Existen 10 tipos de TLR diferentes en humanos y 12 en roedores, cada uno de los cuales puede reconocer distintas PAMP y DAMP (Takeuchi and Akira, 2010; Gay *et al.*, 2014). TLR4 es uno de los TLR más estudiados y reconoce al LPS y al lipooligosacárido bacteriano, ambos presentes en la pared celular de las bacterias Gram negativas, siendo el LPS el que actúa como su principal ligando. Este receptor también puede

interaccionar con diferentes DAMP como ox-LDL, proteínas de choque térmico (Hsp), la proteína HMGB1 (proteína de alta movilidad del grupo 1), el ácido hialurónico o el ácido úrico (Ciesielska *et al.*, 2021). TLR4 se expresa, principalmente, en células del sistema inmune como los macrófagos, pero también en células del sistema cardiovascular como los cardiomiocitos, las células endoteliales y las CMLV (Vaure and Liu, 2014; Nunes *et al.*, 2019). Tras la interacción con el ligando, los TLR desencadenan la señal por su unión a MyD88 (factor de diferenciación mieloide 88), proteína adaptadora de todos los TLR menos de TLR3, o a TRIF (adaptador inductor de interferón- $\beta$  que contiene dominios TIR), proteína adaptadora de TLR3 y TLR4 (Kawai and Akira, 2007). La señalización mediada por estos receptores da lugar a la activación de vías que inducen la expresión y activación de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12 e IFN-1, la liberación de péptidos antimicrobianos, la producción de ROS y especies reactivas de nitrógeno y la maduración de las células presentadoras de antígeno del sistema inmune (Kawai and Akira, 2007; Takeuchi and Akira, 2010). Debido a que los dominios TIR de los TLR son similares a los dominios TIR de los receptores de interleuquinas, las vías de señalización intracelular de estos receptores convergen, como se comentará posteriormente (Abbate *et al.*, 2020; Koushki *et al.*, 2021).

TLR4 es sintetizado en el retículo endoplasmático y transportado al aparato de Golgi, donde normalmente se une a la proteína MD2 (factor de diferenciación mieloide 2) para ser transportado posteriormente a la membrana plasmática (Gay *et al.*, 2014; Ciesielska *et al.*, 2021). Una vez en la membrana plasmática, TLR4 interacciona con LPS a través de proteínas accesorias como la proteína de unión a LPS (LBP), CD14 y MD2. El proceso de unión ligando-receptor empieza con la interacción del LPS con la proteína LBP, lo que da lugar al reclutamiento de CD14 e induce la transferencia del LPS al complejo MD2-TLR4; LPS interacciona de manera directa con MD2, dando lugar a la homodimerización y a la activación de TLR4 (Vaure and Liu, 2014; Ciesielska *et al.*, 2021).

Como hemos comentado, TLR4 activa dos vías de señalización: la vía dependiente de MyD88 y la vía independiente de MyD88 o dependiente de TRIF. En la **vía dependiente de MyD88**, la interacción ligando-receptor induce el reclutamiento de MyD88 y de TIRAP (proteína adaptadora que contiene dominio TIR, también conocida como proteína adaptadora de MyD88, MAL). MyD88, además de un dominio TIR, presenta un dominio DD (dominio de muerte) que permite la interacción con IRAK-4 (proteína quinasa asociada al receptor de IL-1-4). IRAK-4 activa otras proteínas quinasas como IRAK-1 e IRAK-2. Todo esto permite el reclutamiento al complejo de la proteína E3 ubiquitina ligasa TRAF6 (factor 6 asociado al receptor de TNF) y de la proteína quinasa TAK1 (quinasa 1 activada por TGF- $\beta$ ), dando lugar a la transducción de señal y a la activación de IKK (quinasa del inhibidor de NF- $\kappa$ B I $\kappa$ B) y de las MAPK (ERK, JNK, p38), que van a activar los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1 respectivamente (Lu *et al.*, 2008; Takeuchi and Akira, 2010). En conjunto, las vías de señalización dependientes de MyD88 activan la expresión de genes que codifican para mediadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 o COX-2, entre otros (Kawai and Akira, 2007; Küper *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2019) (**Figura 17**). También se ha descrito que TLR4 participa en la activación canónica del inflamasoma NLRP3 que induce la liberación de IL-1 $\beta$  (Ciesielska *et al.*, 2021; Koushki *et al.*, 2021).



**Figura 17. Esquema de las vías de señalización reguladas por el receptor TLR4.** Flechas azules: vía de señalización dependiente de MyD88; flechas verdes: vía de señalización independiente de MyD88 o dependiente de TRIF; flechas negras: elementos comunes a las dos vías. Ang II: angiotensina II; AP-1: proteína activadora-1; COX-2: ciclooxigenasa 2; DAMP: patrones moleculares asociados a daños; ERK: quinasa regulada por señales extracelulares; ET-1: endotelina-1; HMGB1: proteína de alta movilidad perteneciente al grupo de caja 1; Hsp: proteínas de choque térmico; IKK: quinasa del inhibidor de NF-κB; IL-1β: interleuquina-1β; INF-1/α/β : interferón-1/α/β; IRAK1/4: proteína quinasa asociada al receptor de IL-1 1/4; IRF3: factor regulador de interferón 3; IκB: inhibidor de NF-κB; JNK: quinasa del extremo N-terminal de c-jun; LPS: lipopolisacárido bacteriano; MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos; MD2: factor de diferenciación mieloides 2; MyD88: factor de diferenciación mieloides 88; NF-κB: factor nuclear activador de la síntesis de la cadena ligera κ de linfocitos B; NLRP3: proteína 3 que contiene dominios NOD, LRR y pirina; NOX: óxido nítrico sintasa; PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos; RIP1: proteína de interacción con el receptor 1; TAK1: quinasa 1 activada por el factor de crecimiento TGF-β; TIR: dominio con homología al receptor de IL-1; TIRAP: proteína adaptadora que contiene dominio TIR; TLR4: receptor toll like 4; TNF-α: factor de necrosis tumoral α; TRAF-3/6: factor asociado al receptor de TNF-3/6; TRAM: proteína adaptadora de la vía independiente de MyD88; TRIF: adaptador inductor de interferón-β que contienen dominios TIR. Adaptada de Lu *et al.*, 2008. Creada con BioRender.

En la **vía independiente de MyD88** se señala a través de la proteína TRIF. La molécula adaptadora asociada a TRIF (TRAM o TICAM2) permite la interacción de TRIF con TRAF3 (factor 3 asociado al receptor de TNF), proteína que media la transducción de señal y que va a dar lugar a la activación del factor de transcripción IRF3 (factor regulador de interferón 3), el cual en última instancia induce la expresión de IFN-1, que participa en la defensa frente a bacterias y virus. A través de esta vía dependiente de TRIF, también puede activarse la proteína RIP-1 (proteína de interacción con el receptor 1), que media la activación de NF- $\kappa$ B, MAPK o AP-1 (Lu *et al.*, 2008; Takeuchi and Akira, 2010) (**Figura 17**).

La activación de TLR4 por LPS puede desencadenar la señalización a través de la vía dependiente o independiente de MyD88; sin embargo, la activación por la acción de agonistas endógenos como la Ang II, Hsp, HMGB1 o el ácido úrico, cuyos niveles están elevados en patologías cardiovasculares, desencadenan la transducción de señal a través de la vía dependiente de MyD88 principalmente (Piccinini and Midwood, 2010; Hernanz *et al.*, 2015; Ciesielska *et al.*, 2021).

Aunque la activación de TLR4 es necesaria para el correcto funcionamiento de la respuesta inmune innata y adaptativa, una activación excesiva de este receptor puede dar lugar a la aparición de patologías cardiovasculares, debido a su capacidad de inducir la producción de citoquinas proinflamatorias y estrés oxidativo. En este sentido, se ha descrito que TLR4 participa en el desarrollo y la progresión de enfermedades como la diabetes, la hipertensión y la aterosclerosis, en las cuales sus niveles están incrementados (Roshan *et al.*, 2016; Nunes *et al.*, 2019; de Oliveira and Nunes, 2021). TLR4 contribuye a la inflamación, a la disfunción endotelial y al remodelado vascular asociados a estas patologías a través de mecanismos que implican la expresión de Ang II, COX-2, citoquinas proinflamatorias y la producción de ROS (Michelsen *et al.*, 2004; den Dekker *et al.*, 2010; Bomfim *et al.*, 2012; Küper *et al.*, 2012; De Batista *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014b; Hernanz *et al.*, 2015; de Oliveira and Nunes, 2021). Se ha descrito que la activación de TLR4 por HMGB1 induce disfunción endotelial en ratones diabéticos, probablemente a través de la reducción de la actividad de la eNOS y, por consiguiente, de la biodisponibilidad de NO (Zhu *et al.*, 2020b). Además, el bloqueo del receptor TLR4 reduce el remodelado vascular y mejora la disfunción endotelial a través de mecanismos que implican un aumento en la producción de NO y la reducción de los niveles de ROS (De Batista *et al.*, 2014; Hernanz *et al.*, 2015; Nakashima *et al.*, 2015).

Se ha descrito que TLR4 juega un papel en el mantenimiento del fenotipo de las CMLV. Así, la activación de TLR4 por su ligando LPS induce la desdiferenciación de CMLV de rata, a la vez que induce un aumento en la proliferación de estas células (Yin *et al.*, 2017). La migración de las CMLV de ratón también aumenta en respuesta a la activación de TLR4/MAPK/IL-6 inducida por LPS (Lee *et al.*, 2016). Además, TLR4 contribuye a la regulación de estos procesos en respuesta a estímulos endógenos. Así, Yang *et al.* (2012) observaron que la activación de TLR4 por HMGB1 induce la migración de CMLV y de Graaf *et al.* (2006) que la activación de este receptor por Hsp60 inducía la proliferación de estas células. En conjunto, estos trabajos describen la participación de TLR4 en los procesos de proliferación y migración celular, que, como se ha mencionado anteriormente, son procesos implicados de manera directa en el remodelado vascular.



## 5.2. IL-1 $\beta$

La IL-1 se describió originalmente en la década de 1940 como una sustancia inductora de fiebre liberada por los leucocitos. Actualmente se sabe que la función principal de las interleuquinas pertenecientes a la familia de las IL-1, que comprende 11 miembros, es la regulación de la reacción proinflamatoria en respuesta a los daños originados por PAMP y DAMP, y que actúan como los mediadores principales de la respuesta inmune innata. A la familia de las IL-1 pertenecen las citoquinas IL-1 $\alpha$  e **IL-1 $\beta$** . Ambas comparten una estructura similar y son secretadas como precursores. El precursor de IL-1 $\alpha$ , al contrario que el precursor de IL-1 $\beta$ , es funcional. Ambas citoquinas han de ser procesadas por el inflamasoma para dar lugar a su forma madura, que en el caso de IL-1 $\beta$ , es su forma funcional (Dinarelli, 2018; Pfeiler *et al.*, 2019; Abbate *et al.*, 2020).

### 5.2.1. Procesamiento de IL-1 $\beta$

IL-1 $\beta$  es sintetizada inicialmente como pro-IL-1 $\beta$ , precursor inactivo que permanece en el interior celular. El procesamiento de la pro-IL-1 $\beta$  es llevado a cabo por la caspasa-1, la proteína efectora del inflamasoma NLRP3 (Kelley *et al.*, 2019; Pfeiler *et al.*, 2019). Una vez procesada, la forma madura de la IL-1 $\beta$  es secretada al exterior celular y puede actuar de manera autocrina, paracrina o sistémica (Weber *et al.*, 2010; Lopez-Castejon and Brough, 2011; Piccioli and Rubartelli, 2013; Pfeiler *et al.*, 2019).

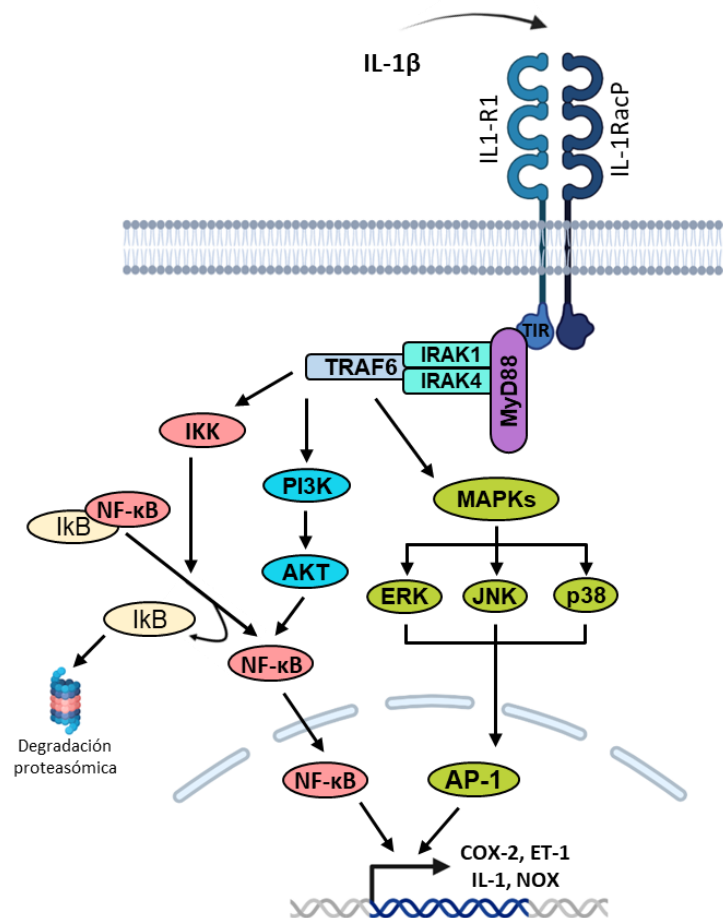
Los inflamasomas son complejos multiproteicos de señalización que inducen la respuesta inflamatoria al ser activados por estímulos estresantes exógenos o endógenos (PAMP o DAMP). Existen aproximadamente 20 tipos de inflamasomas, siendo el inflamasoma NLRP3 uno de los más conocidos. La activación del inflamasoma NLRP3 promueve el procesamiento y la maduración de pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18, lo que aumenta el proceso inflamatorio. NLRP3 está formado por una proteína NLRP3 que actúa como sensor, una proteína adaptadora ASC (proteína tipo Speck asociada a la apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento de caspasa) y la procaspasa-1. La activación del sensor NLRP3 induce el reclutamiento de ASC, formando el complejo NLRP3-ASC; a continuación, ASC induce la activación de la procaspasa-1 que se transforma en caspasa-1, la cual provoca el procesamiento de los precursores pro-IL-1 $\beta$  (31 kDa) y pro-IL-18 (24 kDa) para transformarlos en las citoquinas proinflamatorias maduras IL-1 $\beta$  (17 kDa) e IL-18 (18 kDa), que son liberadas al espacio extracelular donde van a realizar su acción (Kelley *et al.*, 2019).

La activación de NLRP3 suele llevarse a cabo por la vía canónica, que requiere dos pasos. Un primer paso de preparación del inflamasoma, inducido principalmente por la activación de la vía TLR/NF- $\kappa$ B o AP-1 tras estímulos inflamatorios u oxidantes, que implica la inducción de la expresión de los componentes de NLRP3, así como de pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18. El segundo paso implica el ensamblaje del inflamasoma, que da lugar a su activación. Este segundo paso puede ser activado por gran variedad de estímulos estresantes como LPS, ATP, ox-LDL, citoquinas proinflamatorias, HMGB1 o GMPC, entre otros (Swanson *et al.*, 2019). También las ROS son importantes moléculas implicadas en la activación de este inflamasoma (Harjith *et al.*, 2014). Por otro lado, existen vías de señalización como la de la proteína quinasa dependiente de AMPc, la de AMPK (proteína quinasa activada por AMP) y la autofagia, que producen la inhibición de NLRP3, lo que puede deberse, al menos en parte, a la reducción de los niveles de ROS (Chen *et*

*al.*, 2021). Además de todos estos factores, NLRP3 también se puede activar por vías no canónicas, pero estas son menos conocidas (Kelley *et al.*, 2019).

### 5.2.2. Señalización de IL-1 $\beta$

Existen tres receptores con los que IL-1 $\beta$  interacciona: el receptor de IL-1 de tipo 1 (IL-1R1), el de tipo 2 (IL-1R2) y el de tipo 3 (IL-1R3). IL-1R2 carece de dominio intracelular por lo que, aunque puede interaccionar con IL-1 $\beta$ , actúa como receptor trampa y no da lugar a la transducción de señales (Colotta *et al.*, 1993). IL-1R1, expresado en todas las células, es el receptor que interacciona con IL-1 $\beta$ , mientras que IL-1R3 (también conocido como proteína accesoria del receptor 1, IL-1RacP) actúa como cofactor uniéndose a IL-1R1 y originando la formación de heterotrímeros (Dinarelli, 2018; Pfeiler *et al.*, 2019; Abbate *et al.*, 2020). La interacción de IL-1RacP e IL-1R1 induce un cambio conformacional que inicia la señalización mediada por la citoquina. Así, los dominios intracelulares de ambos receptores, que contienen un dominio TIR, se aproximan y permiten la unión a MyD88, que va a activar la quinasa IRAK1, la cual a su vez va a fosforilar a IRAK4, dando lugar a una cascada de señalización que resulta en la activación de las MAPK, de la vía PI3K/Akt, de IKK y, en última instancia, de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B y AP-1. Todo ello induce la expresión de mediadores proinflamatorios como IL-6, MCP-1, COX-2 o ET-1, entre otros (McCulloch *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2010) (Figura 18). La activación de la señalización mediada por IL-1 $\beta$  también provoca un aumento de la producción de ROS mediante la activación de enzimas como la NAD(P)H oxidasa o la eNOS desacoplada, principalmente (Vila and Salices, 2005; Martín *et al.*, 2012; Aguado *et al.*, 2016). Además, IL-1 $\beta$  puede de inducir la expresión de su propio gen, generando así un ciclo de retroalimentación positiva (Weber *et al.*, 2010).



**Figura 18. Esquema de la vía de señalización de IL-1 $\beta$ .** AP-1: proteína activadora-1; Akt; proteína quinasa B; COX-2: ciclooxigenasa 2; ERK: quinasa regulada por señales extracelulares; ET-1: endotelina-1; IKK: quinasa del inhibidor de NF- $\kappa$ B; IL-1R1: receptor de IL-1 tipo 1; IL-1RacP: proteína accesoria del receptor de IL-1; IL-1 $\beta$ : interleuquina-1 $\beta$ ; IRAK1/4: proteína quinasa asociada al receptor de IL-1 1/4; I $\kappa$ B: inhibidor de NF- $\kappa$ B; JNK: quinasa del extremo N-terminal de c-jun; MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos; MyD88: factor de diferenciación mieloides 88; NF- $\kappa$ B: factor nuclear activador de la síntesis de la cadena ligera  $\kappa$  de linfocitos B; NOX: óxido nítrico sintasa; PI3K; fosfatidil inositol -3-quinasa; TIR: dominio con homología al receptor de IL-1; TRAF-6: factor asociado al receptor de TNF-6. Modificada de McCulloch *et al.*, 2006. Creada con BioRender.

Se ha descrito la existencia de una relación entre las vías de señalización de IL-1 $\beta$  y TLR4. Como se ha comentado anteriormente, los dominios TIR del receptor IL-1R son similares a los dominios TIR de los TLR, de manera que las vías de IL-1R y TLR4 convergen en la señalización intracelular a través de la activación de MyD88 (Dinarello, 2018; Abbate *et al.*, 2020). Además, en los últimos años se ha sugerido una posible conexión entre TLR4 e IL-1 $\beta$ . Así, se ha descrito que IL-1 $\beta$  activa la vía de señalización TLR4 (Liu *et al.*, 2014; Gu *et al.*, 2017), efecto que desaparece al inhibir al receptor TLR4 (Liu *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2020). En CMLV, se ha observado que IL-1 $\beta$  puede inducir el aumento de la expresión del receptor TLR4 (Jaulmes *et al.*, 2006). Aunque a día de hoy, hasta donde nosotros sabemos, no se conoce el mecanismo exacto por el que las vías de IL-1 $\beta$  y TLR4 interactúan, se ha propuesto que algunas de las moléculas cuya expresión es inducida por IL-1 $\beta$ , como por ejemplo HMGB1, pueden interactuar con el receptor TLR4 actuando como ligandos endógenos del mismo (Jaulmes *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2015).

Además de participar en la respuesta proinflamatoria, numerosos estudios sugieren la implicación de IL-1 $\beta$  en la modulación fenotípica de las CMLV y en la regulación de la función de estas células. Con respecto a esto, se ha observado que IL-1 $\beta$  induce la migración de las CMLV de rata mediante la producción y secreción de MMP2 (Wang *et al.*, 2011) y que, a través del aumento en la expresión de la enzima COX-2 y en la producción de ROS, incrementa tanto la proliferación como la migración de estas células (Martín *et al.*, 2012; Aguado *et al.*, 2015; 2016). Por otra parte, el aumento de los niveles del inhibidor natural del receptor de IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, inducido por PPAR $\delta$  abole la migración y la proliferación estimuladas por esta citoquina en CMLV de rata (Kim *et al.*, 2010). Es también conocido que el inflamasoma NLRP3, a través del procesamiento y la activación de IL-1 $\beta$ , participa en la regulación de la migración y la proliferación de las CMLV. Así, la inhibición de NLRP3 con antioxidantes como la curcumina reduce la migración de las CMLV en ratas SHR, lo que se debe, al menos en parte, a la reducción de los niveles de IL-1 $\beta$  y a la disminución de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Han *et al.*, 2019). También se ha descrito que una reducción en la actividad de NLRP3 por inhibición de la vía de TLR4 da lugar a una disminución en los niveles de IL-1 $\beta$ , lo que contribuye a reducir la proliferación de las CMLV (Qi *et al.*, 2021).

IL-1 $\beta$  está implicada en diversas patologías cardiovasculares. Así, se ha descrito que los niveles aumentados de la citoquina IL-1 $\beta$  en pacientes hipertensos, diabéticos, con aterosclerosis o con aneurismas, contribuyen a la aparición de alteraciones vasculares y que, además, ese aumento está relacionado con una mayor severidad de estas patologías en la mayoría de los casos (Krishnan *et al.*, 2014; Dinarello, 2018; Pfeiler *et al.*, 2019; Mai and Liao, 2020; Melton and Qiu, 2021). En este sentido, el antagonista del receptor de IL-1 IL-1Ra reduce el aumento de la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, y ET-1 inducido por Ang II, mecanismo por el que produce reducción de la presión arterial y el daño renal en ratones tratados con este péptido (Akita *et al.*, 2021). Por otro lado, se ha descrito que la ausencia del inhibidor IL-1Ra promueve el incremento del grosor de la capa íntima de las arterias de ratón (Isoda *et al.*, 2003) y que, además, agrava el daño vascular producido por la delección de ApoE en ratones, dando lugar a una inflamación aórtica grave con infiltración de macrófagos (Merhisoussi *et al.*, 2005).

### 5.3. COX-2

Como ya comentamos, la COX-2 es una enzima inducible y su expresión puede aumentar por acción de estímulos inflamatorios y por el estrés oxidativo (Féléto *et al.*, 2011; Mitchell *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2021). Esta enzima es la fuente principal de prostaglandinas durante la inflamación (Tanabe and Tohnai, 2002) y, a su vez, es una fuente de ROS (Wu *et al.*, 2011; Viridis *et al.*, 2013; Jurk *et al.*, 2014; Kim and Shim, 2016). Además, COX-2, a través del aumento de mediadores proinflamatorios, puede inducir la expresión de más COX-2, generando así un bucle de retroalimentación positiva entre esta enzima y la inflamación (Martínez-Revelles *et al.*, 2013; Hernanz *et al.*, 2014; Beccacece *et al.*, 2023). El promotor del gen que codifica la expresión de COX-2 presenta sitios de unión para diferentes factores de transcripción, entre los que cabe destacar los factores de transcripción proinflamatorios NF- $\kappa$ B o AP-1 y la proteína CREB (Chun and Surh, 2004). Dependiendo del estímulo y del tipo celular, en la regulación de la expresión de COX-2 pueden participar varias vías de señalización. Así, las MAPK ERK y p38 están implicadas en el aumento de la expresión de COX-2 inducido por Ang II e IL-1 $\beta$  en CMLV y en fibroblastos adventiciales (Galán *et al.*, 2011; Aguado *et al.*, 2015; Ohnaka *et al.*, 2000). Por su parte, JNK, a

través de la activación del factor de transcripción AP-1, está implicada en el aumento de expresión de COX-2 inducido por ET-1 en CMLV (Palacios-Ramírez *et al.*, 2019). También el receptor TLR4, a través de la activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B o MAPK/AP-1, induce la expresión de COX-2 (Küper *et al.*, 2012; Yoon and Park, 2021).

Los prostanoideos sintetizados por la COX-2 son, mayoritariamente, prostaciclina y PGE<sub>2</sub> (Brock *et al.*, 1999), los cuales tienen un importante papel en la inflamación, en la agregación plaquetaria, en la regulación de la proliferación y la migración de las CMLV, en el control de la contracción/relajación de los vasos y en el remodelado vascular (Bos *et al.*, 2004). PGE<sub>2</sub> se considera además un prostanoide inflamatorio debido a su capacidad para inducir la expresión de mediadores proinflamatorios (Gomi *et al.*, 2000; Aoki *et al.*, 2011; Morimoto *et al.*, 2014). Niveles elevados de COX-2 se relacionan generalmente con vasoconstricción y se asocian con diversas patologías cardiovasculares como hipertensión, diabetes o aterosclerosis (Zhao *et al.*, 2021). Así, COX-2 contribuye al desarrollo de la lesión aterosclerótica por ox-LDL (Liang *et al.*, 2017); adicionalmente, se ha observado que el aumento en la expresión de COX-2 por los macrófagos presentes en dicha lesión induce inflamación y un aumento en la producción de MMP que contribuyen a la inestabilidad y la posible ruptura de la placa de ateroma (Cipollone *et al.*, 2001). Por su parte, Wang *et al.* (2019) observaron que la inducción de COX-2 por la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  da lugar al aumento de mediadores proinflamatorios, entre ellos la propia IL-1 $\beta$ , lo que genera un círculo de retroalimentación positiva que contribuye a la inflamación que se observa en la diabetes. Además, la inhibición de COX-2 reduce la vasculopatía diabética inducida por los productos finales de glicosilación avanzada (Yoon *et al.*, 2009).

A nivel vascular, se ha descrito la participación de COX-2 en la inducción de la migración y la proliferación celular (Hu *et al.*, 2002; Muraki *et al.*, 2012) y en el aumento del remodelado (Zhang *et al.*, 2013b; Renna *et al.*, 2013b) y de la rigidez vascular (Avendaño *et al.*, 2016; García-Redondo *et al.*, 2018). Niveles elevados de esta enzima inducidos por Ang II (Lopes *et al.*, 2022) o por ET-1 (Palacios-Ramírez *et al.*, 2019) dan lugar a disfunción endotelial y vasoconstricción en aortas. Además, los niveles de COX-2 están elevados en arterias de pacientes hipertensos, en los cuales se observa un aumento de estrés oxidativo y una disminución en la biodisponibilidad de NO, mecanismo que explicaría la vasoconstricción aumentada que presentan estos pacientes (Virdis *et al.*, 2013). En este sentido, la inhibición de COX-2 reduce la elevada presión arterial y la disfunción endotelial en ratones hipertensos por infusión con Ang II (Martínez-Revelles *et al.*, 2013).

En resumen, la inflamación vascular es un importante factor de riesgo para las alteraciones vasculares asociadas al desarrollo de enfermedades cardiovasculares.

Por ello, en esta Tesis Doctoral se profundizará en los mecanismos implicados en la inflamación inducida por la citoquina IL-1 $\beta$ , centrándose en el estudio de la posible participación de la vía de señalización del receptor TLR4. Por otra parte, se analizará el efecto de la activación del factor de transcripción Nrf2 sobre la inflamación causada por IL-1 $\beta$ .



# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





## HIPÓTESIS

Como se ha mencionado anteriormente, la inflamación crónica está implicada en el desarrollo de alteraciones vasculares asociadas a patologías cardiovasculares. La inflamación en la pared vascular implica la infiltración de células del sistema inmune, la producción de citoquinas proinflamatorias y de ROS y la elevada expresión de enzimas proinflamatorias, tales como COX-2. La citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  participa en la inflamación vascular, generando estrés oxidativo y contribuyendo al desarrollo de alteraciones en el fenotipo y la función de las CMLV y al desarrollo de alteraciones vasculares como la rigidez, el remodelado y la disfunción endotelial que se asocian con el desarrollo de patologías vasculares. El receptor TLR4 también está implicado en la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo relacionados con el desarrollo de las alteraciones vasculares presentes en este tipo de enfermedades. Además, estudios recientes han descrito una conexión entre TLR4 e IL-1 $\beta$ , que podría contribuir a los efectos inducidos por la citoquina. Por otra parte, Nrf2 es un factor de transcripción sensible a estrés oxidativo cuya activación desencadena toda una maquinaria de vías antioxidantes y antiinflamatorias que juegan un importante papel en el mantenimiento del equilibrio redox del organismo.

Por todo ello, nuestra hipótesis es que la vía de TLR4 podría participar en el efecto inflamatorio y en el estrés oxidativo inducidos por IL-1 $\beta$  y que la activación de Nrf2 actuaría reduciendo los efectos deletéreos causados por esta citoquina en la pared vascular, de manera que podría tener un efecto beneficioso en determinadas patologías cardiovasculares.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar si la vía de TLR4 participa en los efectos proinflamatorios y prooxidantes inducidos por IL-1 $\beta$  y el posible papel protector de la activación del factor de transcripción Nrf2 frente a estos efectos.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Objetivo 1.** Analizar el efecto inflamatorio de IL-1 $\beta$  en CMLV de ratón y la participación del estrés oxidativo en dicho efecto.
- **Objetivo 2.** Estudiar si la vía de TLR4 participa en los efectos inflamatorios inducidos por IL-1 $\beta$ .
- **Objetivo 3.** Evaluar el efecto de IL-1 $\beta$  sobre la activación de Nrf2.
- **Objetivo 4.** Identificar los mecanismos implicados en la activación de Nrf2 por IL-1 $\beta$ , prestando especial atención a la participación del estrés oxidativo.
- **Objetivo 5.** Estudiar el papel de la activación de Nrf2 inducida por IL-1 $\beta$  en los efectos producidos por esta citoquina.
- **Objetivo 6.** Analizar si la activación farmacológica de Nrf2 modula los efectos inflamatorios inducidos por IL-1 $\beta$ , así como el posible mecanismo implicado.
- **Objetivo 7:** Investigar si la activación de Nrf2 modula los efectos inflamatorios producidos tras la activación de TLR4 por LPS.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. ANIMALES Y MATERIAL BIOLÓGICO

Para llevar a cabo esta Tesis Doctoral se utilizaron cultivos de la línea celular MOVAS (CRL-2797™) de células de músculo liso vascular, que fueron estimuladas con la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ , con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o con LPS en ausencia o presencia de diferentes fármacos. En este tipo celular se analizó: 1) la expresión proteica de TLR4, MyD88, COX-2, Nrf2, HO-1, NQO1, SOD1, SOD2, Keap1, p-p38, p-JNK2 y p-Nrf2 en extractos celulares totales, y la expresión del factor de transcripción Nrf2 y de la subunidad del factor de transcripción AP-1, p-c-Jun, en extractos nucleares y citosólicos, mediante Western Blot; 2) los niveles de ARNm de algunas de las proteínas indicadas anteriormente, mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR); 3) la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante la medida de la fluorescencia emitida por dihidroetidio (DHE) y diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), respectivamente; 4) la actividad NAD(P)H oxidasa vascular mediante la quimioluminiscencia emitida por la reacción entre la lucigenina y el O<sub>2</sub><sup>-</sup>; 5) la migración celular por la técnica de cierre de la herida; 6) la proliferación celular por la técnica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio o MTT; y 7) la viabilidad, la necrosis y la apoptosis celular mediante un kit comercial de doble tinción anexina V y yoduro de propidio (IP).

También se realizaron experimentos de función vascular en segmentos de aorta de ratones C57BL/6J machos de 3 meses de edad, criados en el Gabinete Veterinario de la Facultad de Medicina de la UAM (número de registro ES28079000097). El uso de animales fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la UAM y por la Consejería de Medio Ambiente de la Comunidad de Madrid (PROEX 345/14 y PROEX 183.2/20). El uso, cría y mantenimiento de los animales se realizó de acuerdo con el Real Decreto 53/2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, y que cumple con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Los ratones fueron criados manteniendo constantes la temperatura ambiente, la humedad y el ciclo de luz (12 horas de luz/oscuridad), tuvieron libre acceso al agua y fueron alimentados *ad libitum* con pienso estándar para ratones. Los experimentos se llevaron a cabo bajo el principio de las 3R (reemplazo, refinamiento y reducción), de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del NIH (Publicación NIH nº 85-23, revisada en 1996), y siguiendo las directrices de investigación con animales, ARRIVE 2.0 (Percie Du Sert *et al.*, 2020). Se utilizaron un total de 10 ratones en los experimentos. No se emplearon métodos estadísticos para predeterminar el tamaño de la muestra y el número de animales utilizados se estimó a partir de la experiencia previa del grupo de investigación con estos estudios (Hernanz *et al.*, 2015).

Los animales se sacrificaron mediante decapitación tras exposición a CO<sub>2</sub>. Tras el sacrificio, la aorta torácica se diseccionó libre de grasa y tejido conectivo y se dividió en 4 segmentos de 2 mm de longitud cada uno. Los segmentos se incubaron *ex vivo* durante 24 h en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, glucosa 1 g/L) suplementado con 1% v/v de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina-estreptomomicina y 1% de glutamina, en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$ , tBHQ e IL-1 $\beta$ +tBHQ o de IL-1 $\beta$ , el inhibidor de TLR4 CLI-095 e IL-1 $\beta$ +CLI-095. Posteriormente, se realizaron experimentos de reactividad vascular para estudiar la contractilidad inducida por

elevadas concentraciones de potasio y la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio inducida por acetilcolina mediante miografía de alambres.

## 2. CULTIVOS CELULARES

La línea celular MOVAS de CMLV de ratón se cultivó en medio DMEM con alta glucosa (4,5 g/L) suplementado con 10% v/v de FBS y 0,2 mg/ml de la solución antibiótica G-418 (geneticina), y se mantuvo en un incubador (NuAIRE 425-300E clase 2, NuAIRE, Plymouth, MN, EE. UU.) en un ambiente húmedo, a 37°C y con un 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando las células alcanzaron el 80-90% de confluencia, se levantaron para hacer un pase y/o sembrarlas en placas para llevar a cabo los experimentos. Para ello, las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) sin Ca<sup>2+</sup> y sin Mg<sup>2+</sup> para favorecer la disgregación celular; a continuación, para despegar las células, estas se incubaron durante 2 min a 37°C con tripsina-EDTA al 0,05%. Seguidamente, se añadió DMEM suplementado con 10% v/v de FBS y 0,2 mg/ml de la solución G-418 para neutralizar la tripsina. Cada tripsinización se llevó a cabo con una frecuencia aproximada de 4 días. Para los experimentos, las células se utilizaron entre los pases 3 y 12.

Las CMLV se observaron mediante microscopía óptica de contraste de fases (microscopio invertido Zeiss, Axiovert 25, Jena, Alemania), donde se confirmó que mantenían la morfología típica en forma de huso del músculo liso en cultivos celulares a lo largo de su crecimiento.

### 2.1. PROTOCOLO EXPERIMENTAL EN CMLV

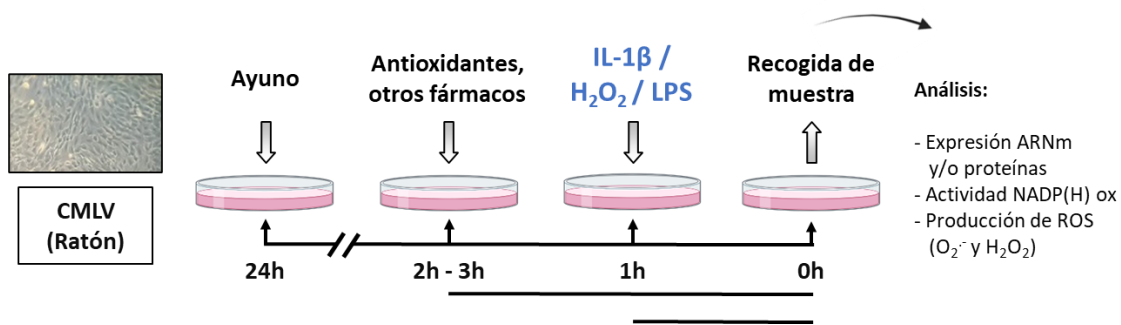
Para llevar a cabo los experimentos, los cultivos de CMLV se ayunaron durante 24 h en DMEM suplementado con 0,2 mg/ml de la solución G-418 y libre de suero con el objetivo de mantener las células en estado quiescente. Los diferentes tratamientos se añadieron durante las 24 h de ayuno.

Las CMLV se incubaron durante 1 h con IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) o LPS (10  $\mu$ g/ml) con el fin de analizar su efecto sobre la activación de Nrf2 y la expresión de varias proteínas de la vía regulada por este factor de transcripción (HO-1, NQO1, SOD1, SOD2), la expresión de Keap1 y p-Nrf2, la expresión de proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria (COX-2, p-p38, p-JNK, p-c-Jun, TLR4 y MyD88) y/o la actividad de la enzima NADP(H) oxidasa y la producción de especies reactivas de oxígeno (O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Para analizar la participación de las especies reactivas de oxígeno en estos efectos, las CMLV se pretrataron con el antioxidante apocinina (30  $\mu$ M) y con el detoxificador de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalasa (1000 U/ml), que se añadieron 1 h antes del tratamiento con IL-1 $\beta$  o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 19).

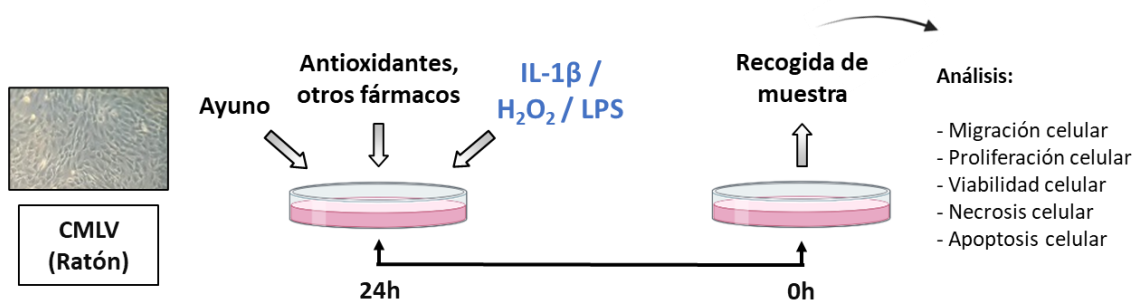
De forma similar, las CMLV se preincubaron durante 1 h con el inhibidor de TLR4 CLI-095 (1  $\mu$ M) o con el inhibidor de JNK SP600125 (20  $\mu$ M) con el fin de determinar la participación de estas vías en el efecto de IL-1 $\beta$  (Figura 19).

Por otra parte, la implicación de Nrf2 en el efecto de IL-1 $\beta$  se estudió tratando las CMLV con el inhibidor de este factor de transcripción brusatol (200 nM), que se añadió 2 h antes del tratamiento con la citoquina (Figura 19).



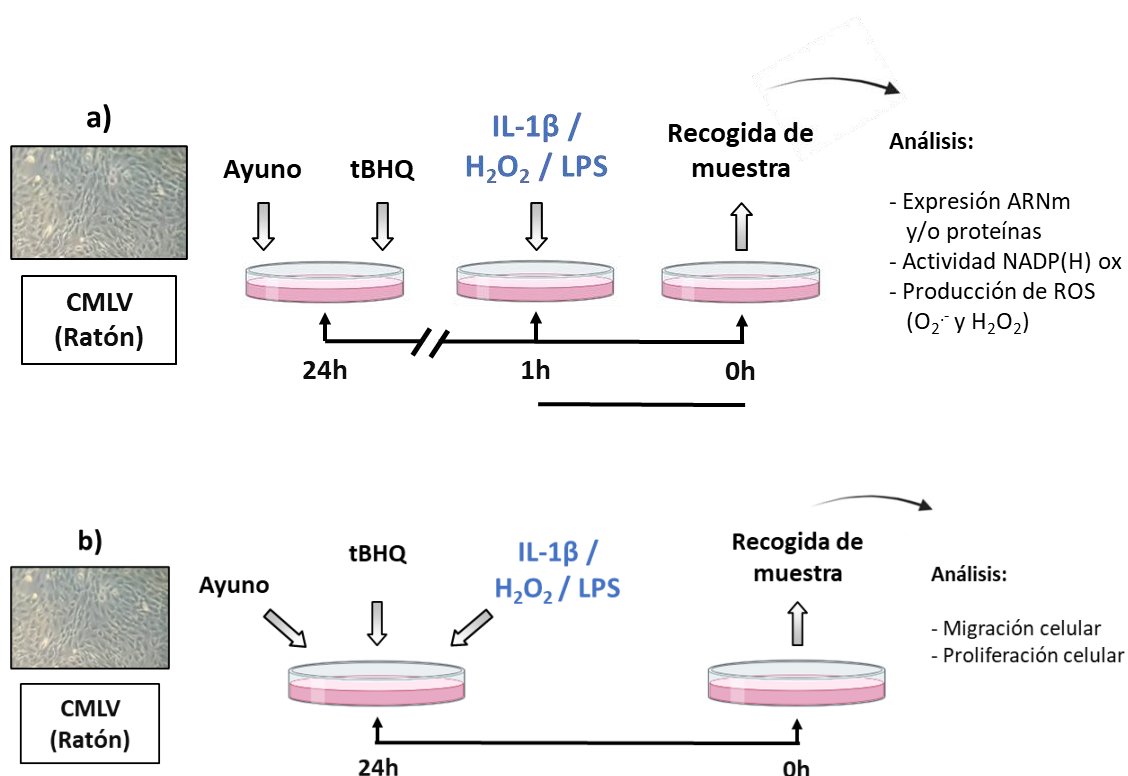
**Figura 19.** Protocolo experimental utilizado para estudiar el efecto de IL-1β, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y LPS sobre la expresión génica y proteica y el estrés oxidativo. Elaboración propia. Creada con BioRender.

En otro grupo de experimentos, las CMLV se estimularon durante 24 h con IL-1β, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o LPS para estudiar su efecto sobre la migración, la proliferación, la viabilidad, la necrosis y la apoptosis celular. La participación del estrés oxidativo, del receptor TLR4 y/o del factor de transcripción Nrf2 en estos procesos se analizó incubando los cultivos con fármacos antioxidantes o los inhibidores correspondientes (Figura 20).



**Figura 20.** Protocolo experimental utilizado para estudiar el efecto de IL-1β, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y LPS sobre la migración, la proliferación, la viabilidad, la necrosis y la apoptosis celular. Elaboración propia. Creada con BioRender.

Para analizar la modulación de los efectos de IL-1β, LPS y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la activación de Nrf2, las CMLV se trataron durante 24 h con el activador del factor de transcripción Nrf2 tBHQ (20 μM) en ausencia o presencia de IL-1β, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o LPS (Figura 21a, b). La especificidad de algunos de los efectos de tBHQ sobre Nrf2, se estudió incubando los cultivos celulares con brusatol.



**Figura 21. Protocolo experimental utilizado para estudiar la modulación de los efectos de IL-1 $\beta$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y LPS por la activación de Nrf2 con tBHQ.** Modulación por tBHQ del efecto de IL-1 $\beta$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y LPS sobre la expresión génica y proteica y el estrés oxidativo (a) y sobre la migración y la proliferación celular (b). Elaboración propia. Creada con BioRender.

### 3. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN PROTEICA

La expresión de las proteínas se analizó mediante la técnica de Western Blot en lisados celulares conteniendo extractos totales o en fracciones nucleares y citosólicas.

#### 3.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS TOTALES

Para la obtención de extractos totales, las células se sembraron en placas de 6 pocillos hasta llegar a una confluencia del 80-90%, momento en el que se ayunaron durante 24 h. Tras la realización del correspondiente protocolo experimental (**Figuras 19 y 21a**), los cultivos se lavaron dos veces con PBS frío sin Ca<sup>2+</sup> y sin Mg<sup>2+</sup> y se rasparon las células en 100  $\mu$ l de tampón de lisis compuesto por: 30 mM Tris-HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1% Tritón X-100, 1% NaDoc (deoxicolato sódico), 0,1% SDS (dodecilsulfato sódico), al cual se le añadieron en el momento inhibidores de proteasas (Complete 40 mM) y fosfatasa [50 mM NaF (inhibidor de tirosina fosfatasa), 20 mM  $\beta$ -Glicerol fosfato (inhibidor de serina treonina fosfatasa), 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (inhibidor competitivo de fosfatasa)]. Los lisados celulares se recogieron en tubos eppendorf, se incubaron 30 min a 4°C en agitación orbital y seguidamente se centrifugaron 10 min a 18000 g y a 4°C para precipitar el material insoluble y poder recoger el extracto total presente en el sobrenadante. Los extractos totales se almacenaron a -20°C hasta su utilización.



### 3.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS NUCLEARES Y CITOSÓLICOS

Para la obtención de extractos nucleares y citosólicos, las células se sembraron en placas de Petri de 60 cm<sup>2</sup> y, alcanzada una confluencia del 80-90%, se ayunaron durante 24 h. Tras la realización del correspondiente protocolo experimental (**Figuras 19, 21a**), los cultivos se lavaron dos veces con PBS frío sin Ca<sup>2+</sup> y sin Mg<sup>2+</sup> y se rasparon las células en un tampón hipotónico (tampón 1) compuesto por: 20 mM HEPES (pH 7,9), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% v/v glicerol y 0,2% v/v nonidet P-40 (NP-40, Igepal). El lisado obtenido se incubó en hielo durante 5 min y se centrifugó 5 min a 900 g y a 4°C. El sobrenadante (**fracción citosólica**) se almacenó a -20°C para posteriores análisis. El precipitado obtenido se lavó una vez con PBS; para ello, se resuspendió en PBS, se centrifugó 5 min a 500 g y a 4°C y se eliminó el PBS. Posteriormente, se resuspendió en un tampón hipertónico (tampón 2) compuesto por: 20 mM HEPES (pH 7,9), 400 mM NaCl, 0,5% NaDoc y 2% v/v glicerol, y se incubó 30 min a 4°C en agitación orbital. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó 10 min a 18000 g y a 4°C para eliminar el material insoluble. El sobrenadante obtenido (**fracción nuclear**) se guardó a -20°C para posteriores análisis. Tanto el tampón 1 como el tampón 2 fueron suplementados con los inhibidores de proteasas y fosfatasa descritos anteriormente en el momento de su utilización.

### 3.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas obtenidas en los lisados celulares se cuantificó por colorimetría utilizando el método de *Micro BCA™ Protein Assay Kit*. La cuantificación se realizó por la medida de la absorbancia a 590 nm en un lector de placas *FLUOstar omega spectrophotometer* (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). A la absorbancia de las muestras se le sustrajo la absorbancia de sus respectivos tampones (tampón de lisis en el caso de extractos totales o tampón 2 en el caso de extractos nucleares). Los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en una recta patrón construida a partir de la absorbancia obtenida con diluciones de concentración conocida de albúmina de suero bovino (BSA). El volumen de muestra necesario para la electroforesis se calculó en función de la cantidad de proteína que se deseaba cargar y se mezcló con el tampón de carga o tampón Laemmli 5X [300 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% SDS, 25% β-mercaptoetanol, 0,5% p/v azul de bromofenol y 50% glicerol] en una relación 5:1 (volumen de muestra: volumen de tampón). La mezcla se incubó a 95°C durante 5 min para desnaturalizar las proteínas y se guardó a -20°C hasta su utilización.

### 3.4. WESTERN BLOT

Los geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) se polimerizaron en un sistema de electroforesis *Mini-Protean® 3 Cell* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.). Para ello, se preparó un gel separador [4,6% Tris-HCl (pH 8,8), 0,1% SDS, 0,038% persulfato amónico y 0,033% TEMED], cuyo porcentaje de acrilamida depende del peso molecular de la proteína a estudiar, y un gel concentrador [(3% acrilamida, 1,49% Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% SDS, 0,98% persulfato amónico y 0,053% TEMED)], en los cuales se separaron las proteínas en condiciones desnaturalizantes.

Para analizar la expresión proteica, se utilizaron 20-25 µg de proteína del lisado total que se separaron electroforéticamente en un gel SDS-PAGE al 12% (HO-1, NQO1, SOD1, SOD2 y MyD88), al 10% [Keap1, MAPK (p-JNK, JNK, p-p38, p38)] o al 7,5% (Nrf2, p-Nrf2, COX-2 y TLR4) de acrilamida. Para analizar la expresión de Nrf2 y p-c-Jun, se utilizaron 10-15 µg de proteína del

lisado nuclear y citosólico, y se separaron electroforéticamente en un gel SDS-PAGE al 10% de acrilamida.

Seguidamente, los geles se introdujeron en una cubeta llena de tampón de electroforesis (25 mM Tris, 200 mM glicina y 1% SDS). Las muestras, junto con el marcador de peso molecular (*BlueStar Prestained Protein Marker, FastGene® BlueStar Protein Ladder*), se cargaron en el gel concentrador. A continuación, se llevó a cabo la electroforesis aplicando un voltaje constante de 120 mV. Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a membranas comerciales de difluoruro de polivinilo (*Trans-Blot® Turbo Midi 0,2 µm PVDF Transfer Membrane*) utilizando para ello un sistema de transferencia rápida (*Trans-Blot® Turbo Transfer System, Bio-Rad Laboratories*) y aplicando una intensidad de corriente de 1,3 amperios durante 10 min. Una vez transferidas las proteínas, las membranas se trataron durante 1 h a temperatura ambiente en agitación continua con solución de bloqueo [5% leche desnatada o 5% BSA en solución de lavado (TTB-S 1X: 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl y 0,1% Tween-20)], para evitar uniones inespecíficas. A continuación, las membranas se incubaron durante toda la noche, en agitación continua a 4°C, con los anticuerpos primarios disueltos en solución de bloqueo a la dilución adecuada que se indica en la **Tabla 2**.

Una vez finalizada la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados sucesivos de 5-10 min, en agitación y a temperatura ambiente, con solución de lavado para eliminar los posibles restos de anticuerpo primario que no se habían unido. A continuación, las membranas fueron incubadas durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación con el correspondiente anticuerpo secundario, anticuerpo IgG anti-conejo o anticuerpo IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (**Tabla 2**). Posteriormente, las membranas se volvieron a lavar tres veces y se procedió a la detección de los inmunocomplejos por quimioluminiscencia, utilizando el sistema peroxidasa de rábano-luminol [*Clarity Western Enhanced chemiluminescence (ECL) Blotting Substrate*]. Esta técnica de detección está basada en la generación enzimática de un éster de acridino que reacciona con el peróxido, produciendo luz. Las bandas se detectaron con un sistema de imágenes (*ChemiDoc™ MP Imaging System, Bio-Rad Laboratories*). La intensidad de las bandas se cuantificó con el programa Image lab versión 6.0 (Bio-Rad Laboratories). Para corregir la expresión de las proteínas que se analizaron, como control de carga en los extractos totales se utilizó la  $\alpha$ -tubulina, en los extractos citosólicos se utilizó GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), y en los extractos nucleares se utilizó TBP (proteína de unión a la caja "TATA"). En algunos casos, la expresión de las proteínas fosforiladas se normalizó respecto a la expresión de la proteína total sin fosforilar. Los datos se expresaron como la expresión relativa de las proteínas en las distintas situaciones experimentales respecto al control (células no tratadas).

<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Origen</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Referencia</b>
<b>Nrf2</b>	1:1000	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE. UU.)	12721
<b>p-Nrf2</b>	1:500	Policlonal de conejo	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.)	PA5-67520
<b>HO-1</b>	1:1000	Policlonal de conejo	ENZO Life Sciences (Lausen, Suiza)	ADI-SPA-895
<b>NQO1</b>	1:500	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE. UU.)	sc-32793
<b>SOD1</b>	0,05 µg/ml	Policlonal de conejo	ENZO Life Sciences	ADI-SOD-101
<b>SOD2</b>	0,005 µg/ml	Policlonal de conejo	ENZO Life Sciences	ADI-SOD-111
<b>Keap1</b>	1:1000	Monoclonal de conejo	Cell Signaling Technology	8047
<b>TLR4</b>	1:500	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-293072
<b>MyD88</b>	1:1000	Policlonal de conejo	Abcam (Cambridge, Reino Unido)	ab2064
<b>COX-2</b>	1:150	Policlonal de conejo	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EE. UU.)	160126
<b>p-JNK</b>	1:500	Policlonal de conejo	Cell Signaling Technology	9251
<b>JNK</b>	1:1000	Policlonal de conejo	Cell Signaling Technology	9258
<b>p-p38</b>	1:1000	Monoclonal de ratón	Cell Signaling Technology	9216
<b>p38</b>	1:2000	Monoclonal de ratón	Cell Signaling Technology	9217
<b>p-c-Jun</b>	1:500	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-16312
<b>α-Tubulina</b>	1:20000	Monoclonal de ratón	Sigma- Aldrich Co.	T5168
<b>TBP</b>	1:1000	Policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology	sc-204
<b>GAPDH</b>	1:1000	Monoclonal de ratón	Calbiochem (Temecula, CA, EE. UU.)	CB1001
<b>Anti-conejo</b>	1:2000	Cabra IgG	Bio-Rad Laboratories	170-6515
<b>Anti-ratón</b>	1:4000	Cabra IgG	Bio-Rad Laboratories	170-6516

**Tabla 2. Anticuerpos utilizados en los análisis de expresión proteica por Western Blot.**

## 4. CUANTIFICACIÓN DEL ARNm – qRT-PCR

La cuantificación del ARNm de los genes de HO-1, NQO1, SOD1, SOD2 y COX-2 se llevó a cabo en lisados celulares mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

### 4.1. EXTRACCIÓN DEL ARNm

Para la extracción de ARN total a partir de cultivos de CMLV, una vez finalizados los distintos tratamientos a los que se sometieron las células (**Figuras 19, 21a**), se retiró el medio de ayuno y se realizaron dos lavados en frío con PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . Una vez eliminado el PBS, las células se homogeneizaron y se rasparon utilizando 500  $\mu\text{l}$  de NZYol, también en frío. El homogenado obtenido se recogió en eppendorf estériles. Después de añadir 50  $\mu\text{l}$  de 1-bromo-3-cloropropano se agitó vigorosamente, tras lo cual se mantuvo en reposo durante 10 min a temperatura ambiente. La mezcla resultante se centrifugó a 12000 g durante 15 min a 4°C, obteniéndose 3 fases: una fase verde en la parte inferior del tubo (proteínas), una interfase intermedia blanca (ADN) y una fase superior incolora (ARN). Esta última se transfirió a un microtubo eppendorf al que se añadieron 250  $\mu\text{l}$  de isopropanol frío y 10  $\mu\text{g}$  de glucógeno, que forma complejos con los ácidos nucleicos permitiendo la formación de precipitados visibles y, por lo tanto, más fáciles de manipular. Seguidamente, se agitaron levemente los tubos y se incubaron durante toda la noche a -20°C para favorecer al máximo la precipitación del ARN. Tras la incubación, las muestras se centrifugaron a 12000 g durante 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y al precipitado se le añadieron 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 75%; a continuación, se agitaron levemente los tubos y se centrifugaron a 12000 g durante 5 min a 4°C. Seguidamente, se eliminó el sobrenadante y se repitió el proceso una vez más. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y el precipitado se dejó secar al aire asegurando la completa eliminación del alcohol. Por último, se resuspendió el precipitado, en el que se encuentra el ARN total, en 10  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas.

### 4.2. CUANTIFICACIÓN DEL ARNm

El ARN extraído se cuantificó en un sistema de Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), el cual determina la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. Además, para determinar la calidad del ARN, se midieron las absorbancias a 230 y 280 nm, comprobando así los rangos óptimos establecidos entre las relaciones 260 y 230 y entre las de 260 y 280. Cada muestra se midió por duplicado utilizando 1  $\mu\text{l}$ . Las muestras de ARN se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

### 4.3. RETROTRANSCRIPCIÓN

Se llevó a cabo la retrotranscripción de 1  $\mu\text{g}$  del ARN total a ADN complementario (ADNc) usando el kit de síntesis *iScript™ cDNA synthesis kit*. El protocolo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones comerciales, de manera que el ARN se mezcló con los reactivos del kit hasta un volumen de reacción de 10  $\mu\text{l}$  y se introdujo en un termociclador (*Mastercycler Gradient*, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) donde se llevó a cabo la reacción en los siguientes ciclos: cebado (5 min a 25°C), retrotranscripción (20 min a 46°C) e inactivación de la retrotranscriptasa

(1 min a 95°C). Finalizada la retrotranscripción y asumiendo un 100% de eficacia en la conversión de ARN a ADNc, el ADNc obtenido se guardó a -20°C hasta su posterior utilización.

#### 4.4. qRT-PCR

La PCR cuantitativa en tiempo real se llevó a cabo en el sistema de detección de secuencias *ABI PRISM 7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.), perteneciente al Centro de Apoyo Tecnológico (C.A.T.) de la Universidad Rey Juan Carlos. La cuantificación de los niveles de ARNm se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real con cebadores *forward* y *reverse* específicos de los genes a analizar (**Tabla 3**).

<u>Gen</u>	<u>Forward</u>	<u>Reverse</u>
<b>HO-1</b>	CACGCATATACCCGCTACCT	CCAGAGTGTTTCATTCGAGCA
<b>NQO1</b>	CCATGTACGACAACGGTCCT	TGACGTTTCATGTCCCCGTG
<b>SOD1</b>	TGTGACTGCTGGAAAGGACG	ACCACCATAAAGTCATGGGAAGG
<b>SOD2</b>	GTCGCTTACAGATTGCTGCC	GGCACTGACATGGGAAGAGTT
<b>COX-2</b>	TTCGGGAGCACAACAGAGT	TAACCGCTCAGGTGTTGCAC
<b>β2-Microglobulina</b>	ACCCTGGTCTTTCTGGTGCTT	TAGCAGTTCAGTATGTTCCGGCTT

**Tabla 3. Cebadores utilizados en los análisis de RT-qPCR.** Todos los cebadores se obtuvieron en- Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EE. UU.

Las reacciones se prepararon por duplicado en placas de 96 pocillos *MicroAmp Fast optical 96-well reaction plate* (Applied Biosystems). La placa de reacciones se preparó en una campana de flujo laminar (Mini-V/PCR, Telstar, Madrid, España), esterilizada previamente por luz ultravioleta y en un volumen final de 10 µl, conteniendo:

- 4,5 µl de ADNc diluido en agua libre de nucleasas. La dilución óptima, 1/50, se determinó previamente a través de la realización de curvas de concentración específicas para el ADNc de cada gen a amplificar, utilizando para ello una mezcla de ADNc de todas las situaciones experimentales a analizar.
- 5,5 µl de la mezcla de reacción que consta de 5 µl de *SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix 2X* con ROX (carboxirodamina), como fluorocromo para control de carga de la mezcla, y 0,5 µl del par de cebadores específicos para cada gen.

Una vez preparadas las reacciones, las placas se sellaron con un papel adhesivo óptico [*MicroAmpFast 96 Well* (Applied Biosystems)], que no interfiere con la emisión de fluorescencia, pero evita la evaporación de las muestras durante los periodos de desnaturalización. Las condiciones de amplificación de la PCR cuantitativa fueron las siguientes: 1 ciclo inicial de desnaturalización de 30 s a 95°C, 40 ciclos de 15 s a 95°C, 1 ciclo final de 1 min a 60° C. Al final de la PCR, se realizó un análisis de la curva de fusión para mostrar la especificidad del producto de la PCR. Los resultados de amplificación se normalizaron respecto al gen de la β2-microglobulina, utilizado como control endógeno. Para calcular la expresión relativa usamos el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001). Los datos se expresaron como la expresión

relativa de ARNm en las distintas situaciones experimentales con respecto al control (células no tratadas).

## 5. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD NAD(P)H OXIDASA

La producción de  $O_2^{\cdot-}$  generado por la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa se determinó mediante quimioluminiscencia emitida por la reacción entre la lucigenina y el  $O_2^{\cdot-}$ , de acuerdo con el procedimiento descrito por San José *et al.* (2009), con ligeras modificaciones. La lucigenina (dinitrato de N, N'-dimetil-9,9'-biacridinio) es un compuesto aromático que es reducido por el  $O_2^{\cdot-}$  dando lugar a emisión de luz que puede ser detectada en un luminómetro.

Las CMLV, ayunadas y estimuladas como se ha descrito anteriormente (**Figuras 19, 21a**), se lavaron dos veces con PBS frío. A continuación, las CMLV se homogeneizaron usando un tampón fosfato compuesto por 50 mM  $KH_2PO_4$ , 1 mM EGTA y 150 mM sacarosa y a pH 7. Los homogenados obtenidos se colocaron por duplicado (50  $\mu$ l) en placas de 96 pocillos (*U96 PP-0,5 ml White*, Thermo Fisher Scientific). A cada pocillo se le añadieron, además, 175  $\mu$ l del tampón fosfato y 1,25  $\mu$ l de lucigenina (concentración final 5  $\mu$ M). La luminiscencia fue medida a 750 nm con un luminómetro de placas (*GloMax<sup>®</sup>-Multi Detection System*, Promega Corporation, Madison, WI, E.E. UU.) cada 1,8 s durante 3 min, obteniéndose así un registro basal de los niveles de producción de  $O_2^{\cdot-}$ . A continuación, se añadieron a cada pocillo 25  $\mu$ l de NAD(P)H (concentración final 100  $\mu$ M), cofactor del complejo enzimático NAD(P)H oxidasa, y se midió de nuevo la luminiscencia cada 1,8 s durante 3 min, obteniendo un registro de la actividad de la enzima. A estos valores se les restaron los valores basales y el resultado se normalizó con la concentración de proteína, determinada como se ha descrito anteriormente. Los datos se expresaron como unidades relativas de luz por s y por  $\mu$ g de proteína (URL/s  $\times$   $\mu$ g proteína), con respecto a la situación control (células no tratadas).

## 6. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

La producción de  $O_2^{\cdot-}$  fue determinada por medio del análisis de la emisión de fluorescencia por la oxidación del dihidroetidio (DHE), usando el método descrito previamente (Jiménez-Altayó *et al.*, 2006). El DHE es un compuesto que es capaz de atravesar libremente las membranas celulares y que en presencia de  $O_2^{\cdot-}$  se oxida a etidio, quedando atrapado en el interior celular debido a su capacidad para intercalarse en el ADN. El etidio se excita a una longitud de onda de 546 nm y emite una fluorescencia roja dentro del espectro de emisión comprendido entre 590 nm y 700 nm.

Para llevar a cabo la detección de la producción de anión superóxido, las CMLV se sembraron y crecieron sobre cristales de vidrio circulares y estériles situados en el interior de placas de 12 pocillos. Alcanzada una confluencia del 60-80%, las células se ayunaron durante 24 h y se trataron durante 1 h con IL-1 $\beta$  (10 ng/ml),  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M) o LPS (10  $\mu$ g/ml) en presencia y ausencia de tBHQ (20  $\mu$ M, 24 h) (**Figuras 19, 21a**). Transcurrido el periodo de tratamiento, las CMLV se incubaron con la sonda DHE (10  $\mu$ M) disuelta en medio de ayuno DMEM durante 30

min a 37°C. A continuación, los cristales se montaron en portaobjetos usando para ello medio de montaje (glicerol:H<sub>2</sub>O destilada, 1:1 v/v). La fluorescencia fue detectada usando un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioplan 2, Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood, NY, EE. UU). Se tomó una media de 6-7 imágenes por cristal usando una cámara Leica DFC7000T (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) y se cuantificaron los valores de la intensidad de fluorescencia de 10-15 núcleos por imagen, usando el software de análisis ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD. <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Cada día de experimento se asignó el valor 1 a la fluorescencia emitida por las células en situación control (células no tratadas), representándose el resto de las situaciones experimentales con respecto a este control.

## 7. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Para llevar a cabo la detección de las especies reactivas de oxígeno O<sub>2</sub><sup>·-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se utilizaron las sondas DHE y DCFH-DA, respectivamente. El DCFH-DA es una sonda fluorogénica permeable capaz de difundir a través de la membrana celular. En el interior celular es degradado por las esterasas intracelulares dando lugar a 2'-7' diclorofluoresceína, la cual se une al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular y emite fluorescencia a una longitud de onda de 535 nm cuando es excitada con una longitud de onda de 485 nm. El DCFH-DA localizado en el exterior celular no será capaz de reaccionar con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que limita la detección al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular. Este método permite una cuantificación rápida y precisa de ROS en presencia de un estímulo que active el metabolismo oxidativo.

Las CMLV se sembraron y crecieron en placas de 6 pocillos. Alcanzada una confluencia del 60-80%, las células fueron ayunadas durante 24 h y estimuladas con IL-1β (10 ng/ml), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM) o LPS (10 μg/ml) durante 1 h en presencia y ausencia de tBHQ (20 μM, 24 h) o de CLI-095 (1 μM, 2 h) (**Figuras 19, 21a**). Media hora antes de finalizar los tratamientos se añadieron las sondas DHE (10 μM) o DCFH-DA (20 μM). Al final del protocolo experimental las células se despegaron, se recogieron en eppendorf estériles y, a continuación, se lavaron tres veces con PBS mediante tres centrifugaciones consecutivas de 10 min a 200 g. La emisión de fluorescencia de ambas sondas se midió pasando las CMLV por un citómetro Beckman Coulter Cytomics FC500 MPL (Beckman Coulter, Miami, FL, EE. UU.), perteneciente al C.A.T. de la URJC. Los resultados se expresaron en intensidad de fluorescencia emitida por las células en las distintas situaciones experimentales con respecto al control (células no tratadas).

## 8. ANÁLISIS DE LA MIGRACIÓN CELULAR

La migración celular se estudió mediante el ensayo de cierre de herida. Para ello, las CMLV se sembraron en placas de 12 pocillos y se crecieron hasta alcanzar una confluencia del 100%, momento en el que se eliminó el medio y se procedió a hacer las heridas mediante una punta de pipeta P10. Una vez realizada la herida se trazó una línea en el centro de los pocillos, perpendicular a la misma. A continuación, la placa se lavó dos veces con PBS para eliminar los posibles restos celulares que pueden quedar en la zona de la herida, y se añadió el medio de ayuno. Seguidamente, se tomaron fotografías a tiempo cero en el lugar de intersección de la

línea y la herida. Posteriormente, las células se estimularon con IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M) o LPS (10  $\mu$ g/ml) durante 24 h en presencia y ausencia de tBHQ (20  $\mu$ M), catalasa (1000 U/ml), apocinina (30  $\mu$ M), CLI-095 (1  $\mu$ M) o de brusatol (200 nM) (**Figuras 20, 21b**). A continuación, se volvieron a tomar fotografías en el mismo lugar. Utilizando el software de análisis de imagen ImageJ, se determinó la distancia entre los bordes de la herida a tiempo cero y a las 24 h y se calculó el valor de cierre de la misma con respecto al tiempo cero y con respecto a la situación control (células no tratadas) en cada caso.

## 9. ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

La proliferación celular se analizó mediante el ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). El MTT produce una solución amarilla que se transforma en cristales de formazán (insolubles en agua) por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas. Los cristales de formazán, de color azul, se solubilizan con dimetilsulfóxido (DMSO) produciendo una reacción colorimétrica que da lugar a la aparición de una coloración violácea. La intensidad de la coloración producida al añadir el DMSO se mide por colorimetría a 570 nm.

Para analizar la proliferación celular las células se ayunaron y se trataron con IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) o LPS (10  $\mu$ g/ml) durante 24 h en presencia y ausencia de tBHQ (20  $\mu$ M), catalasa (1000 U/ml), apocinina (30  $\mu$ M) o CLI-095 (1  $\mu$ M) (**Figuras 20, 21b**). Se preparó una disolución stock de 1 mg/ml de MTT en PBS. Al finalizar los tratamientos, se eliminó el medio y se incubaron las células con una dilución 1/10 del stock de MTT en medio DMEM, durante 3 h a 37°C, tras lo cual se aspiró el medio y se añadió DMSO para disolver los cristales de formazán que se habían formado. A continuación, se colocó cada condición experimental por triplicado en una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas *FLUOstar omega spectrophotometer*. Los datos se representaron como incremento o disminución con respecto al control (células no tratadas).

## 10. ANÁLISIS DE LA APOPTOSIS, LA NECROSIS Y LA VIABILIDAD CELULAR

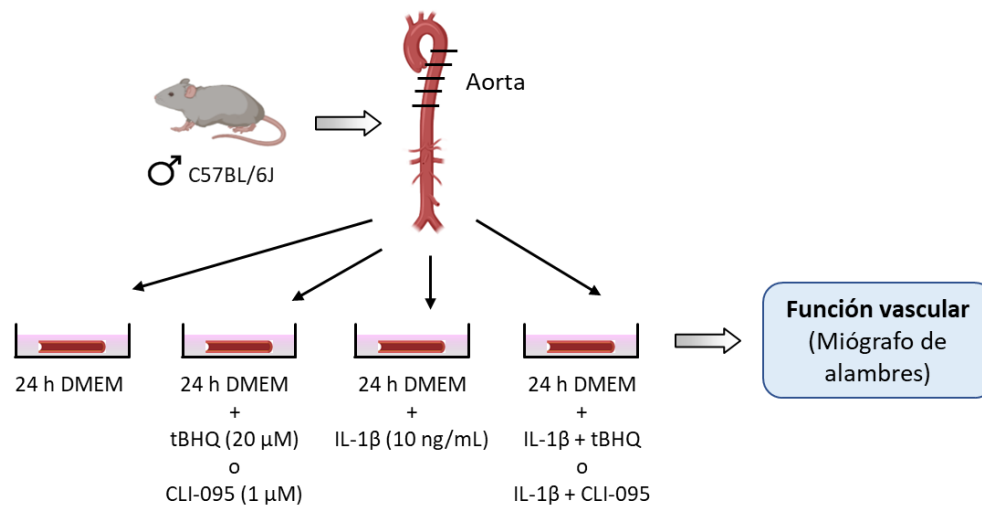
La apoptosis, necrosis y viabilidad celular se analizó mediante citometría de flujo. Para ello, las CMLV se ayunaron y se trataron con IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M), LPS (10  $\mu$ g/ml) o tBHQ (20  $\mu$ M) durante 24 h (**Figura 20**). Transcurrido el tiempo de tratamiento las células se despegaron, se recogieron en eppendorf estériles, y se marcaron con Anexina V conjugada con fluoresceína (FITC-anexina V, emisión de fluorescencia a 518 nm, color verde) y yoduro de propidio (IP, emisión de fluorescencia a 617 nm, color rojo) según las instrucciones del fabricante (FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit). Las células vivas sanas presentan fosfatidilserina (PS) en la parte citosólica de la membrana plasmática; sin embargo, en las células apoptóticas la PS se transloca a la parte externa de la membrana plasmática, exponiéndose así al medio extracelular. La anexina V tiene elevada afinidad por la PS presente en la membrana extracelular de las células apoptóticas. Por su parte, el IP es una sonda que interacciona con el ADN y que es impermeable



a la membrana celular, por lo que no es capaz de penetrar al interior de células vivas sanas ni de las células apoptóticas, ya que tienen la membrana plasmática intacta. Sin embargo, el IP puede penetrar al interior de las células muertas e interactuar con el ADN, ya que estas tienen la membrana plasmática degradada. Al incubar las células con FITC-anexina V e IP, estas mostrarán fluorescencia de color verde si son apoptóticas, fluorescencia verde y roja si están muertas (células necróticas) y no tendrán apenas fluorescencia si están sanas (células viables). Las distintas poblaciones celulares se distinguieron pasando las CMLV por un citómetro Beckman Coulter Cytomics FC500 MPL con una longitud de onda de excitación de 488 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de células en apoptosis, en necrosis, o viables, con respecto al total de células.

## 11. ESTUDIOS DE FUNCIÓN VASCULAR

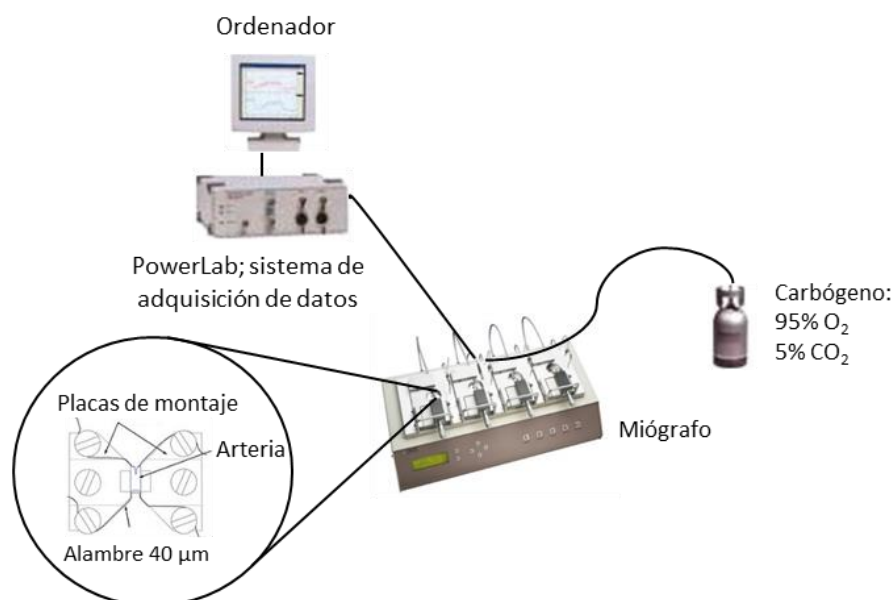
Los estudios de función vascular se realizaron en aorta torácica de ratón que se dividió en cuatro segmentos de 2 mm de longitud cada uno. Para estudiar la modulación del efecto de IL-1 $\beta$  por Nrf2, cada segmento de aorta se incubó *ex vivo* durante 24 h en DMEM (glucosa, 1 g/L) suplementado con 1% v/v de FBS, 1% de penicilina-estreptomicina y 1% de glutamina, en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), tBHQ (20  $\mu$ M) o IL-1 $\beta$ +tBHQ (Figura 22). Para estudiar la participación de TLR4 en el efecto de IL-1 $\beta$ , cada segmento de aorta se incubó *ex vivo* durante 24 h en presencia o ausencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), CLI-095 (1  $\mu$ M) o IL-1 $\beta$ +CLI-095 (Figura 22).



**Figura 22. Condiciones experimentales en los estudios de la función vascular.** Elaboración propia. Creada con BioRender.

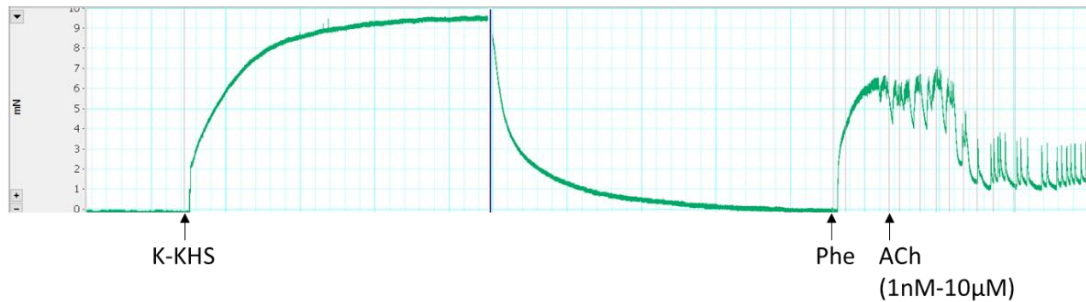
Los estudios de reactividad vascular se realizaron mediante miografía de alambres, según el método descrito por Mulvany and Halpern (1977) (Figura 23). Para ello, tras las 24 h de incubación *ex vivo* con los distintos tratamientos, los segmentos arteriales se transfirieron a un baño de órganos de un miógrafo dual isométrico, en el cual se introdujeron dos alambres de acero de 40  $\mu$ m de diámetro por la luz de la arteria. Después de un periodo de estabilización de 30 min en solución Krebs-Henseleit (KHS) (115 mM NaCl, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4,7 mM KCl, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11,1 mM glucosa y 0,01 mM Na<sub>2</sub>EDTA), burbujeada

con carbógeno (95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>) a 37°C y pH 7,4, los segmentos vasculares se estiraron gradualmente hasta conseguir la tensión óptima en función de su diámetro. Para ello, en cada segmento arterial se determinó la relación entre la tensión de la pared vascular y la circunferencia interna del vaso y se ajustó su circunferencia interna (L<sub>0</sub>) al 90% de la que tendrían los vasos si estuvieran expuestos a una presión transmural de 100 mmHg para un vaso relajado *in situ* (L<sub>100</sub>). El diámetro de las arterias se determinó como L<sub>0</sub>/π.



**Figura 23. Esquema representativo del miógrafo de alambres para la realización de los estudios de función vascular.** Elaboración propia.

Una vez finalizado el proceso de normalización, los segmentos vasculares se lavaron con KHS y se equilibraron durante 30 min. A continuación, se comprobó la contractilidad de los segmentos por exposición de estos a una solución de alta concentración de potasio (K<sup>+</sup>-KHS, 120 mM), la cual es idéntica a la de KHS excepto que NaCl fue reemplazado por KCl a una concentración equimolar. Tras el lavado con KHS y un periodo de equilibrio de 30 min, se determinó la relajación dependiente de endotelio; para ello, se realizó una única curva concentración-respuesta a acetilcolina (0,1-10 μM), en arterias previamente contraídas con el agonista de receptores α<sub>1</sub>-adrenérgicos fenilefrina, a una concentración tal que inducía una contracción de aproximadamente el 50% de la producida por K<sup>+</sup>-KHS (**Figura 24**). Además, para confirmar la participación del NO en la vasodilatación inducida por acetilcolina, algunos segmentos control se incubaron con el inhibidor no selectivo de NOS L-NAME (N(ω)-nitro-L-arginina metil éster, 0,1 mM) 30 min antes de la adición de fenilefrina. La respuesta vasodilatadora se expresó en porcentaje del tono previo inducido por fenilefrina.



**Figura 24. Registro representativo del protocolo experimental realizado en los estudios de función vascular.** Registro original de LabChart (ADInstruments Ltd, Oxford, Reino Unido) del experimento de reactividad vascular realizado en un segmento de aorta de ratón.

## 12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como el valor promedio  $\pm$  error estándar (ES). *n* hace referencia al número de animales utilizados en el caso de los segmentos arteriales y al número de cultivos usados en el caso de las CMLV. En el caso de los experimentos realizados en cultivos celulares, los análisis estadísticos que se llevaron a cabo fueron *t* de Student pareada y/o ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. En el caso de los experimentos de reactividad vascular, además de estos análisis, se realizó ANOVA de dos vías seguido de Bonferroni. Los valores se consideraron significativos cuando la probabilidad era menor del 5% ( $p < 0,05$ ). El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism versión 8.0.2 (San Diego, CA, EE. UU.).

## 13. COMPUESTOS Y FÁRMACOS UTILIZADOS

1-Bromo-3-cloropropano: Sigma-Aldrich Co.

Acetilcolina, hidrocloreuro: Sigma-Aldrich Co.

Acrilamida (Acrilamida: bis-acrilamida al 30%, solución 29:1, 3,3% C): Bio-Rad Laboratories

Apocinina (4'-Hidroxí-3'-metoxiacetofenona): Sigma-Aldrich Co.

APS (Persulfato amónico): Sigma-Aldrich Co.

Azul de bromofenol (3'3'', 5'5''-Tetrabromofenolsulfoneftaleína, sal sódica): Sigma-Aldrich Co.

Brusatol: Sigma-Aldrich Co.

BSA (Albumina de suero bovino): Sigma-Aldrich Co.

Catalasa: Sigma-Aldrich Co.

*Clarity Western Enhanced chemiluminescence (ECL) Blotting Substrate*: Bio-Rad Laboratories.

CLI-095: InvivoGen, San Diego, CA, EE. UU.

Complete: Roche Diagnostics, Manheim, Alemania

DCFH-DA (Diacetato de 2'-7' diclorofluoresceína): Sigma-Aldrich Co.

DHE (Dihidroetidio): Sigma-Aldrich Co.

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Glucosa 1 g/ml o Glucosa 4,5 g/ml): Sigma-Aldrich Co.

DMSO (Dimetilsulfóxido): PanReac, Barcelona, España

EGTA [Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético]: Sigma-Aldrich Co.

Etanol (96% volumen/volumen): PanReac

FBS (Suero fetal bovino): Sigma-Aldrich Co.

Fenilefrina: Sigma-Aldrich Co.

FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit: Invitrogen, Paisley, Reino Unido.

G-418 (geneticina): Roche Diagnostics.

Glicerol: PanReac

Glicina: VWR, Barcelona, España.

Glucógeno: Sigma-Aldrich Co.

Glucosa: Honeywell Fluka, Charlotte, NC, EE. UU.

Glutamina: Gibco (Life technologies - Thermo Fisher)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Peróxido de hidrógeno): Sigma-Aldrich, Co.

HEPES [Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico]: Sigma-Aldrich Co.

IL-1 $\beta$  (Interleuquina-1 $\beta$  recombinante de ratón): Sigma-Aldrich Co.

*iScript™ cDNA synthesis kit*: Bio-Rad Laboratories.

Isopropanol: Sigma-Aldrich Co.

Leche desnatada (Sveltesse): Nestlé, Vevey, Suiza

L-NAME: (N( $\omega$ )-nitro-L-arginina metil ester): Sigma-Aldrich Co.

LPS (Lipopolisacárido de *E. coli* O111:B4): Sigma-Aldrich Co.

Lucigenina (dinitrato de N, N'-dimetil-9,9'-biacridinio): Sigma-Aldrich Co.

Marcador de peso molecular (*BlueStar Prestained Protein Marker*): NIPPON genetics Europe, GmbH, Dueren, Alemania

Membranas de difluoruro de polivinilo (*Trans-Blot® Turbo Midi 0,2  $\mu$ m PVDF Transfer Membrane*): Bio-Rad Laboratories

*Micro BCA™ Protein Assay Kit*: Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EE. UU.

MOVAS (CRL-2797™): ATCC®, Manassas, VA, EE. UU.

MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio]: Sigma-Aldrich Co.

Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Ortovanadato sódico): Sigma-Aldrich Co.

NAD(P)H ( $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido, sal tetrasódica): Sigma-Aldrich Co.

NaDoc (Deoxicolato sódico): Sigma-Aldrich Co.

NaF (Fluoruro sódico): Sigma-Aldrich Co.

NP40 (Igepal): Honeywell Fluka

NZYol: Nzytech, Lisboa, Portugal

PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  y sin  $\text{Mg}^{2+}$  (Buffer salino fosfato sin  $\text{Ca}^{2+}$  y sin  $\text{Mg}^{2+}$ ): Sigma- Aldrich, Co.

Penicilina/estreptomicina: Gibco (Life technologies - Thermo Fisher)

Sacarosa: Sigma-Aldrich Co.

SDS (Dodecil sulfato sódico): Sigma-Aldrich Co.

SP600125: Sigma-Aldrich Co.

*SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix*: Bio-Rad Laboratories

tBHQ (tertbutilhidroquinona): Sigma-Aldrich Co.

TEMED (N, N, N', N' - Tetrametiletilendiamina): Sigma-Aldrich Co.

Tripsina-EDTA al 0,05%: Sigma- Aldrich, Co.

Tritón X-100: Sigma-Aldrich Co.

Trizma® base (Tris): Sigma-Aldrich Co.

Tween 20 (Monolaurato de sorbitán de polietilenglicol): Sigma-Aldrich Co.

$\beta$ -Glicerol fosfato: Honeywell Fluka.

$\beta$ -mercaptoetanol: Sigma-Aldrich Co.



# **RESULTADOS**





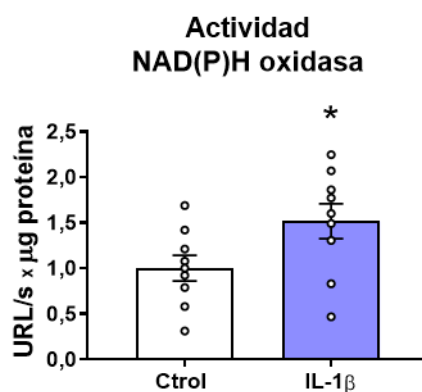
## 1. PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL EFECTO PROINFLAMATORIO DE IL-1 $\beta$

Como se ha revisado en la introducción, es bien conocido que IL-1 $\beta$  tiene efectos inflamatorios en CMLV, los cuales, generalmente, están mediados por el estrés oxidativo que produce esta citoquina (Martín *et al.*, 2012; Korbecki *et al.*, 2013). En esta primera parte de la Tesis Doctoral realizamos experimentos para confirmar estos efectos en la línea celular de CMLV de ratón, MOVAS, utilizada en este estudio.

### 1.1. EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

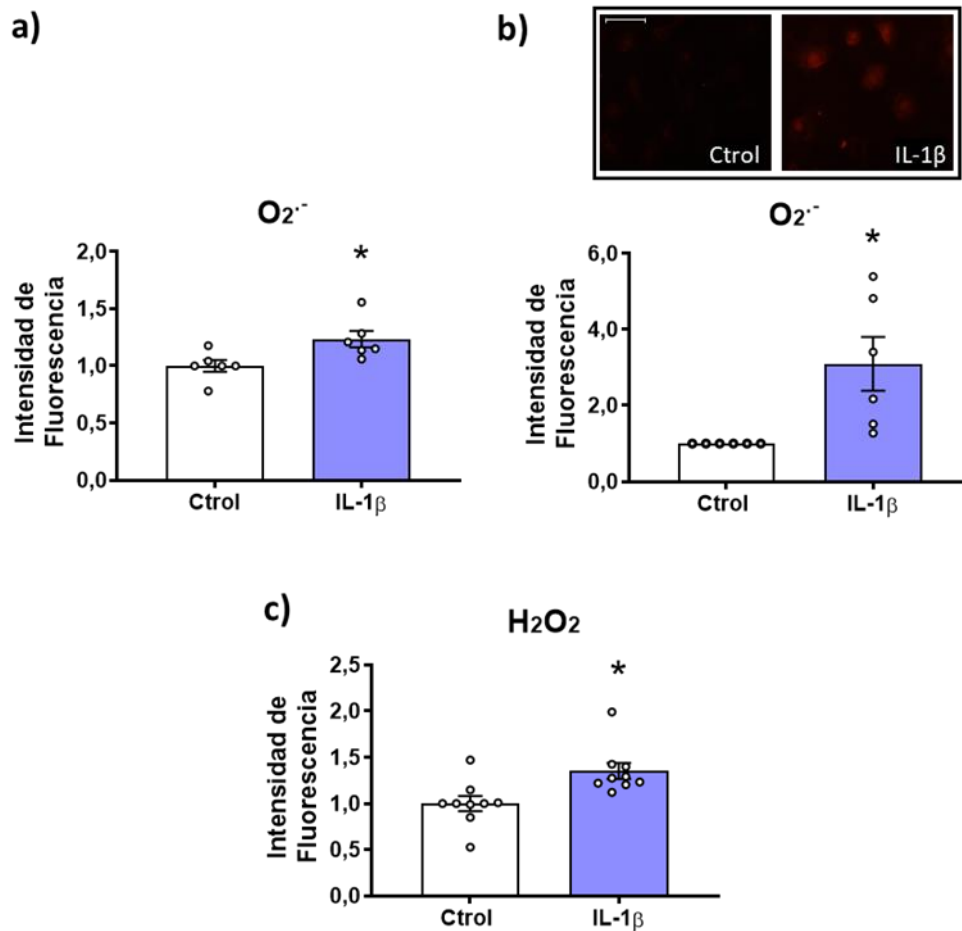
#### 1.1.1. Efecto de IL-1 $\beta$ sobre la actividad NAD(P)H oxidasa y la producción de especies reactivas de oxígeno

La estimulación con IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) incrementó la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa en cultivos de CMLV de ratón (Figura 25).



**Figura 25. IL-1 $\beta$  aumenta la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa.** Efecto de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la actividad NAD(P)H oxidasa en cultivos de CMLV de aorta de ratón. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como valor relativo respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  por *t* de Student pareada. URL: unidades relativas de luz.

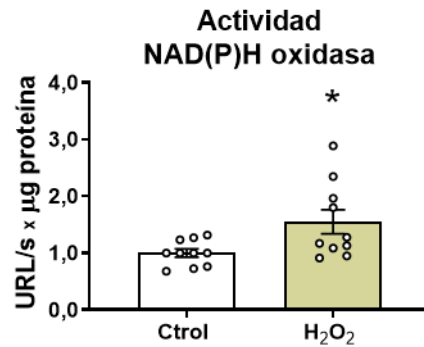
La producción de anión superóxido se estudió tanto por citometría de flujo como por microscopía de fluorescencia utilizando la sonda fluorescente DHE, y se observó que el tratamiento con IL-1 $\beta$  incrementó su producción en las CMLV de ratón (Figura 26a, b). Seguidamente, se analizó la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando la sonda DCFH-DA. Como se observa en la Figura 26c, el tratamiento con IL-1 $\beta$  también incrementó la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las CMLV de ratón.



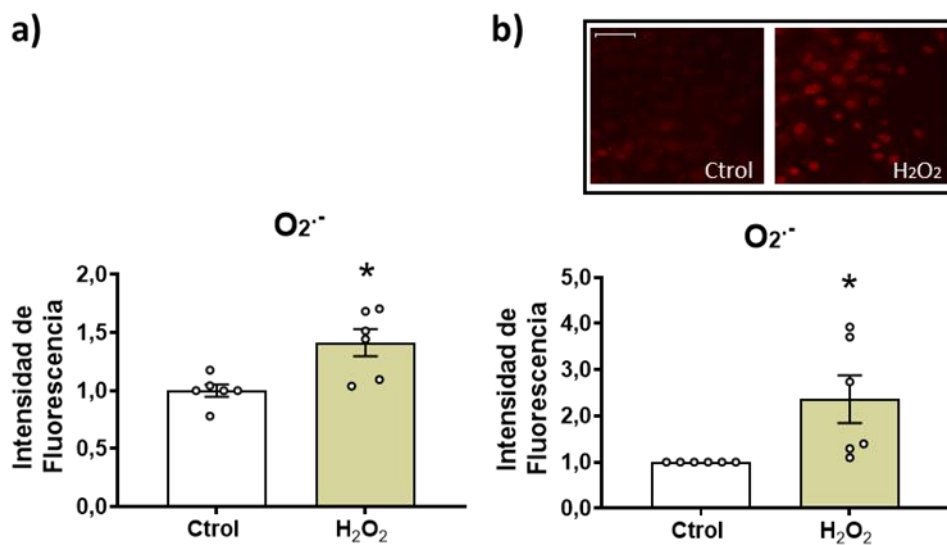
**Figura 26. IL-1 $\beta$  induce la producción de especies reactivas de oxígeno.** Efecto de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en CMLV de aorta de ratón medida por citometría de flujo (a) y microscopía de fluorescencia (b). Las imágenes representativas se muestran en la parte superior. Las imágenes se capturaron con un microscopio de fluorescencia; la barra de escala representa 100  $\mu$ m. (c) Efecto de IL-1 $\beta$  sobre la producción de  $H_2O_2$  medida por citometría de flujo. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como valor relativo respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  por  $t$  de Student pareada.

### 1.1.2. Efecto de $H_2O_2$ sobre la actividad NAD(P)H oxidasa y la producción de anión superóxido

A continuación, estudiamos el efecto de la adición exógena de  $H_2O_2$  sobre el estrés oxidativo.  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M, 1 h) aumentó tanto la actividad NAD(P)H oxidasa (Figura 27) como la producción de anión superóxido (Figura 28a, b), lo que indica la existencia, en este tipo celular, de un mecanismo de producción de ROS inducida por ROS, tal y como se ha descrito (Hernanz *et al.*, 2014).



**Figura 27. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa.** Efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM, 1 h) sobre la actividad NAD(P)H oxidasa en CMLV de aorta de ratón. Los resultados (media ± ES) están expresados como valor relativo respecto al control (Ctrl). \*p<0,05 por t de Student pareada. URL: unidades relativas de luz.



**Figura 28. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la producción de anión superóxido.** Efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM, 1 h) sobre la producción de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) en CMLV de aorta de ratón medida por citometría de flujo (a) y microscopía de fluorescencia (b). Las imágenes representativas se muestran en la parte superior. Las imágenes se capturaron con un microscopio de fluorescencia; la barra de escala representa 100 µm. Los resultados (media ± ES) están expresados como valor relativo respecto al control (Ctrl). \*p<0,05 por t de Student pareada.

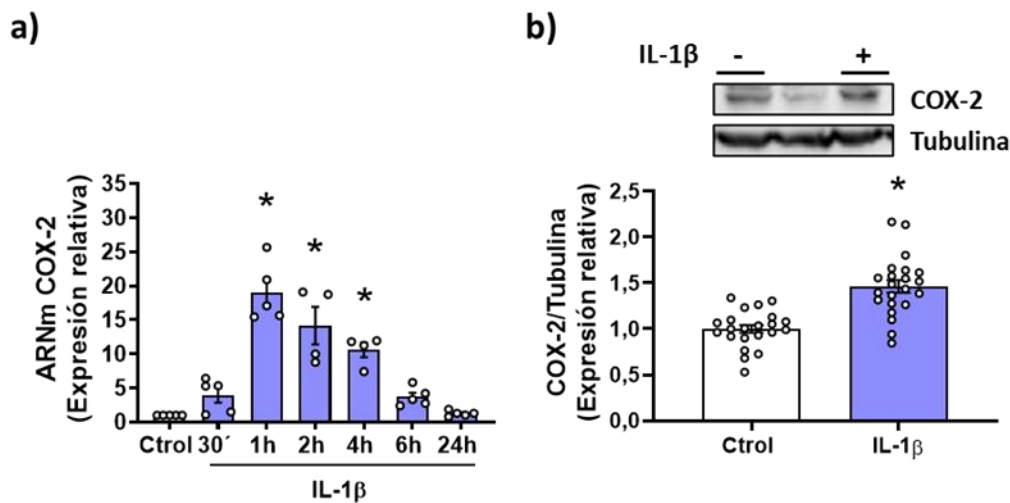
Los resultados mostrados en este apartado confirman que la citoquina proinflamatoria IL-1β induce la producción de ROS (O<sub>2</sub><sup>·-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en la línea celular MOVAS, posiblemente debido al aumento de la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa.

## 1.2. PARTICIPACIÓN DE ROS EN LA INDUCCIÓN DE COX-2 POR IL-1 $\beta$

A continuación, analizamos el efecto de IL-1 $\beta$  sobre la expresión de COX-2, enzima que puede ser inducida por estrés oxidativo y estímulos inflamatorios (Zhao *et al.*, 2021).

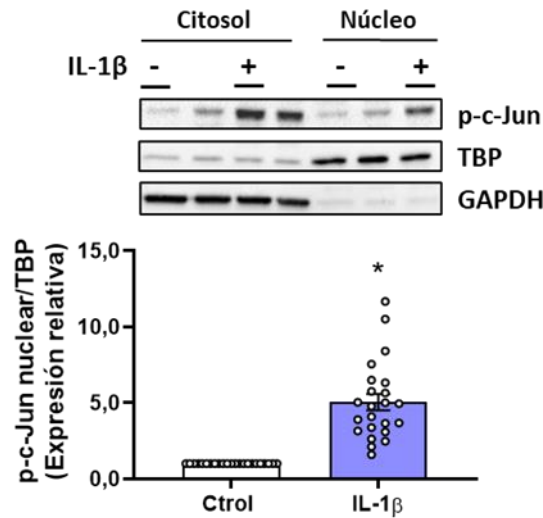
### 1.2.1. Efecto de IL-1 $\beta$ sobre la vía MAPK/AP-1/COX-2

El tratamiento de las CMLV de aorta de ratón con IL-1 $\beta$  incrementó de manera dependiente del tiempo los niveles del ARN mensajero de COX-2, observándose el pico de expresión a 1 hora (Figura 29a), por lo que los siguientes experimentos se realizaron estimulando las CMLV de aorta de ratón con IL-1 $\beta$  durante ese tiempo; en estas condiciones, IL-1 $\beta$  produjo también un aumento de la expresión proteica de COX-2 (Figura 29b).



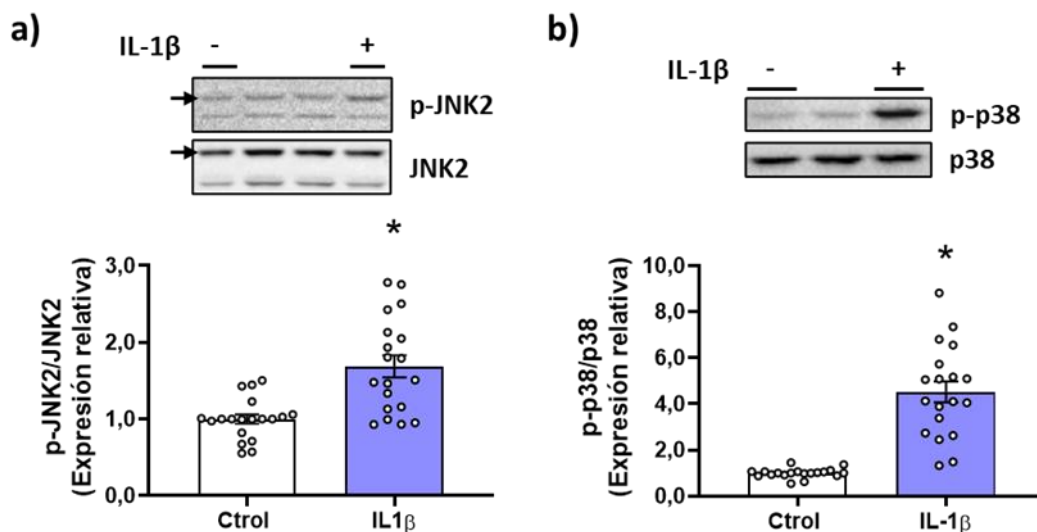
**Figura 29. IL-1 $\beta$  incrementa la expresión de COX-2.** (a) Niveles de ARNm de COX-2 en CMLV de aorta de ratón tratadas durante diferentes tiempos con IL-1 $\beta$  (10 ng/ml). (b) Expresión proteica de COX-2 en cultivos estimulados con IL-1 $\beta$  (1 h). En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  vs. Ctrl por ANOVA de una vía seguido de post test de Bonferroni (a) y  $t$  de Student pareada (b).

Uno de los factores de transcripción que regula la expresión de COX-2 es AP-1 (Telliez *et al.*, 2006; Korbecki *et al.*, 2013). El tratamiento con IL-1 $\beta$  indujo la translocación al núcleo de p-c-Jun, una de las subunidades que conforman AP-1, confirmando así la activación de este factor de transcripción (Figura 30).



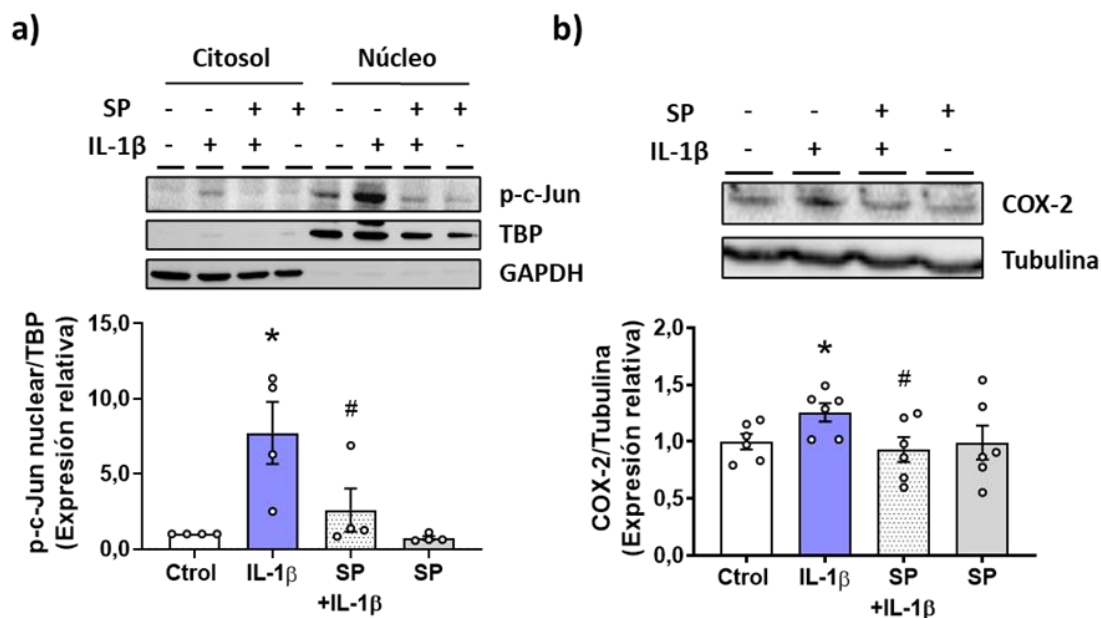
**Figura 30. IL-1β incrementa la expresión nuclear de p-c-Jun.** Efecto de IL-1β (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica nuclear de p-c-Jun en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo de la expresión en citosol y en núcleo. Para confirmar el éxito en el fraccionamiento celular se utilizó la expresión de TBP en núcleo y la de GAPDH en citosol. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  por  $t$  de Student pareada.

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) se activan por fosforilación dual en residuos de treonina y tirosina en respuesta a una amplia gama de estímulos extracelulares, entre ellos, IL-1β. Una diana de las MAPK es el factor de transcripción AP-1 (Pearson *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2010). En el presente estudio observamos que el tratamiento de las CMLV de aorta de ratón con IL-1β indujo un aumento en la fosforilación, tanto de la proteína JNK2 como de p38 (Figura 31).



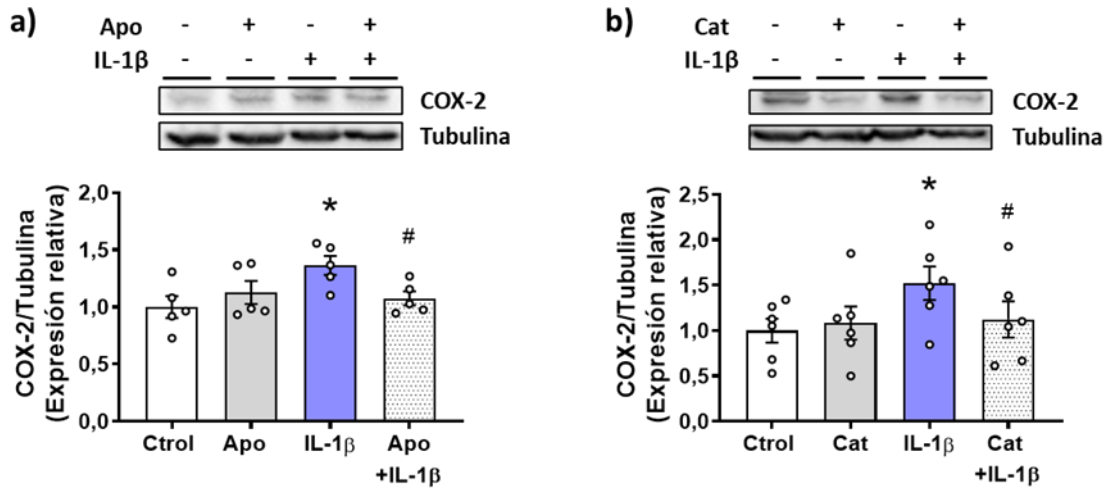
**Figura 31. IL-1β incrementa la expresión de p-JNK2 y p-p38.** Efecto de IL-1β (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de p-JNK2 (a) y p-p38 (b) en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestran blots representativos. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  por  $t$  de Student pareada.

Una vez demostrada la activación de las MAPK por IL-1 $\beta$ , para comprobar la participación de JNK en la vía de señalización inducida por la citoquina utilizamos el inhibidor farmacológico SP600125. El tratamiento de las CMLV con SP600125 (20  $\mu$ M) revirtió tanto el aumento de la translocación nuclear de p-c-Jun como el aumento de la expresión de la enzima proinflamatoria COX-2 inducidos por IL-1 $\beta$  (Figura 32), confirmando la participación de JNK en la activación de AP-1 y COX-2 por esta citoquina.



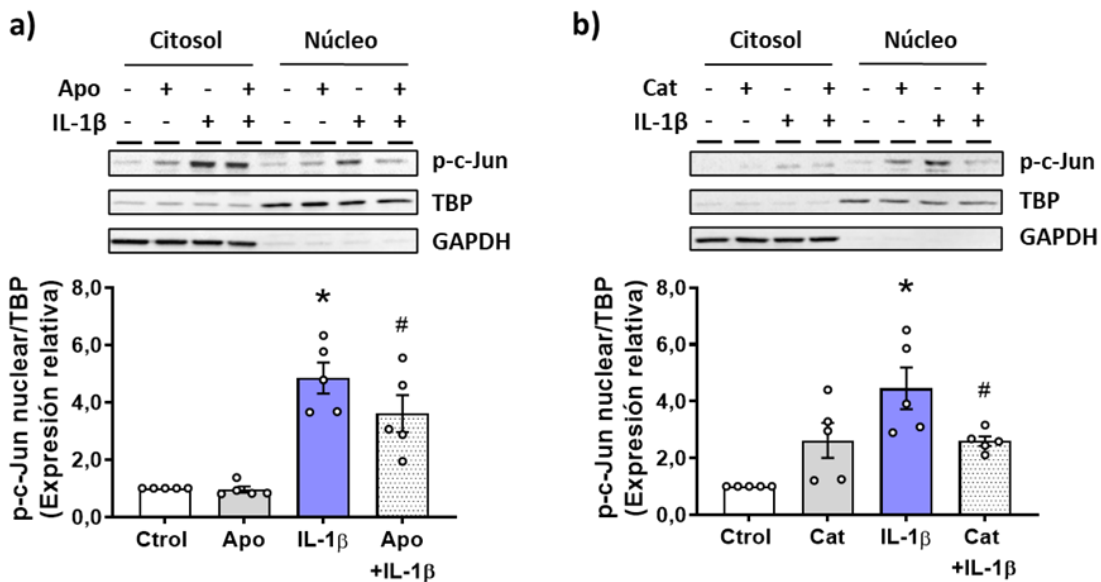
### 1.2.2. Participación de ROS en la activación de la vía AP-1/COX-2

A continuación, analizamos la participación de las ROS en el efecto de IL-1 $\beta$  sobre la expresión de COX-2. Para ello, las CMLV se trataron con el antioxidante apocinina y con catalasa, enzima que detoxifica el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El tratamiento de las CMLV con estos fármacos no modificó la expresión de COX-2 en situación control; sin embargo, tanto apocinina (30  $\mu$ M) como catalasa (1000 U/ml) redujeron la inducción de la expresión de esta enzima por IL-1 $\beta$  (Figura 33), sugiriendo la participación del estrés oxidativo en la inducción de la expresión de COX-2.



**Figura 33. El estrés oxidativo participa en el incremento de la expresión de COX-2 inducido por IL-1β.** Efecto de apocinina (Apo, 30  $\mu$ M, 2 h) (a) y catalasa (Cat, 1000 U/ml, 2 h) (b) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de COX-2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestran blots representativos. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  vs. Ctrl y # $p < 0,05$  vs. IL-1 $\beta$  por *t* de Student pareada.

De forma similar, analizamos la participación de ROS en la activación del factor de transcripción AP-1. Como se muestra en la **Figura 34**, tanto apocinina como catalasa redujeron la expresión nuclear de p-c-Jun inducida por IL-1 $\beta$ ; sin embargo, ninguno de los dos fármacos modificó significativamente la expresión de esta subunidad del factor de transcripción en situación control.



**Figura 34. El estrés oxidativo participa en la translocación al núcleo de p-c-Jun inducida por IL-1β.** Efecto de apocinina (Apo, 30  $\mu$ M, 2 h) (a) y catalasa (Cat, 1000 U/ml, 2 h) (b) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de p-c-Jun en extractos nucleares de CMLV de ratón. En la parte superior se muestran blots representativos de la expresión en citosol y en núcleo. Para confirmar el éxito en el fraccionamiento celular se utilizó la expresión de TBP en núcleo y la de GAPDH en citosol. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  vs. Ctrl y # $p < 0,05$  vs. IL-1 $\beta$  por *t* de Student pareada.

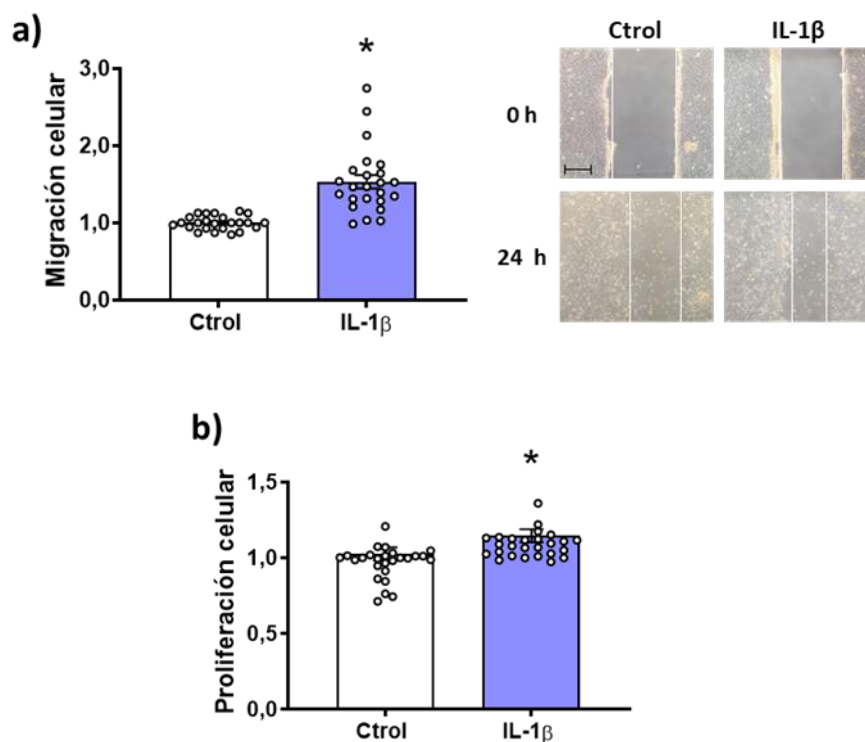
Los resultados mostrados en este apartado indican que las ROS participan en la traslocación al núcleo de p-c-Jun inducida por IL-1 $\beta$  y, consecuentemente, en el aumento de la expresión de COX-2 en las CMLV de aorta de ratón.

### 1.3. PARTICIPACIÓN DE ROS EN LA MIGRACIÓN Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR INDUCIDAS POR IL-1 $\beta$

#### 1.3.1. Efecto de IL-1 $\beta$ sobre la migración y la proliferación celular

Como se ha comentado previamente, IL-1 $\beta$  contribuye a los procesos de migración y proliferación de las CMLV a través de la inducción de inflamación y estrés oxidativo (Martín *et al.*, 2012; Aguado *et al.*, 2015; 2016). Ambos procesos están implicados en el remodelado vascular que contribuye al desarrollo de patologías cardiovasculares, como la hipertensión (Melton and Qiu, 2021).

En CMLV de ratón, el tratamiento con IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 24 h) indujo un aumento tanto de la migración (**Figura 35a**) como de la proliferación celular (**Figura 35b**).

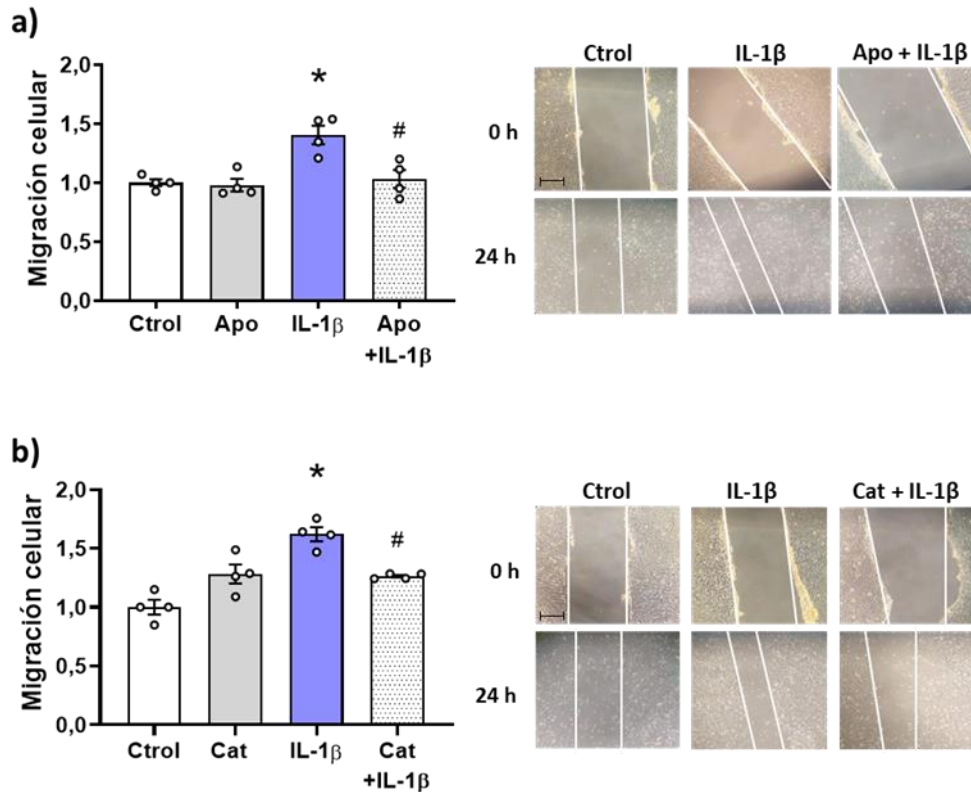


**Figura 35. IL-1 $\beta$  incrementa la migración y proliferación de las CMLV.** (a) Efecto de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 24 h) sobre la migración celular de CMLV de aorta de ratón. A la derecha se muestran imágenes representativas. La barra de escala representa 50  $\mu$ m. Los resultados (media  $\pm$  ES) se expresan como valor relativo de cierre de la herida respecto a la situación control (Ctrol). (b) Efecto de IL-1 $\beta$  sobre la proliferación celular. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como valor relativo respecto al Ctrol. \* $p$ <0,05 por  $t$  de Student pareada.



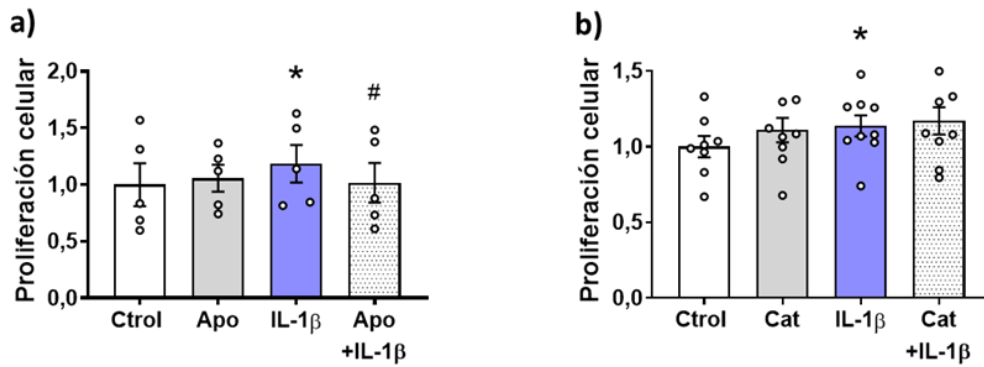
### 1.3.2. Participación de ROS en la migración y la proliferación celular inducidas por IL-1 $\beta$

Una vez comprobado que IL-1 $\beta$  aumenta la migración y la proliferación celular, analizamos la contribución de las especies reactivas de oxígeno en estos efectos. El tratamiento de las CMLV con los antioxidantes apocinina y catalasa redujo la migración celular inducida por IL-1 $\beta$  (Figura 36).



**Figura 36. El estrés oxidativo participa en el incremento de la migración celular inducido por IL-1 $\beta$ .** Efecto de apocinina (Apo, 30  $\mu$ M, 24 h) (a) y catalasa (Cat, 1000 U/ml, 24h) (b) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 24 h) sobre la migración celular de CMLV de aorta de ratón. A la derecha se muestran imágenes representativas. La barra de escala representa 50  $\mu$ m. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como valor relativo de cierre de la herida respecto a la situación control (Ctrol). \* $p$ <0,05 vs. Ctrol y # $p$ <0,05 vs. IL-1 $\beta$  por *t* de Student pareada.

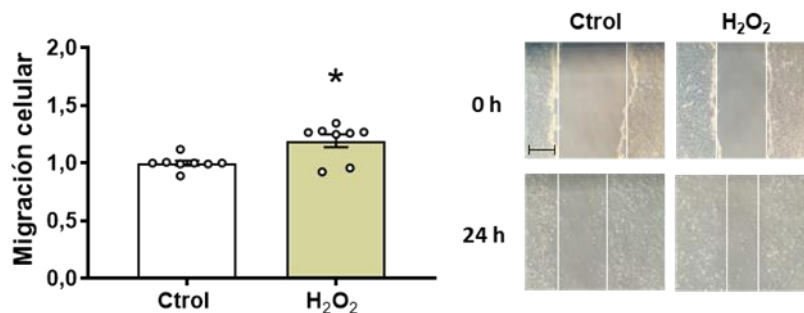
Respecto a la proliferación celular inducida por IL-1 $\beta$  en CMLV de ratón, esta fue reducida por apocinina, pero no por catalasa (Figura 37). Ninguno de los dos fármacos modificó ni la migración ni la proliferación celular en situación control (Figuras 36, 37).



**Figura 37. El estrés oxidativo participa en el incremento de la proliferación celular inducido por IL-1 $\beta$ .** Efecto de apocinina (Apo, 30  $\mu$ M, 24 h) (a) y catalasa (Cat, 1000 U/ml, 24h) (b) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 24 h) sobre la proliferación celular de CMLV de aorta de ratón. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como valor relativo respecto al control (Ctl). \* $p$ <0,05 vs. Ctl y # $p$ <0,05 vs. IL-1 $\beta$  por  $t$  de Student pareada.

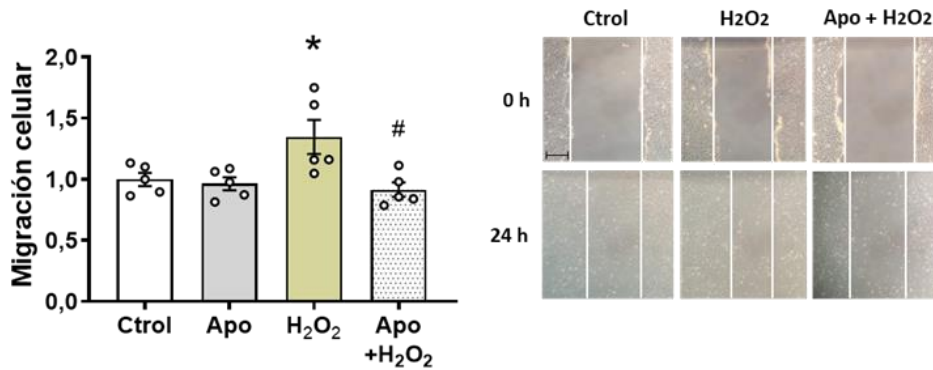
### 1.3.3. Efecto de ROS sobre la migración celular

Una vez demostrado el papel de las ROS en la migración celular inducida por IL-1 $\beta$  en CMLV de ratón, analizamos el efecto de la adición exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre dicho parámetro. La incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M, 24 h) incrementó la migración celular (Figura 38).



**Figura 38. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la migración de las CMLV.** Efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M, 24 h) sobre la migración celular de CMLV de aorta de ratón. A la derecha se muestran imágenes representativas. La barra de escala representa 50  $\mu$ m. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como valor relativo de cierre de la herida respecto a la situación control (Ctl). \* $p$ <0,05 por  $t$  de Student pareada.

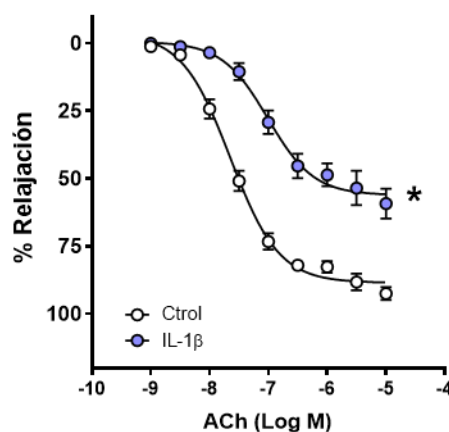
Puesto que en este tipo celular la adición exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la activación de la enzima NAD(P)H oxidasa y, en consecuencia, la producción de ROS, quisimos comprobar si este mecanismo participaba también en el efecto inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la migración de las CMLV. Para ello, los cultivos celulares se trataron con apocinina, observándose una reducción de la migración de las CMLV inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 39). Estos resultados sugieren la participación del O<sub>2</sub><sup>-</sup> en los efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la migración de las CMLV.



**Figura 39. El anión superóxido participa en el incremento de la migración celular inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Efecto de apocinina (Apo, 30  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M, 24 h) sobre la migración celular de CMLV de aorta de ratón. A la derecha se muestran imágenes representativas. La barra de escala representa 50  $\mu$ m. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como valor relativo de cierre de la herida respecto a la situación control (Ctról). \*p<0,05 vs. Ctról y #p<0,05 vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por *t* de Student pareada.

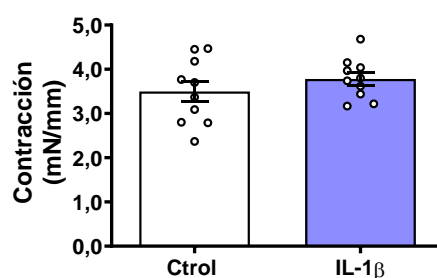
#### 1.4. EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR

Se ha descrito que IL-1 $\beta$ , a través de la inducción de inflamación y estrés oxidativo, puede contribuir al desarrollo de disfunción endotelial y de alteraciones en la función vascular, procesos ambos que se han asociado a diversas patologías cardiovasculares (Jiménez-Altayó *et al.*, 2006; Gimbrone and García-Cardeña, 2016). Para comprobar el efecto de IL-1 $\beta$  sobre la función vascular, se incubaron segmentos de aorta de ratón en presencia o ausencia de la citoquina. Como se observa en la **Figura 40**, IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 24 h) produjo un deterioro de la relajación endotelio-dependiente inducida por acetilcolina. Esta vasodilatación está mediada por NO, como sugiere el hecho de que sea abolida por el inhibidor de la NOS, L-NAME (datos no mostrados). Por lo tanto, es posible que el estrés oxidativo generado por IL-1 $\beta$ , al reducir la biodisponibilidad de NO, contribuya a esta disfunción endotelial.



**Figura 40. IL-1 $\beta$  induce disfunción endotelial.** Efecto de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 24 h) sobre la curva concentración-respuesta a acetilcolina (ACh) en segmentos de aorta de ratón. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a fenilefrina. \*p<0,05 mediante ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni (n=10). Ctról: Control.

Por otra parte, el tratamiento con IL-1 $\beta$  no afectó a la respuesta vasoconstrictora inducida por K-KHS en aorta de ratón, sugiriendo que la contractilidad muscular no está afectada por esta citoquina (**Figura 41**).



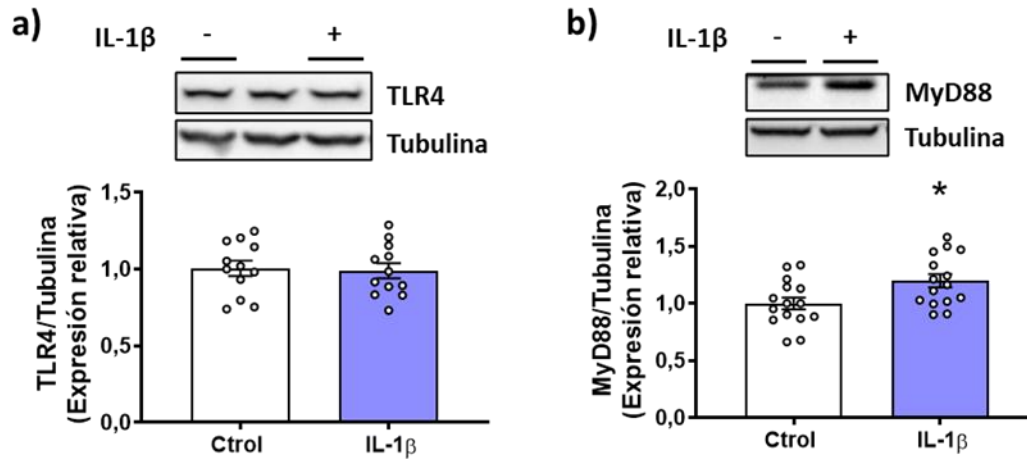
**Figura 41. IL-1 $\beta$  no altera la contractilidad vascular.** Efecto de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 24 h) sobre la contracción inducida por K-KHS en segmentos de aorta de ratón. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES. Ctrl: Control.

## 2. PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DE TLR4 EN EL EFECTO PROINFLAMATORIO DE IL-1 $\beta$

Una vez que confirmamos en las CMLV de aorta de ratón utilizadas en este estudio el efecto inflamatorio de la citoquina IL-1 $\beta$  y el papel de las ROS en el mismo, pasamos a abordar los siguientes objetivos de la Tesis Doctoral. Así, en primer lugar, analizamos la participación de la vía de señalización del receptor TLR4 en los efectos de IL-1 $\beta$ . TLR4 es un receptor de membrana que se expresa en la superficie de diferentes tipos celulares, incluidas las CMLV (Nunes *et al.*, 2019); desempeña un importante papel como mediador de la respuesta inflamatoria y, además, contribuye al desarrollo de patologías cardiovasculares (Roshan *et al.*, 2016; (Nunes *et al.*, 2019; de Oliveira and Nunes, 2021). Recientemente se ha determinado la existencia de una relación entre este receptor e IL-1 $\beta$ , ya que se ha descrito que esta citoquina incrementa la actividad de la vía TLR4/NF- $\kappa$ B (Liu *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2020), aunque el mecanismo exacto por el cual IL-1 $\beta$  interacciona con TLR4 es aún desconocido.

### 2.1. EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA VÍA DE TLR4

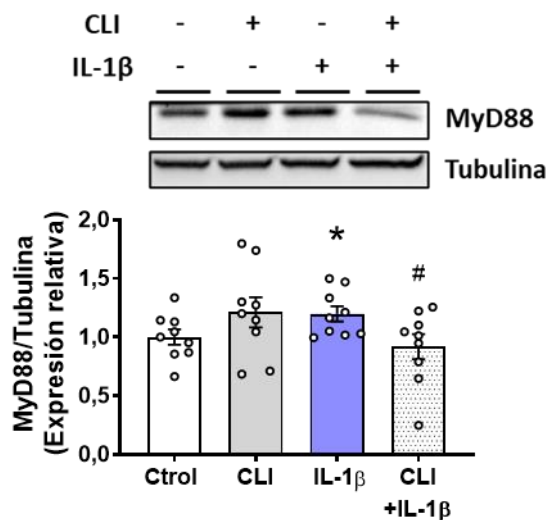
En primer lugar, estudiamos si la estimulación con IL-1 $\beta$  ejerce algún efecto sobre la vía de señalización de TLR4. Así, observamos que el tratamiento de las CMLV de aorta de ratón con IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) no modificó la expresión del receptor TLR4 (**Figura 42a**), pero aumentó la expresión de la proteína adaptadora MyD88 (**Figura 42b**).



**Figura 42. IL-1 $\beta$  incrementa la expresión de MyD88.** Efecto de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica del receptor TLR4 (a) y la proteína MyD88 (b) en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestran blots representativos. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  por  $t$  de Student pareada.

Tanto la vía de señalización de TLR4 como la de IL-1 $\beta$  convergen en la activación de la proteína adaptadora MyD88 (Gay *et al.*, 2014; Abbate *et al.*, 2020). Por ello, quisimos comprobar si la vía de TLR4 estaba involucrada en el aumento de expresión de MyD88 inducido por IL-1 $\beta$ . Para ello, los cultivos celulares se incubaron con CLI-095, un inhibidor de TLR4 que se une al dominio intracelular de este receptor, bloqueando la señalización desencadenada por la interacción ligando-receptor (Matsunaga *et al.*, 2011).

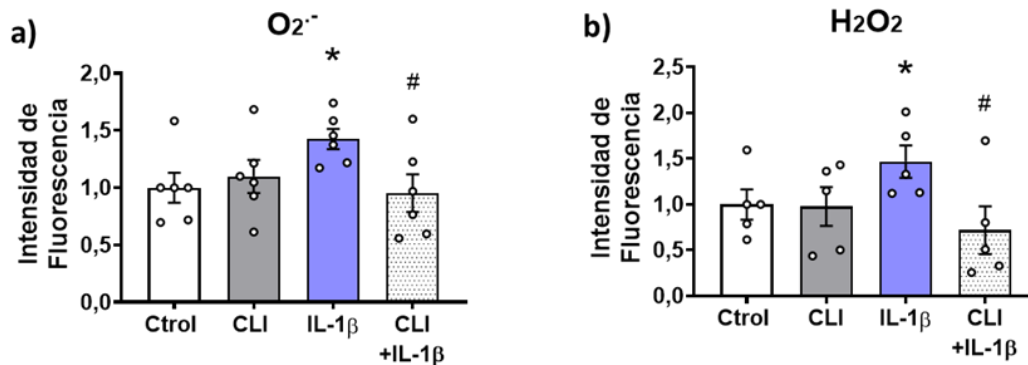
Como se muestra en la **Figura 43**, CLI-095 (1  $\mu$ M) no modificó la expresión de MyD88 en situación control, pero redujo la inducción de su expresión por IL-1 $\beta$ , lo que demuestra que esta citoquina activa la vía de señalización de TLR4/MyD88 en estas células.



**Figura 43. TLR4 participa en el incremento de la expresión de MyD88 inducido por IL-1 $\beta$ .** Efecto de CLI-095 (1  $\mu$ M, 2h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de MyD88 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  vs. Ctrl y # $p < 0,05$  vs. IL-1 $\beta$  por  $t$  de Student pareada.

## 2.2. PARTICIPACIÓN DE TLR4 EN EL EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

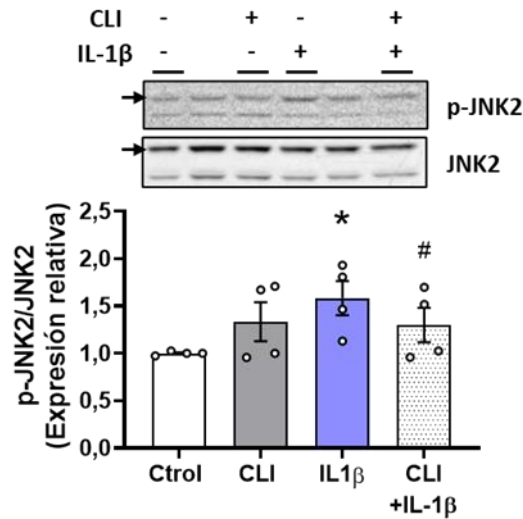
Una vez comprobada la activación de la vía TLR4/MyD88 por IL-1 $\beta$ , analizamos la participación de dicha vía de señalización en los efectos de esta citoquina proinflamatoria. En primer lugar, estudiamos la participación de TLR4 sobre la producción de ROS inducida por IL-1 $\beta$ . La incubación de las CMLV con el inhibidor de TLR4 CLI-095 inhibió el aumento de la producción de O $_2^{\cdot-}$  y de H $_2$ O $_2$  inducido por IL-1 $\beta$  (Figura 44). En situación control, CLI-095 no alteró la producción de ninguna de estas ROS.



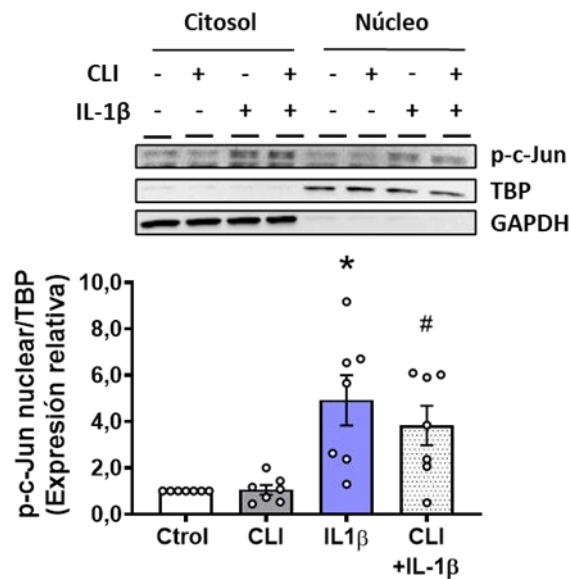
**Figura 44. TLR4 participa en el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno inducido por IL-1 $\beta$ .** Efecto de CLI (1  $\mu$ M, 2h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la producción de anión superóxido (O $_2^{\cdot-}$ ) (a) y H $_2$ O $_2$  (b) en CMLV de aorta de ratón, medidas por citometría de flujo. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como valor relativo respecto al control (Ctrlol). \* $p$ <0,05 vs. Ctrlol y # $p$ <0,05 vs. IL-1 $\beta$  por  $t$  de Student pareada.

## 2.3. PARTICIPACIÓN DE TLR4 EN EL EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA VÍA MAPK/AP-1/COX-2

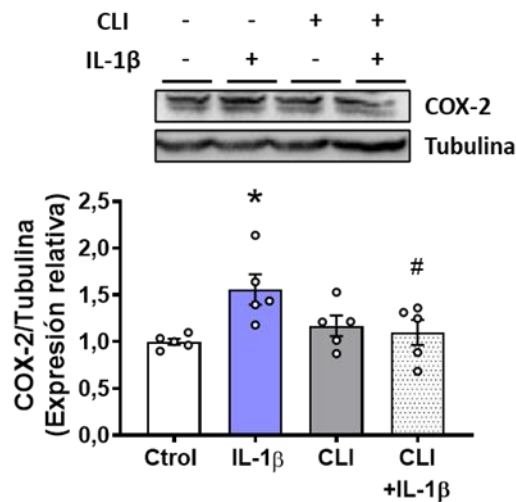
Como se ha descrito anteriormente, el tratamiento de las CMLV de ratón con IL-1 $\beta$  da lugar a un aumento en la fosforilación de JNK, que se asoció al aumento de la translocación nuclear de la subunidad p-c-Jun del factor de transcripción AP-1, así como a un aumento de la expresión de COX-2 (Figuras 31 y 32). Ahora analizamos la participación de TLR4 en la activación de esta vía de señalización por IL-1 $\beta$ . El tratamiento de las CMLV de ratón con CLI-095 redujo tanto el aumento de la expresión de p-JNK2 (Figura 45), como de la translocación al núcleo de p-c-Jun (Figura 46) y de la expresión de COX-2 inducidos por IL-1 $\beta$  (Figura 47). CLI-095 no modificó ninguno de estos parámetros en situación control.



**Figura 45. TLR4 participa en el incremento de la expresión de p-JNK2 inducido por IL-1 $\beta$ .** Efecto de CLI-095 (1  $\mu$ M, 2 h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de p-JNK2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrlol). \* $p$ <0,05 vs. Ctrlol y # $p$ <0,05 vs. IL-1 $\beta$  por  $t$  de Student pareada.



**Figura 46. TLR4 participa en la translocación nuclear de p-c-Jun inducida por IL-1 $\beta$ .** Efecto de CLI-095 (1  $\mu$ M, 2 h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica nuclear de p-c-Jun en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo de la expresión en citosol y en núcleo. Para confirmar el éxito en el fraccionamiento celular se utilizó la expresión de TBP en núcleo y la de GAPDH en citosol. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrlol). \* $p$ <0,05 vs. Ctrlol y # $p$ <0,05 vs. IL-1 $\beta$  por  $t$  de Student pareada.

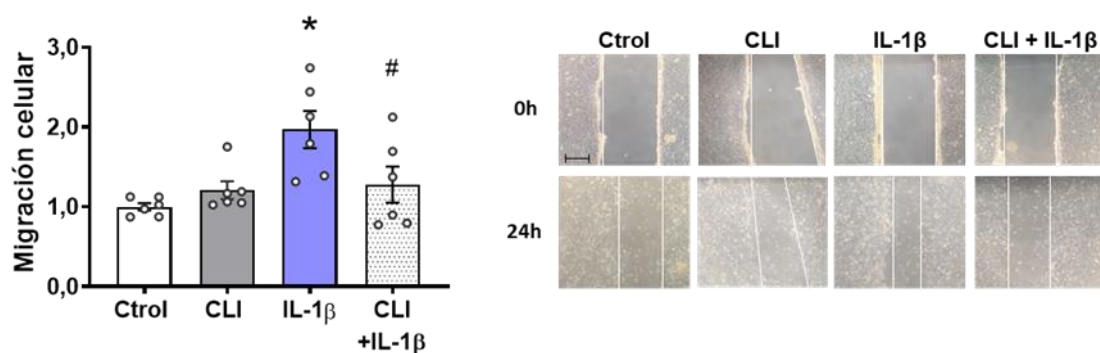


**Figura 47. TLR4 participa en el incremento de la expresión de COX-2 inducido por IL-1β.** Efecto de CLI-095 (1 μM, 2 h) en ausencia y presencia de IL-1β (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de COX-2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrlol). \*p < 0,05 vs. Ctrlol y #p < 0,05 vs. IL-1β por *t* de Student pareada.

En conjunto, los resultados mostrados en este apartado sugieren que la vía de TLR4 participa en la activación de la vía MAPK/AP1/COX-2 inducida por IL-1β.

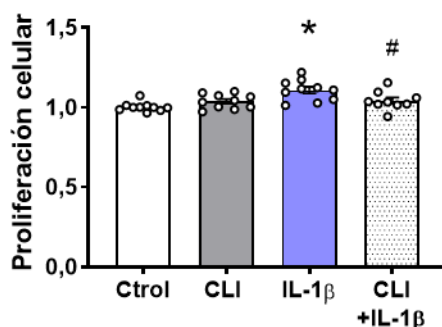
#### 2.4. PARTICIPACIÓN DE TLR4 EN EL EFECTO DE IL-1β SOBRE LA MIGRACIÓN Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR

A continuación, se analizó la participación de la vía de señalización de TLR4 en la migración y la proliferación celular inducidas por IL-1β. El tratamiento de las CMLV de ratón con CLI 095 redujo el aumento tanto en la migración celular (Figura 48) como en la proliferación celular (Figura 49) inducido por IL-1β (10 ng/ml, 24 h), mientras que no afectó a estos procesos en cultivos control.



**Figura 48. TLR4 participa en el incremento de la migración celular inducido por IL-1β.** Efecto de CLI (1 μM, 24 h) en ausencia y presencia de IL-1β (10 ng/ml, 24 h) sobre la migración celular de CMLV de aorta de ratón. A la derecha se muestran imágenes representativas. La barra de escala representa 50 μm. Los resultados (media ± ES) están expresados como valor relativo de cierre de la herida respecto a la situación control (Ctrlol). \*p < 0,05 vs. Ctrlol y #p < 0,05 vs. IL-1β por *t* de Student pareada.



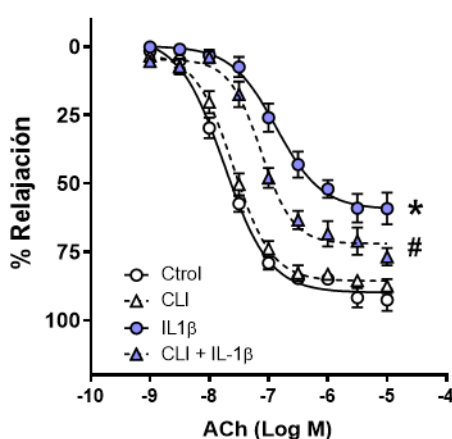


**Figura 49. TLR4 participa en el incremento de la proliferación celular inducido por IL-1β.** Efecto de CLI (1  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 24 h) sobre la proliferación celular de CMLV de aorta de ratón. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como valor relativo respecto al control (Ctrl). \* $p$ <0,05 vs. Ctrl y # $p$ <0,05 vs. IL-1 $\beta$  por  $t$  de Student pareada.

## 2.5. PARTICIPACIÓN DE TLR4 EN EL EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR

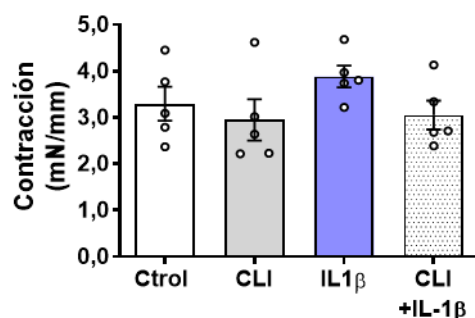
Como se ha comentado, la incubación de las aortas de ratón con IL-1 $\beta$  indujo un deterioro de la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio inducida por acetilcolina (Figura 40). Ahora analizamos si TLR4 participaba en este efecto. Para ello, se utilizaron segmentos de aorta de ratón incubadas con el inhibidor de TLR4 CLI-095, con IL-1 $\beta$  o con ambos.

La incubación durante 24 h con CLI-095 (1  $\mu$ M) no modificó la respuesta vasodilatadora inducida por acetilcolina en segmentos control, pero mejoró la deteriorada respuesta observada en segmentos incubados con IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, Figura 50), lo que sugiere la participación de la vía TLR4 en la disfunción endotelial inducida por IL-1 $\beta$ .



**Figura 50. TLR4 participa en disfunción endotelial inducida por IL-1 $\beta$  en aorta de ratón.** Efecto de CLI-095 (1  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 24 h) sobre la curva concentración-respuesta a acetilcolina (ACh) en segmentos de aorta de ratón. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a fenilefrina. \* $p$ <0,05 vs. Control (Ctrl) y # $p$ <0,05 vs. IL-1 $\beta$ , mediante ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni (n=5).

Por otra parte, CLI-095 no modificó la respuesta vasoconstrictora a K-KHS, independientemente de la presencia o ausencia de IL-1 $\beta$  (Figura 51). Estos resultados sugieren que la función muscular en estos vasos no está afectada ni por la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  ni por la vía de TLR4.



**Figura 51. TLR4 no altera la contractilidad vascular en aorta de ratón.** Efecto de CLI-095 (1  $\mu$ M, 24h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 24 h) sobre la contracción inducida por K-KHS en segmentos de aorta de ratón. Los resultados están expresados como media  $\pm$  ES. Ctrol: Control.

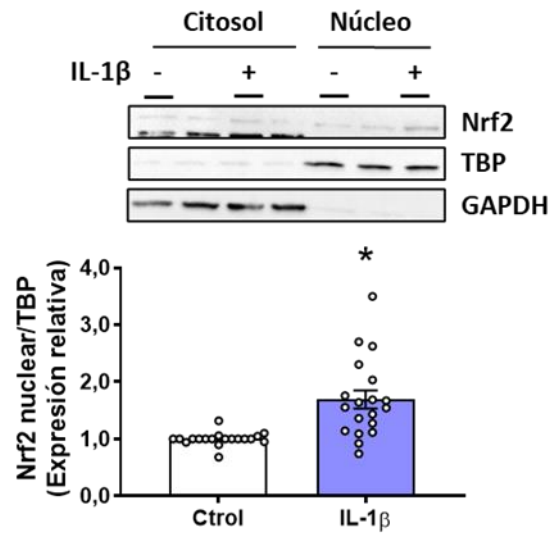
### 3. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 POR IL-1 $\beta$

Nrf2 es un factor de transcripción sensible a estrés oxidativo y a compuestos electrófilos que regula la expresión de un conjunto de genes antioxidantes y antiinflamatorios. En condiciones fisiológicas, Nrf2 se encuentra inactivo en el citosol unido a su represor Keap1. Condiciones de estrés oxidativo inactivan Keap1 permitiendo la activación de Nrf2, el cual se transloca al núcleo para realizar sus funciones (Crisman *et al.*, 2023). Puesto que IL-1 $\beta$  induce estrés oxidativo, analizamos el efecto de IL-1 $\beta$  sobre la activación de la vía de Nrf2 y que papel tiene esto en los efectos de esta citoquina proinflamatoria.

#### 3.1. EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA VÍA DE Nrf2

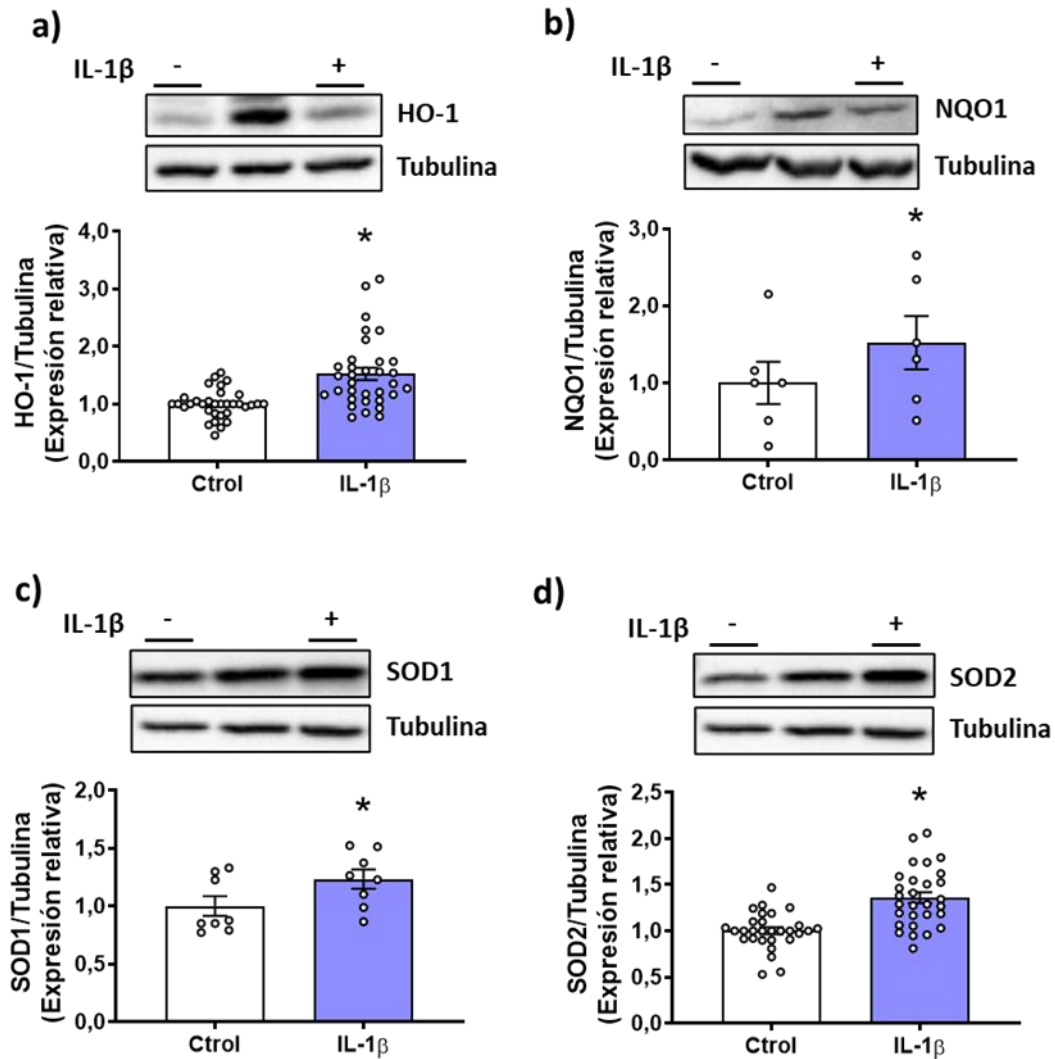
##### 3.1.1. Activación de la vía de Nrf2 por IL-1 $\beta$

En primer lugar, analizamos la expresión del factor de transcripción Nrf2 en CMLV de ratón. Como se observa en la Figura 52, el tratamiento con IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) indujo un aumento de la translocación de Nrf2 al núcleo, sugiriendo la activación de este factor de transcripción por la citoquina.



**Figura 52. IL-1 $\beta$  incrementa la expresión nuclear de Nrf2.** Efecto de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica nuclear de Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo de la expresión en citosol y en núcleo. Para confirmar el éxito en el fraccionamiento celular se utilizó la expresión de TBP en núcleo y la de GAPDH en citosol. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrol). \* $p < 0,05$  por  $t$  de Student pareada.

A continuación, analizamos la expresión de algunas de las enzimas reguladas por el factor de transcripción Nrf2, y observamos que el tratamiento con IL-1 $\beta$  indujo un aumento en la expresión de HO-1, NQO1, SOD1 y SOD2 en las CMLV de ratón (**Figura 53**).

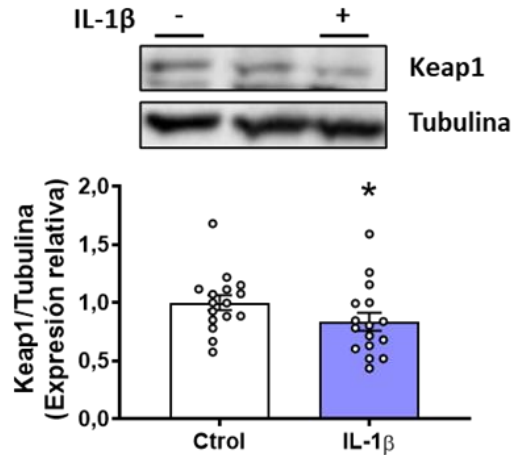


**Figura 53. IL-1 $\beta$  incrementa la expresión de HO-1, NQO1, SOD1 y SOD2.** Efecto de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de HO-1 (a), NQO1 (b), SOD1 (c) y SOD2 (d) en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestran blots representativos. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  por  $t$  de Student pareada.

En conjunto, los resultados mostrados en este apartado indican la activación del factor de transcripción Nrf2 tras la estimulación de las CMLV de ratón con la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ .

### 3.1.2. Efecto de IL-1 $\beta$ sobre Keap1

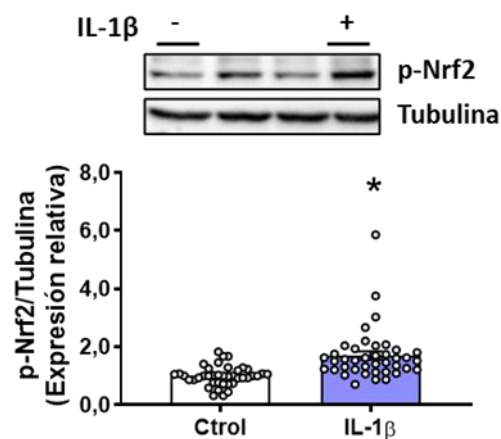
A continuación, analizamos la expresión proteica del regulador negativo de Nrf2 Keap1. Como se muestra en la **Figura 54**, IL-1 $\beta$  redujo la expresión de Keap1 en las CMLV de ratón, lo que favorece la activación del factor de transcripción Nrf2.



**Figura 54. IL-1 $\beta$  reduce la expresión de Keap1.** Efecto de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de Keap1 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrol). \* $p < 0,05$  por  $t$  de Student pareada.

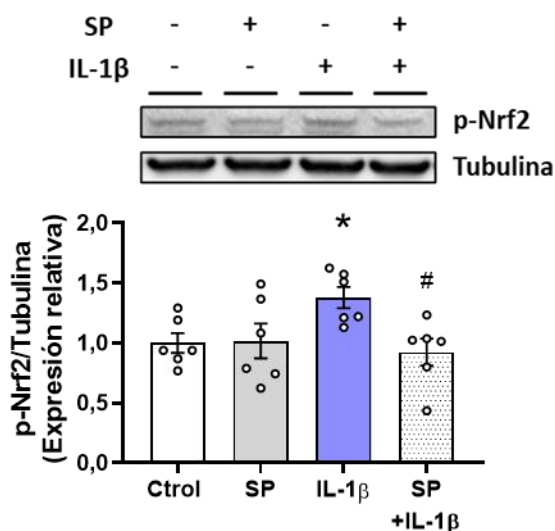
### 3.1.3. Efecto de IL-1 $\beta$ sobre la fosforilación de Nrf2

Nrf2 puede activarse, además, por vías no canónicas que, en muchos casos, implican su modificación postraducciona por fosforilación. Debido a esto, quisimos comprobar si la estimulación de las CMLV de ratón con IL-1 $\beta$  podía inducir la activación de Nrf2 por fosforilación. El tratamiento de las CMLV de ratón con IL-1 $\beta$  dio lugar a un aumento de la fosforilación de Nrf2 (**Figura 55**).



**Figura 55. IL-1 $\beta$  incrementa la expresión de p-Nrf2.** Efecto de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de p-Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrol). \* $p < 0,05$  por  $t$  de Student pareada.

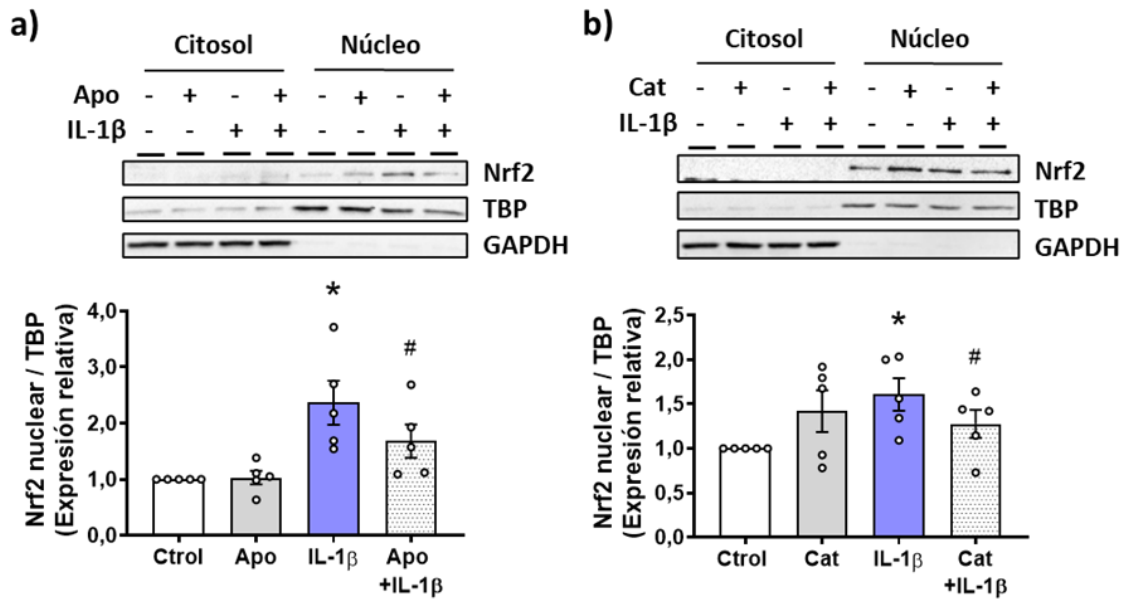
A continuación, analizamos la participación de JNK, la cual, como hemos comentado anteriormente, es activada por IL-1 $\beta$ , en la fosforilación de Nrf2 (**Figura 31a**). Para ello, utilizamos el inhibidor de JNK SP600125. El tratamiento de las CMLV de ratón con SP600125 redujo la fosforilación de Nrf2 inducida por IL-1 $\beta$ , mientras que no tuvo ningún efecto en ausencia de la citoquina (**Figura 56**). Esto indica que la fosforilación de Nrf2 inducida por IL-1 $\beta$  está mediada, al menos en parte, por JNK.



**Figura 56. JNK participa en el incremento de la expresión de p-Nrf2 inducida por IL-1 $\beta$ .** Efecto de SP600125 (SP, 20  $\mu$ M, 2h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de p-Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p$ <0,05 vs. Ctrl y # $p$ <0,05 vs. IL-1 $\beta$  por  $t$  de Student pareada.

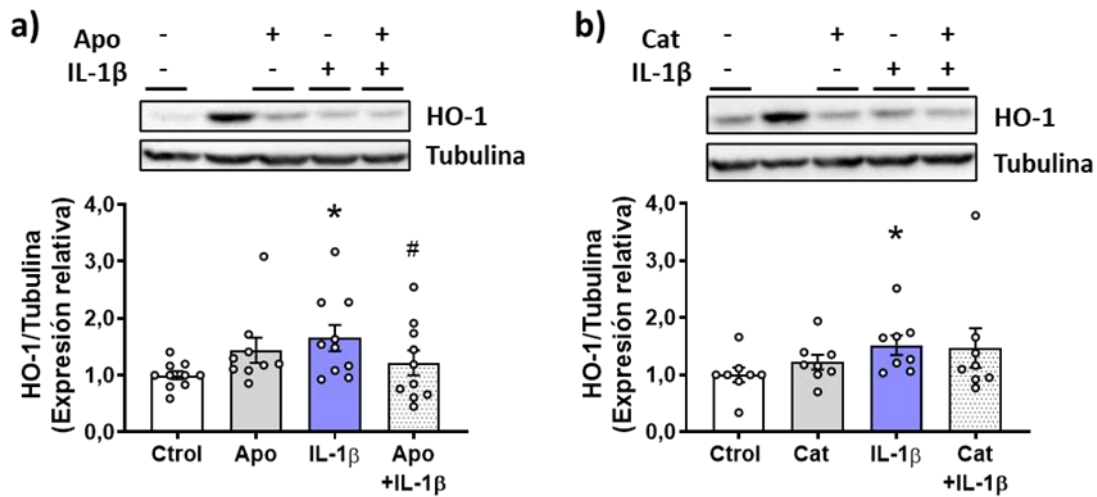
### 3.2. PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA VÍA DE Nrf2

Una vez confirmada la activación de Nrf2 por IL-1 $\beta$ , estudiamos si el estrés oxidativo inducido por esta citoquina participaba en la activación del factor de transcripción Nrf2. En primer lugar, analizamos si los antioxidantes apocinina y catalasa modificaban la translocación nuclear de Nrf2 inducida por IL-1 $\beta$ . En este caso, observamos que la incubación de las CMLV con ambos fármacos reducía la expresión nuclear de Nrf2 inducida por IL-1 $\beta$  (**Figura 57**), confirmando así la participación de ROS en la activación de este factor de transcripción. Ninguno de los dos fármacos afectó a la expresión nuclear de Nrf2 en situación control.

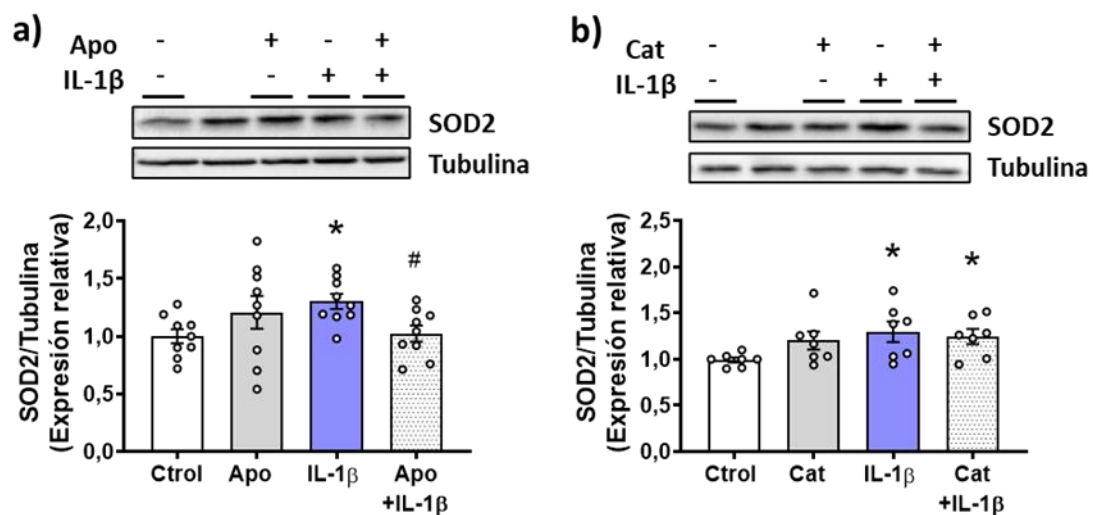


**Figura 57. El estrés oxidativo participa en la activación de Nrf2 inducida por IL-1β.** Efecto de apocinina (Apo, 30 μM, 2 h) (a) y catalasa (Cat, 1000 U/ml, 2 h) (b) en ausencia y presencia de IL-1β (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica nuclear de Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestran blots representativos de la expresión en citosol y en núcleo. Para confirmar el éxito en el fraccionamiento celular se utilizó la expresión de TBP en núcleo y la de GAPDH en citosol. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \*p<0,05 vs. Ctrl y #p<0,05 vs. IL-1β por t de Student pareada.

A continuación, analizamos si estos antioxidantes modificaban el efecto de IL-1β sobre la expresión de algunas de las proteínas reguladas por Nrf2 como HO-1 y SOD2. En este caso, observamos que apocinina reducía el aumento en la expresión de HO-1 y de SOD2 inducido por IL-1β (Figuras 58a, 59a), mientras que catalasa no tenía ningún efecto sobre la expresión de estas proteínas (Figuras 58b, 59b). Ninguno de los dos antioxidantes modificó la expresión de HO-1 y SOD2 en situación control. Estos resultados sugieren la participación del estrés oxidativo, principalmente del O<sub>2</sub><sup>-</sup>, en el efecto de IL-1β sobre la activación de las proteínas HO-1 y SOD2.



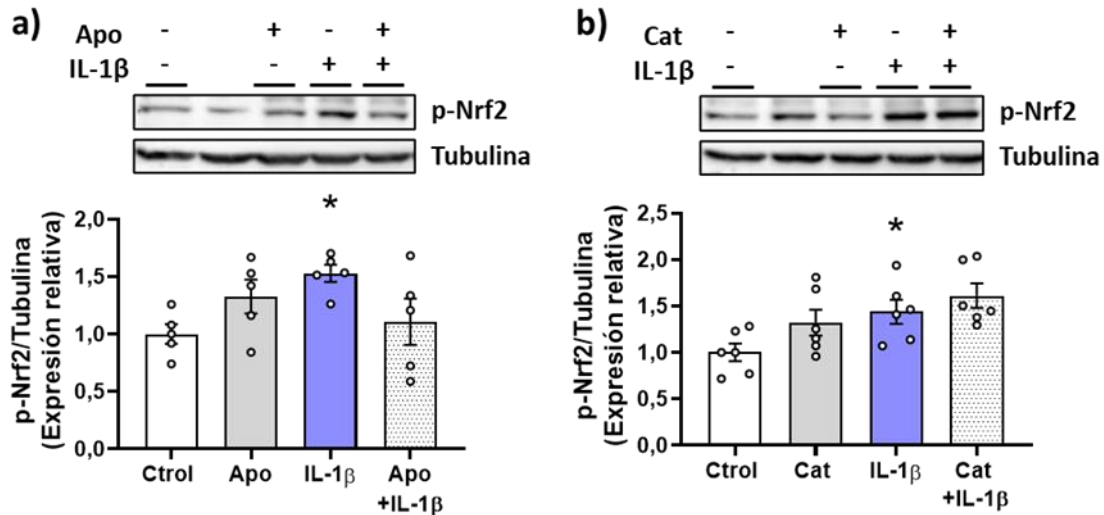
**Figura 58. El estrés oxidativo participa en el incremento de la expresión de HO-1 inducido por IL-1 $\beta$ .** Efecto de apocinina (Apo, 30  $\mu$ M, 2 h) (a) y catalasa (Cat, 1000 U/ml, 2 h) (b) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de HO-1 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestran blots representativos. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control. \* $p$ <0,05 vs. Ctrl y # $p$ <0,05 vs. IL-1 $\beta$  por  $t$  de Student pareada.



**Figura 59. El estrés oxidativo participa en el incremento de la expresión de SOD2 inducido por IL-1 $\beta$ .** Efecto de apocinina (Apo, 30  $\mu$ M, 2 h) (a) y catalasa (Cat, 1000 U/ml, 2 h) (b) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de SOD2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestran blots representativos. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p$ <0,05 vs. Ctrl y # $p$ <0,05 vs. IL-1 $\beta$  por  $t$  de Student pareada.

Por otra parte, el tratamiento de las CMLV con apocinina redujo, aunque no de forma significativa, el aumento de la fosforilación de Nrf2 inducida por IL-1 $\beta$  (Figura 60a), mientras que catalasa no modificó este efecto (Figura 60b). Esto sugiere que la vía no canónica de activación de Nrf2 no es el principal mecanismo por el que las ROS activan este factor de transcripción.

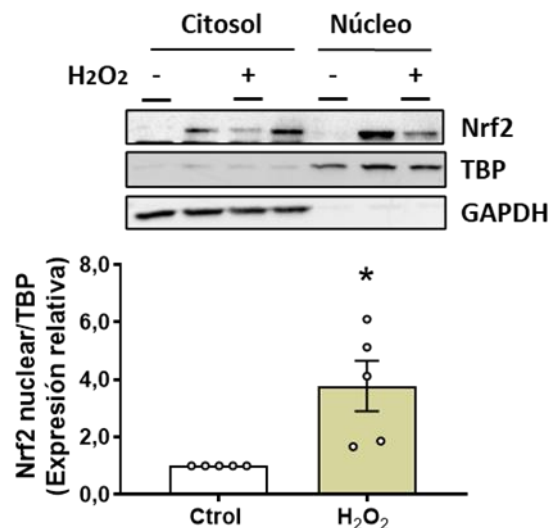




**Figura 60.** El estrés oxidativo no participa en el incremento de la expresión de p-Nrf2 inducido por IL-1 $\beta$ . Efecto de apocinina (Apo, 30  $\mu$ M, 2 h) (a) y catalasa (Cat, 1000 U/ml, 2 h) (b) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de p-Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestran blots representativos. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctlol). \*p<0,05 vs. Ctlol por t de Student pareada.

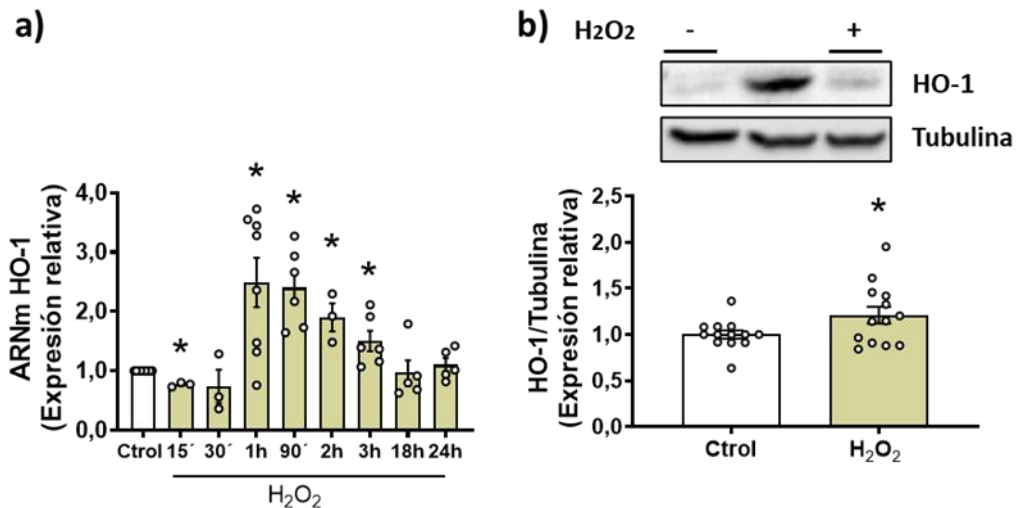
### 3.2.1. Efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la vía de Nrf2

Una vez comprobado el papel del estrés oxidativo en la activación de Nrf2 inducida por IL-1 $\beta$  en CMLV de ratón, estudiamos el efecto de la adición exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre dicha vía. Como muestra la **Figura 61**, la estimulación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M, 1 h) incrementó la translocación al núcleo de Nrf2 en cultivos celulares de CMLV.



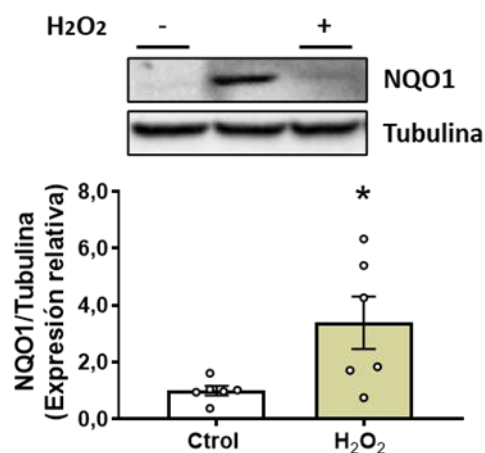
**Figura 61.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementa la expresión nuclear de Nrf2. Efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M, 1 h) sobre la expresión proteica nuclear de Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo de la expresión en citosol y en núcleo. Para confirmar el éxito en el fraccionamiento celular se utilizó la expresión de TBP en núcleo y la de GAPDH en citosol. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctlol). \*p<0,05 por t de Student pareada.

También analizamos el efecto de la adición de  $H_2O_2$  sobre la expresión de algunas de las proteínas reguladas por Nrf2. La incubación con  $H_2O_2$  incrementó de manera dependiente del tiempo los niveles del ARN mensajero de HO-1, observándose un pico de expresión a 1 hora (Figura 62a). Además, el tratamiento con  $H_2O_2$  incrementó la expresión proteica de HO-1 en cultivos de CMLV de ratón (Figura 62b).



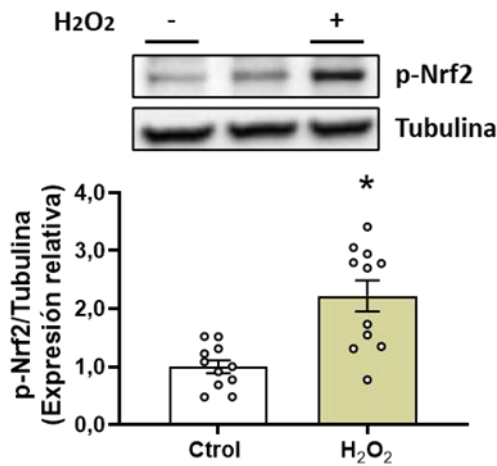
**Figura 62.  $H_2O_2$  incrementa la expresión de HO-1.** (a) Expresión relativa de los niveles de ARNm de HO-1 en CMLV de aorta de ratón tratadas durante diferentes tiempos con  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M). (b) Expresión proteica de HO-1 en cultivos celulares estimulados con  $H_2O_2$  (1 h). En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p$ <0,05 vs. Ctrl por ANOVA de una vía seguido de post test de Bonferroni (a) y  $t$  de Student pareada (b).

Además, el tratamiento con  $H_2O_2$  también incrementó la expresión de la proteína NQO1 en cultivos de CMLV de ratón (Figura 63).



**Figura 63.  $H_2O_2$  incrementa la expresión de NQO1.** Efecto de  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M, 1 h) sobre la expresión proteica de NQO1 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p$ <0,05 por  $t$  de Student pareada.

A continuación, estudiamos si la adición exógena de  $H_2O_2$  afectaba a la vía no canónica de activación de Nrf2 y observamos que, efectivamente,  $H_2O_2$  también aumentaba la fosforilación de este factor de transcripción (**Figura 64**).

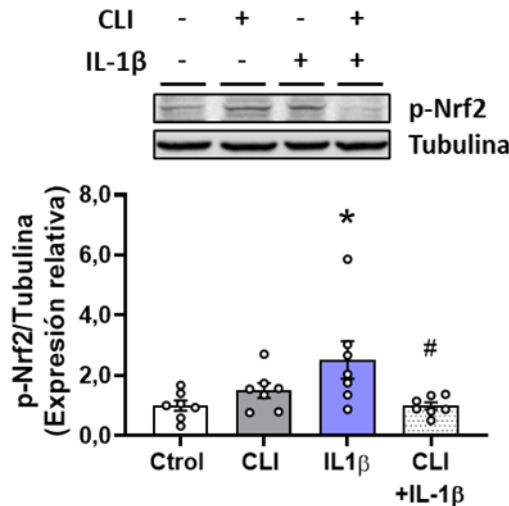


**Figura 64.  $H_2O_2$  incrementa la expresión de p-Nrf2.** Efecto de  $H_2O_2$  (100  $\mu$ M, 1 h) sobre la expresión proteica de p-Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrol). \* $p < 0,05$  por  $t$  de Student pareada.

En conjunto, los resultados descritos en este apartado indican que las ROS participan en la activación del factor de transcripción Nrf2 por la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ .

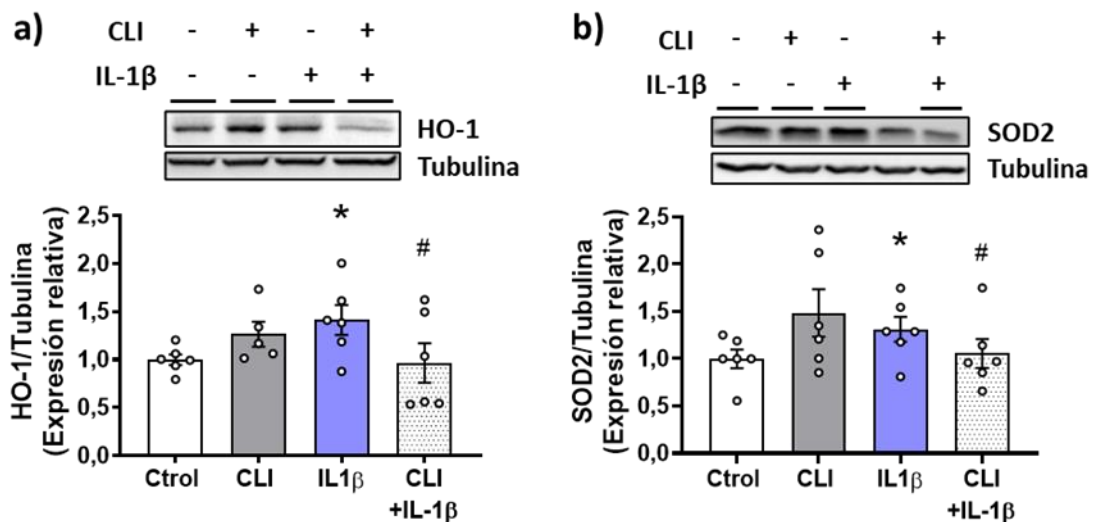
### 3.3. PARTICIPACIÓN DE TLR4 EN EL EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA VÍA DE Nrf2

Puesto que habíamos comprobado que la vía de TLR4 está implicada en diversos efectos de la citoquina IL-1 $\beta$ , analizamos si esta vía de señalización también participaba en la activación del factor de transcripción Nrf2. El tratamiento de las CMLV con el inhibidor del receptor TLR4 CLI-095 revirtió la fosforilación de Nrf2 inducida por IL-1 $\beta$ , sin afectar a dicha fosforilación en situación control (**Figura 65**).



**Figura 65. TLR4 participa en el incremento de la expresión de p-Nrf2 inducido por IL-1 $\beta$ .** Efecto de CLI-095 (1  $\mu$ M, 2 h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de p-Nrf2 en CMLV de aorta ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p$ <0,05 vs. Ctrl y # $p$ <0,05 vs. IL-1 $\beta$  por  $t$  de Student pareada.

Por otra parte, la incubación con CLI-095 también inhibió el aumento de la expresión de HO-1 y de SOD2 inducido por IL-1 $\beta$  (Figura 66), confirmando el papel de TLR4 en la activación de Nrf2 por esta citoquina. CLI-095 no modificó la expresión de ninguna de las dos proteínas en situación control.

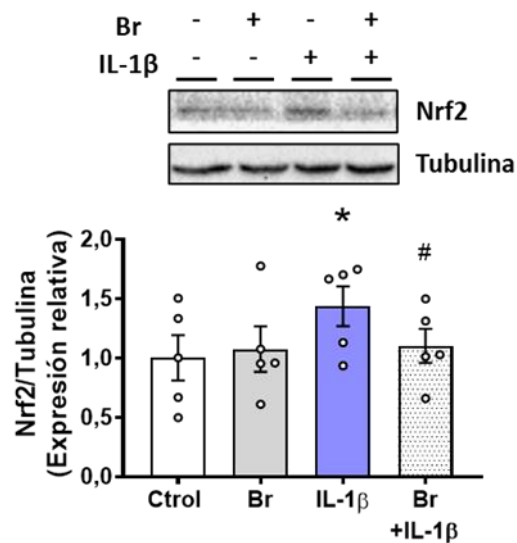


**Figura 66. TLR4 participa en el incremento de la expresión de HO-1 y SOD2 inducido por IL-1 $\beta$ .** Efecto de CLI-095 (1  $\mu$ M, 2 h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de HO-1 (a) y SOD2 (b) en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestran blots representativos. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p$ <0,05 vs. Ctrl y # $p$ <0,05 vs. IL-1 $\beta$  por  $t$  de Student pareada.

### 3.4. EFECTO PROTECTOR DE LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 POR IL-1 $\beta$

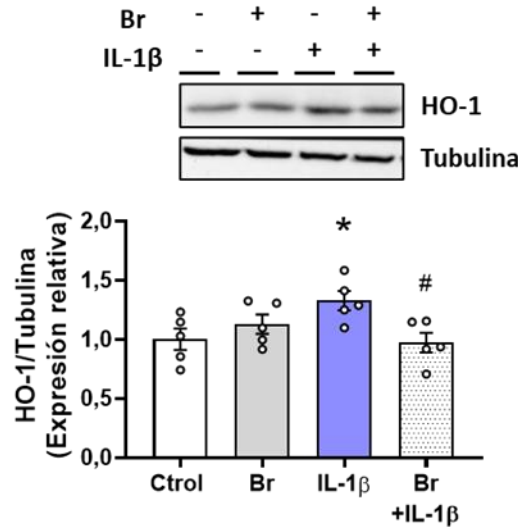
Una vez determinada la activación del factor de transcripción Nrf2 y de las proteínas que están bajo su control por la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ , analizamos el papel que tiene Nrf2 en los efectos inducidos por IL-1 $\beta$ . Para ello utilizamos brusatol, un compuesto de origen vegetal que se utiliza como inhibidor farmacológico de Nrf2, ya que reduce los niveles proteicos de este factor de transcripción al promover la ubiquitinación y la subsecuente degradación del mismo (Ren *et al.*, 2011).

De acuerdo con ello, la incubación de los cultivos celulares con brusatol (200 nM) previno el aumento de expresión de Nrf2 inducido por IL-1 $\beta$ , no observándose ningún efecto sobre esta proteína en situación control (Figura 67).



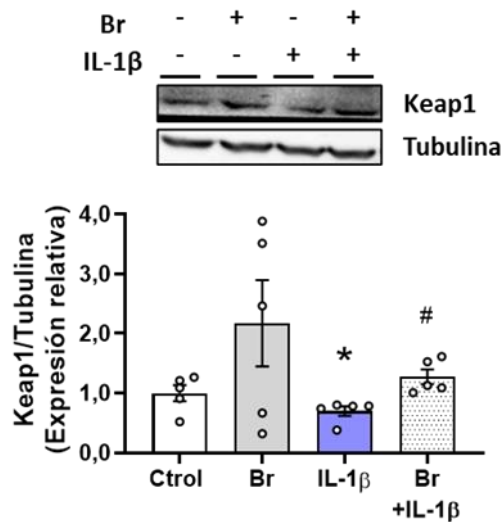
**Figura 67. Brusatol inhibe la activación de Nrf2 inducida por IL-1 $\beta$ .** Efecto de brusatol (Br, 200 nM, 3 h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  vs. Ctrl y # $p < 0,05$  vs. IL-1 $\beta$  por *t* de Student pareada.

Confirmando el efecto inhibitorio de la vía de Nrf2 por brusatol, este fármaco revirtió el aumento de expresión de la proteína HO-1 inducido por IL-1 $\beta$ , sin modificar la expresión de esta proteína en situación control (Figura 68).



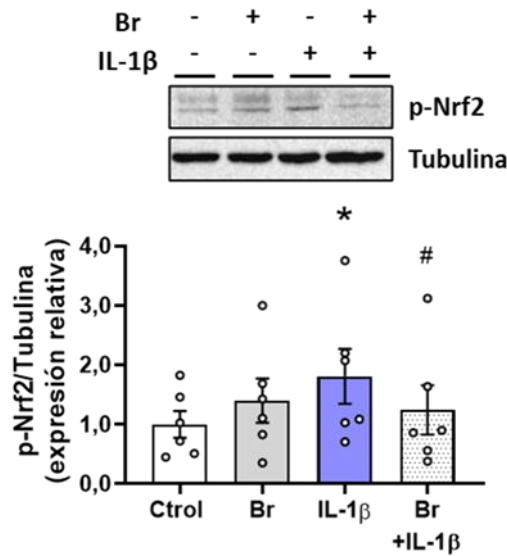
**Figura 68. Brusatol inhibe el incremento de la expresión de HO-1 inducido por IL-1β.** Efecto de brusatol (Br, 200 nM, 3 h) en ausencia y presencia de IL-1β (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de HO-1 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \*p<0,05 vs. Ctrl y #p<0,05 vs. IL-1β por *t* de Student pareada.

Por otra parte, el pretratamiento de las CMLV con brusatol previno la disminución de la expresión de Keap1 inducida por IL-1β, sin afectar a dicha expresión en cultivos celulares en situación control (Figura 69).



**Figura 69. Brusatol inhibe la disminución de la expresión de Keap1 inducida por IL-1β.** Efecto de brusatol (Br, 200 nM, 3 h) en ausencia y presencia de IL-1β (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de Keap1 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \*p<0,05 vs. Ctrl y #p<0,05 vs. IL-1β por *t* de Student pareada.

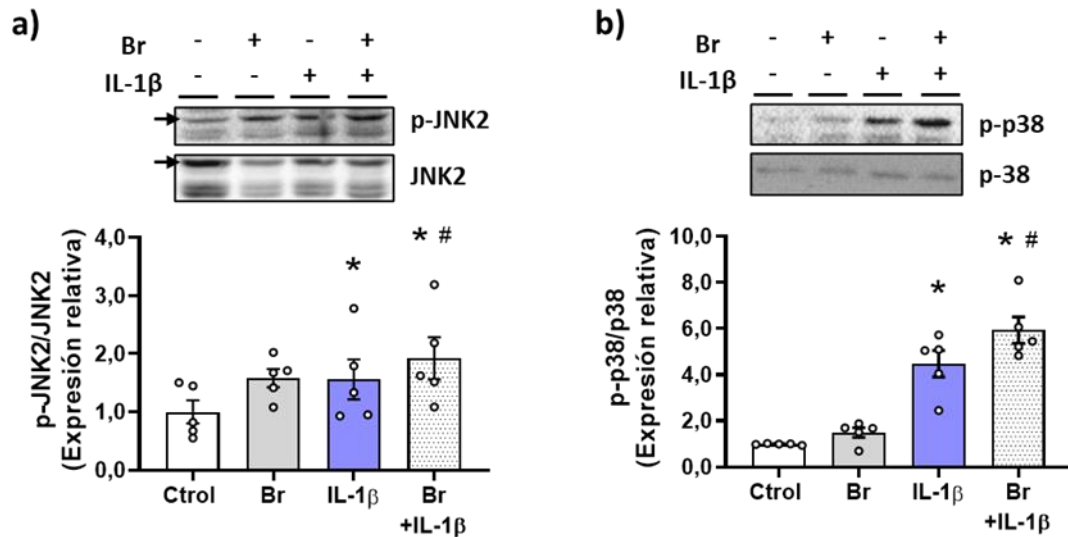
Además, brusatol abolió el aumento de la expresión de p-Nrf2 inducido por IL-1 $\beta$ , no afectando dicha expresión en situación control (**Figura 70**).



**Figura 70. Brusatol inhibe el incremento de la expresión de p-Nrf2 inducido por IL-1 $\beta$ .** Efecto de brusatol (200 nM, 3 h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de p-Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  vs. Ctrl y # $p < 0,05$  vs. IL-1 $\beta$  por *t* de Student pareada.

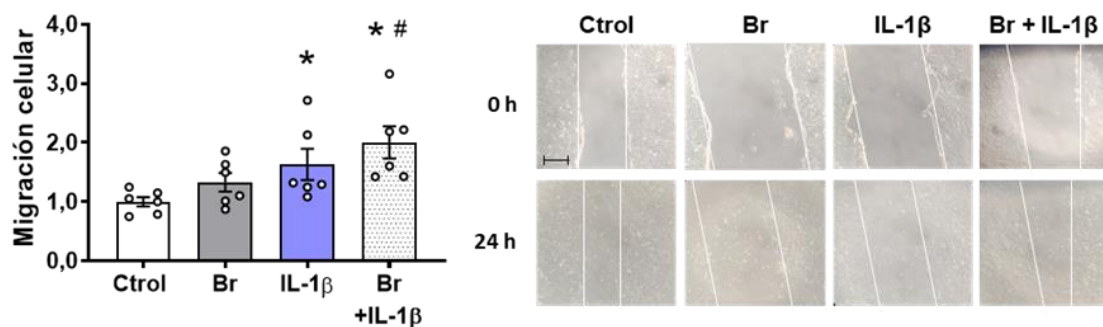
Una vez confirmado el efecto inhibitorio de brusatol sobre la vía de Nrf2, utilizamos este compuesto para analizar si la activación de la vía de Nrf2 por IL-1 $\beta$  contribuye a los efectos de la citoquina.

El tratamiento de las CMLV de ratón con brusatol no alteró la fosforilación de las proteínas JNK2 y p38 en cultivos celulares control, pero potenció el aumento de la fosforilación de ambas MAPK inducido por IL-1 $\beta$  (**Figura 71**). Estos resultados confirman que el factor de transcripción Nrf2 modula a la baja el efecto de esta citoquina proinflamatoria sobre JNK y p38, y sugieren un papel protector de este.



**Figura 71. La inhibición de Nrf2 potencia el incremento de la expresión de p-JNK2 y p-p38 inducido por IL-1β.** Efecto de brusatol (Br, 200 nM, 3 h) en ausencia y presencia de IL-1β (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de p-JNK2 (a) y p-p38 (b) en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestran blots representativos. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \*p<0,05 vs. Ctrl y #p<0,05 vs. IL-1β por t de Student pareada.

Además, comprobamos el papel de Nrf2 sobre la migración celular inducida por IL-1β. Como puede observarse en la **Figura 72**, el tratamiento de los cultivos celulares con brusatol potenció el aumento de la migración de las CMLV inducido por IL-1β (10 ng/ml, 24 h), no modificando este proceso celular en situación control. Estos resultados confirman que Nrf2 modula a la baja el efecto de la citoquina proinflamatoria sobre la migración de las CMLV y sugiere un papel protector de este factor de transcripción en dicho efecto.



**Figura 72. La inhibición de Nrf2 potencia el incremento de la migración de las CMLV inducido por IL-1β.** Efecto de brusatol (Br, 200 nM, 3 h) en ausencia y presencia de IL-1β (10 ng/ml, 24 h) sobre la migración celular de CMLV de aorta de ratón. A la derecha se muestran imágenes representativas. La barra de escala representa 50 μm. Los resultados (media ± ES) están expresados como valor relativo de cierre de la herida respecto a la situación control (Ctrl). \*p<0,05 vs. Ctrl y #p<0,05 vs. IL-1β por t de Student pareada.



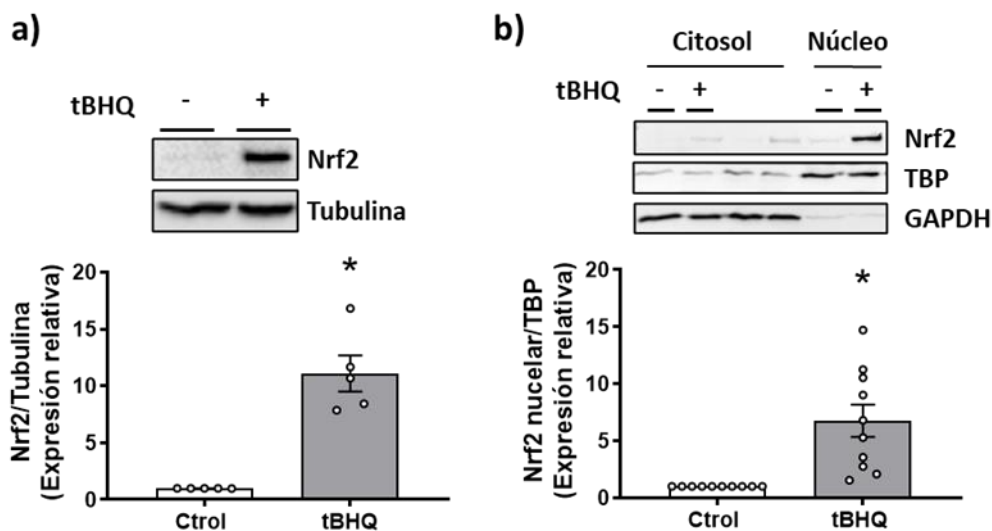
## 4. MODULACIÓN POR LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 DEL EFECTO PROINFLAMATORIO DE IL-1 $\beta$

Nrf2, como se ha mencionado anteriormente, tiene un importante papel en la defensa antioxidante y antiinflamatoria, habiéndose descrito que los activadores de este factor de transcripción ejercen efectos beneficiosos en patologías que cursan con estrés oxidativo e inflamación, como es el caso de las patologías cardiovasculares (Breuss *et al.*, 2019; Robledinos-Antón *et al.*, 2019). Por esto, analizamos la modulación ejercida por un activador exógeno de Nrf2 sobre los efectos inducidos por IL-1 $\beta$ . Para ello, en este estudio utilizamos terbutilhidroquinona (tBHQ), un potente activador de Nrf2 que al inhibir Keap1 provoca, a su vez, la inhibición de la degradación de Nrf2, aumentando su estabilidad (Zhang and Hannink, 2003).

### 4.1. EFECTO DE tBHQ SOBRE LA VÍA DE Nrf2

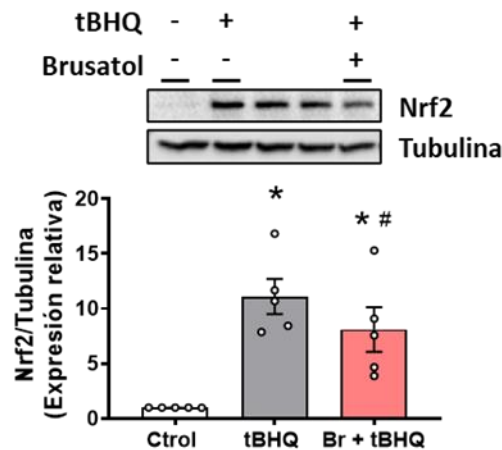
#### 4.1.1. Activación de la vía de Nrf2 por tBHQ

En primer lugar, comprobamos el efecto activador de Nrf2 por tBHQ. El tratamiento con tBHQ (20  $\mu$ M, 24 h) indujo un aumento en la expresión de Nrf2, tanto en extracto total de las CMLV de ratón, como en la fracción nuclear (Figura 73).



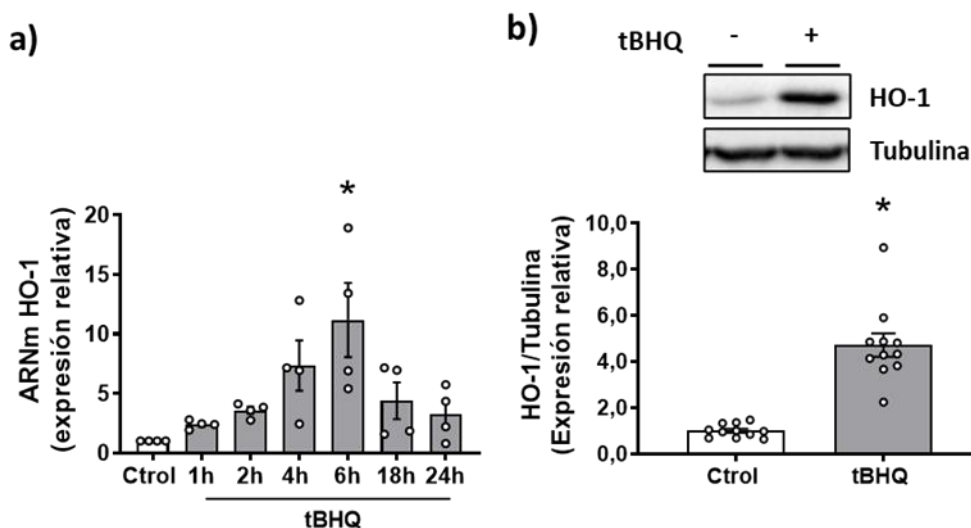
**Figura 73. Terbutilhidroquinona incrementa la expresión de Nrf2.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) sobre la expresión proteica de Nrf2 en extracto total (a) y en núcleo (b) de CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestran blots representativos de la expresión de Nrf2 en extracto total (a) y en las fracciones citosólica y nuclear (b). Para confirmar el éxito en el fraccionamiento celular se utilizó la expresión de TBP en núcleo y la de GAPDH en citosol. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrol). \* $p < 0,05$  por *t* de Student pareada.

Para confirmar la especificidad del efecto activador de tBHQ sobre Nrf2, los cultivos celulares se incubaron con brusatol antes del tratamiento con tBHQ, y se analizó la expresión de Nrf2. Como puede observarse en la Figura 74, el pretratamiento con este fármaco inhibió la expresión de Nrf2 inducida por tBHQ.



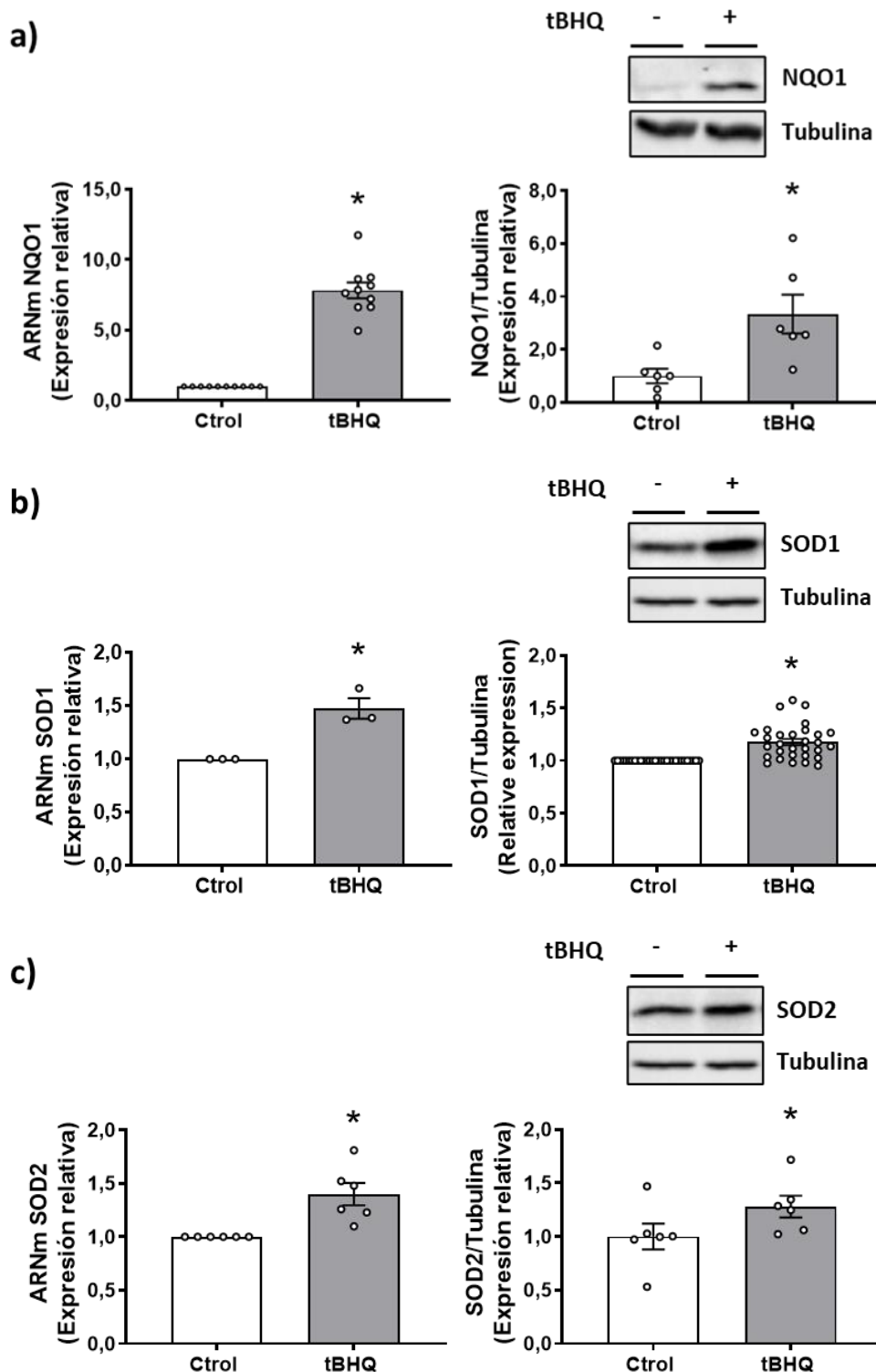
**Figura 74. La inhibición de Nrf2 previene el incremento de la expresión de Nrf2 inducido por terbutilhidroquinona.** Efecto de brusatol (Br, 200 nM, 26 h) en presencia de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) sobre la expresión proteica de Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  vs. Ctrl y # $p < 0,05$  vs. tBHQ por *t* de Student pareada.

Una vez comprobada la capacidad de tBHQ para activar Nrf2, analizamos su efecto sobre algunas de las enzimas cuya expresión está regulada por este factor de transcripción. El tratamiento de las CMLV de ratón con tBHQ indujo un incremento dependiente del tiempo de los niveles del ARN mensajero de HO-1, observándose un pico de expresión a las 6 horas (Figura 75a). Además, tBHQ (24 h) incrementó la expresión proteica de HO-1 en estas células (Figura 75b).



**Figura 75. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona aumenta la expresión de HO-1.** (a) Niveles de ARNm de HO-1 en CMLV de aorta de ratón tratadas durante diferentes tiempos con terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M). (b) Expresión proteica de HO-1 en cultivos celulares estimulados con tBHQ (24 h). En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  vs. Ctrl por ANOVA de una vía seguido de post test de Bonferroni (a) y *t* de Student pareada (b).

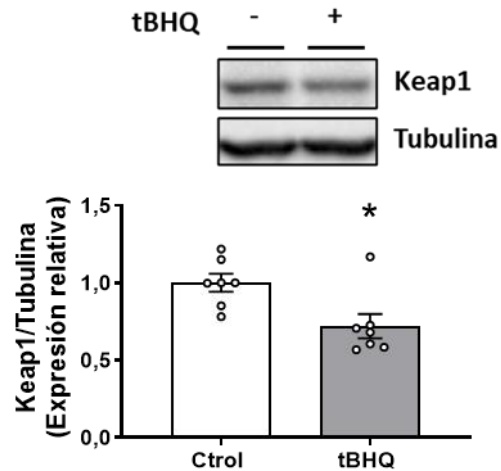
El tratamiento con tBHQ también aumentó la expresión, tanto del ARN mensajero como de la proteína, de las enzimas diana de Nrf2 NQO1, SOD1 y SOD2 (Figura 76).



**Figura 76.** La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona incrementa la expresión de NQO1, SOD1 y SOD2. Niveles de ARNm (izda) y de proteína (dcha) de NQO1 (a), SOD1 (b) y SOD2 (c) en CMLV de aorta de ratón estimuladas con terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h). En la parte superior se muestran blots representativos. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  por *t* de Student pareada.

#### 4.1.2. Efecto de tBHQ sobre Keap1

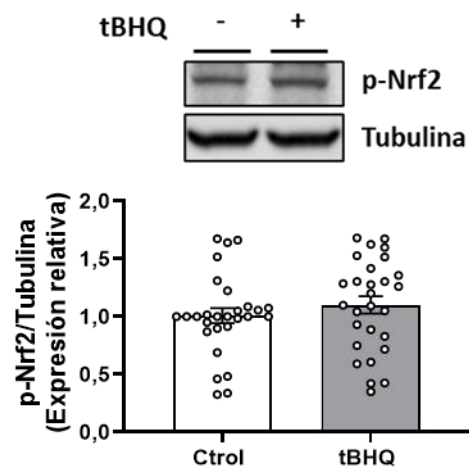
El tratamiento con tBHQ redujo la expresión proteica de Keap1 en cultivos celulares de CMLV de ratón (**Figura 77**), lo que favorecería la traslocación al núcleo y la activación del factor de transcripción Nrf2.



**Figura 77. Terbutilhidroquinona reduce la expresión Keap1.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) sobre la expresión proteica de Keap1 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  por *t* de Student pareada.

#### 4.1.3. Efecto de tBHQ sobre la fosforilación de Nrf2

Analizamos posteriormente el efecto de tBHQ sobre la vía no canónica de activación de Nrf2. tBHQ no modificó la fosforilación de Nrf2 (**Figura 78**), lo que descarta este mecanismo en la activación de Nrf2 por tBHQ.



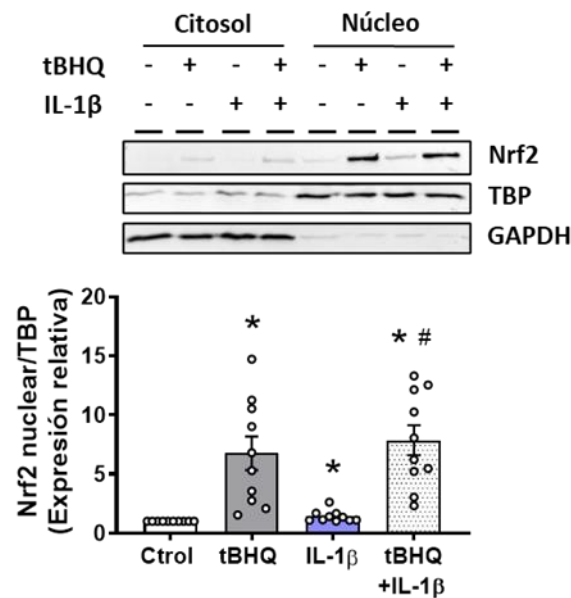
**Figura 78. Terbutilhidroquinona no modifica la expresión de p-Nrf2.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) sobre la expresión proteica de p-Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl).

#### 4.2. MODULACIÓN POR tBHQ DEL EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA VÍA DE Nrf2

Teniendo en cuenta que IL-1 $\beta$  activa la vía de Nrf2 en CMLV de ratón, a continuación, analizamos si la activación de Nrf2 por tBHQ modulaba los efectos de esta citoquina proinflamatoria sobre la propia vía de Nrf2.

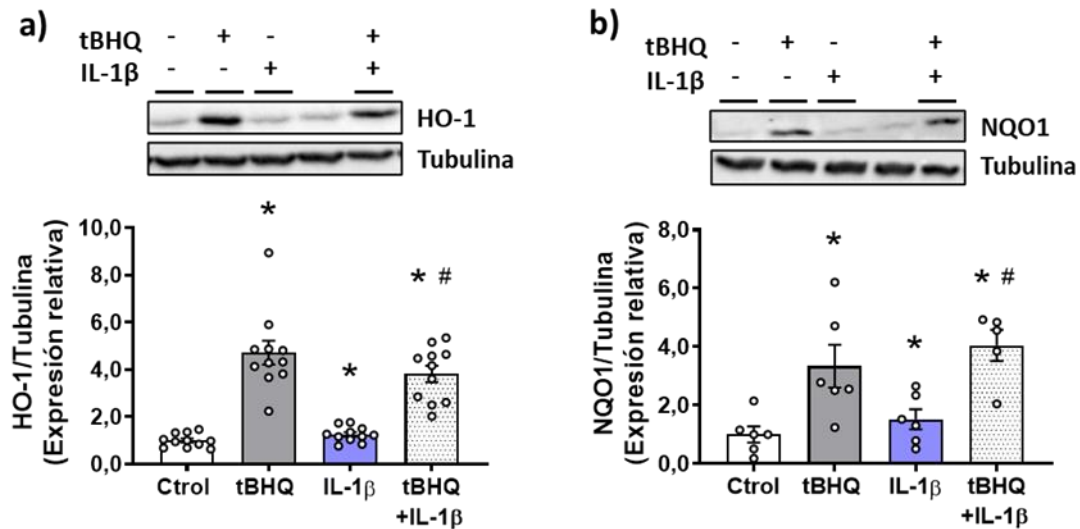
##### 4.2.1. Modulación por tBHQ de la activación de la vía de Nrf2 por IL-1 $\beta$

La estimulación con IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) de CMLV pretratadas durante 24 h con tBHQ (20  $\mu$ M) aumentó la translocación al núcleo de Nrf2. Este efecto, mayor que el inducido por IL-1 $\beta$ , fue similar al que producía tBHQ, por lo que parece deberse a la acción de tBHQ principalmente (Figura 79).



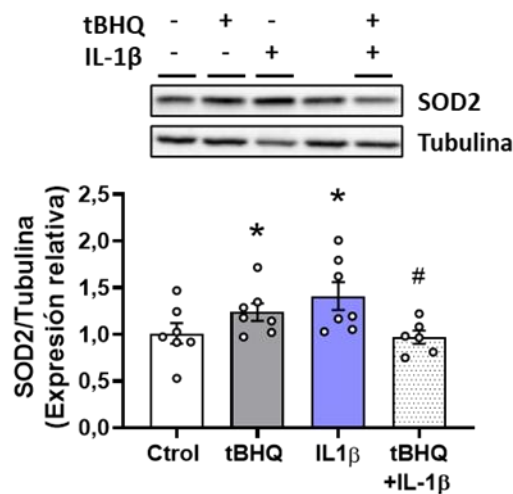
**Figura 79. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modula el efecto de IL-1 $\beta$  sobre la expresión nuclear de Nrf2.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica nuclear de Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo de la expresión en citosol y en núcleo. Para confirmar el éxito en el fraccionamiento celular se utilizó la expresión de TBP en núcleo y la de GAPDH en citosol. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  vs. Ctrl y # $p < 0,05$  vs. IL-1 $\beta$  por *t* de Student pareada.

Posteriormente, estudiamos si la activación de Nrf2 por tBHQ modulaba el efecto de IL-1 $\beta$  sobre la expresión de algunas de las proteínas diana de Nrf2. De forma semejante a lo observado sobre la expresión nuclear de Nrf2, el aumento en la expresión de HO-1 y NQO1 en cultivos pretratados con tBHQ y estimulados con IL-1 $\beta$  parece deberse a la acción del propio activador, ya que fue similar al inducido por tBHQ solo (Figura 80).



**Figura 80.** La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modula el efecto de IL-1 $\beta$  sobre la expresión de HO-1 y NQO1. Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de HO-1 y NQO1 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestran blots representativos. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  vs. Ctrl y # $p < 0,05$  vs. IL-1 $\beta$  por  $t$  de Student pareada.

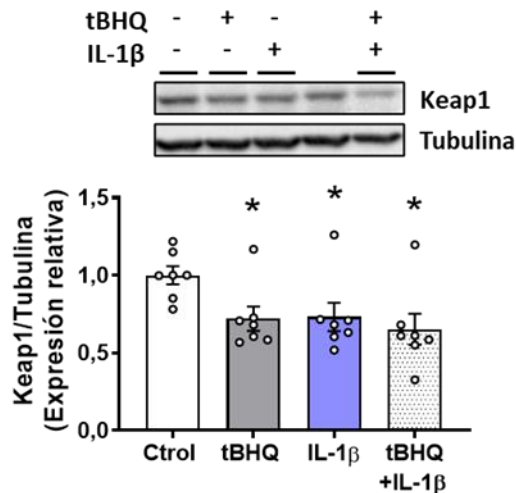
Sin embargo, el pretratamiento de las CMLV con tBHQ redujo el incremento en la expresión de la enzima SOD2 inducido por IL-1 $\beta$  (Figura 81).



**Figura 81.** La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona reduce el efecto de IL-1 $\beta$  sobre la expresión de SOD2. Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de SOD2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  vs. Ctrl y # $p < 0,05$  vs. IL-1 $\beta$  por  $t$  de Student pareada.

#### 4.2.2. Modulación por tBHQ del efecto de IL-1 $\beta$ sobre Keap1

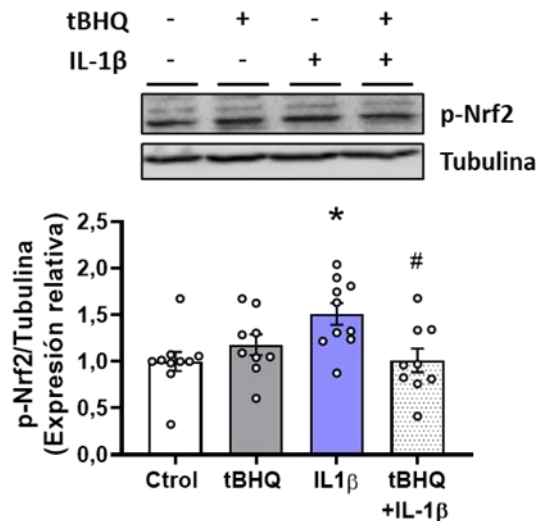
El tratamiento con IL-1 $\beta$  de células previamente incubadas con tBHQ redujo la expresión proteica del inhibidor de Nrf2 Keap1; esta reducción fue similar a la producida por cada uno de los fármacos por separado (Figura 82), descartando un efecto sumatorio de los dos estímulos.



**Figura 82. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modula el efecto de IL-1 $\beta$  sobre la expresión de Keap1.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de Keap1 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p$ <0,05 vs. Ctrl por  $t$  de Student pareada.

#### 4.2.3. Modulación por tBHQ del efecto de IL-1 $\beta$ sobre la fosforilación de Nrf2

Como se ha comentado anteriormente, el tratamiento de las CMLV con tBHQ no modificó la fosforilación de Nrf2; sin embargo, tBHQ previno el aumento en la fosforilación de Nrf2 inducido por IL-1 $\beta$  (Figura 83).



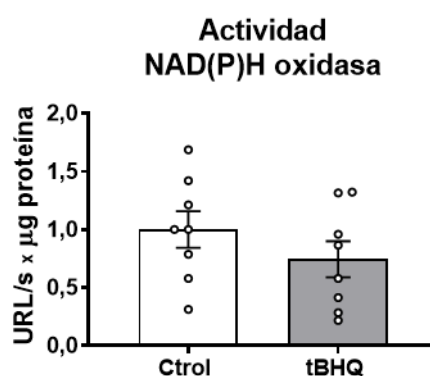
**Figura 83. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la expresión de p-Nrf2 inducido por IL-1β.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20 μM, 24 h) en ausencia y presencia de IL-1β (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de p-Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  vs. Ctrl y # $p < 0,05$  vs. IL-1β por *t* de Student pareada.

#### 4.3. MODULACIÓN POR tBHQ DE LOS EFECTOS PROOXIDANTES DE IL-1β

Seguidamente, analizamos si la activación del factor de transcripción Nrf2 mediante el empleo de tBHQ modulaba el efecto prooxidante y proinflamatorio inducido por IL-1β.

##### 4.3.1. Modulación por tBHQ de la producción de estrés oxidativo inducida por IL-1β

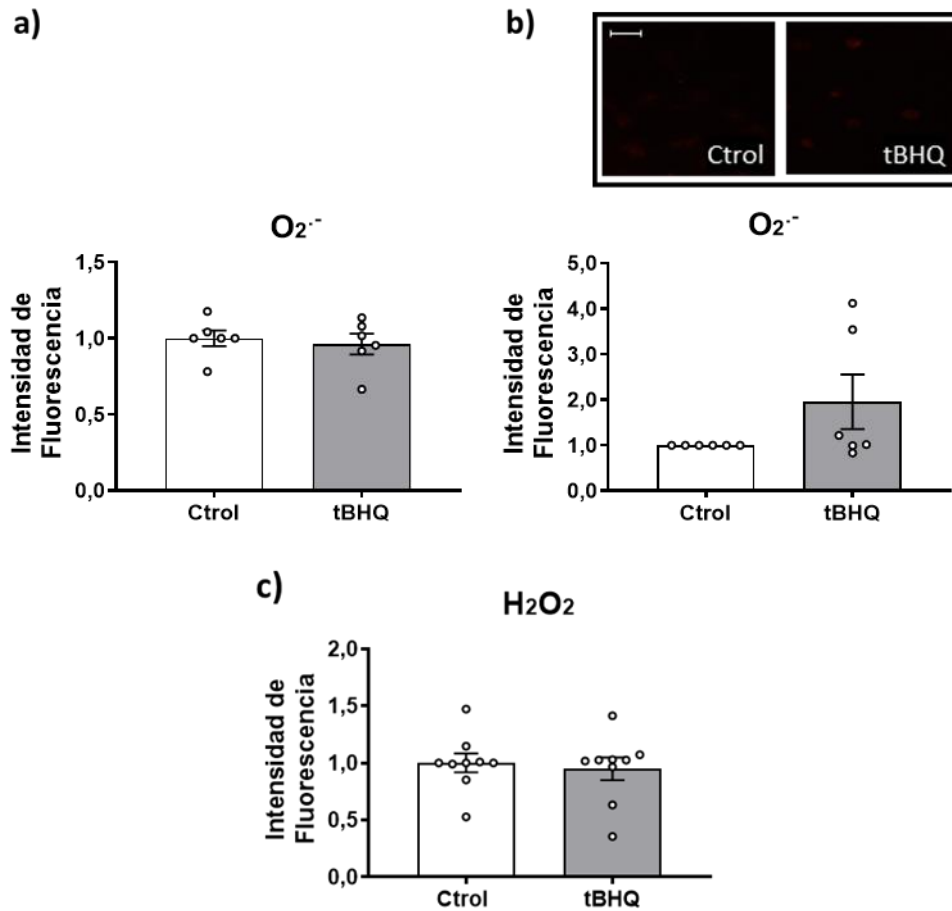
En primer lugar, observamos que el tratamiento de las CMLV de ratón con tBHQ no modificó la actividad basal de la enzima NAD(P)H oxidasa (Figura 84).



**Figura 84. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modifica la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20 μM, 24 h) sobre la actividad NAD(P)H oxidasa en CMLV de aorta de ratón. Los resultados (media ± ES) están expresados como valor relativo respecto al control (Ctrl). URL: unidades relativas de luz.

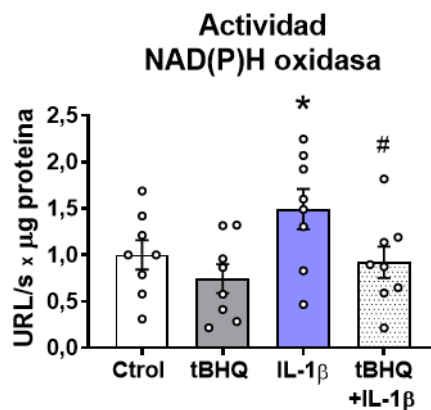


Además, tBHQ tampoco modificó ni la producción de anión superóxido ni la de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en cultivos de CMLV de ratón (Figura 85).



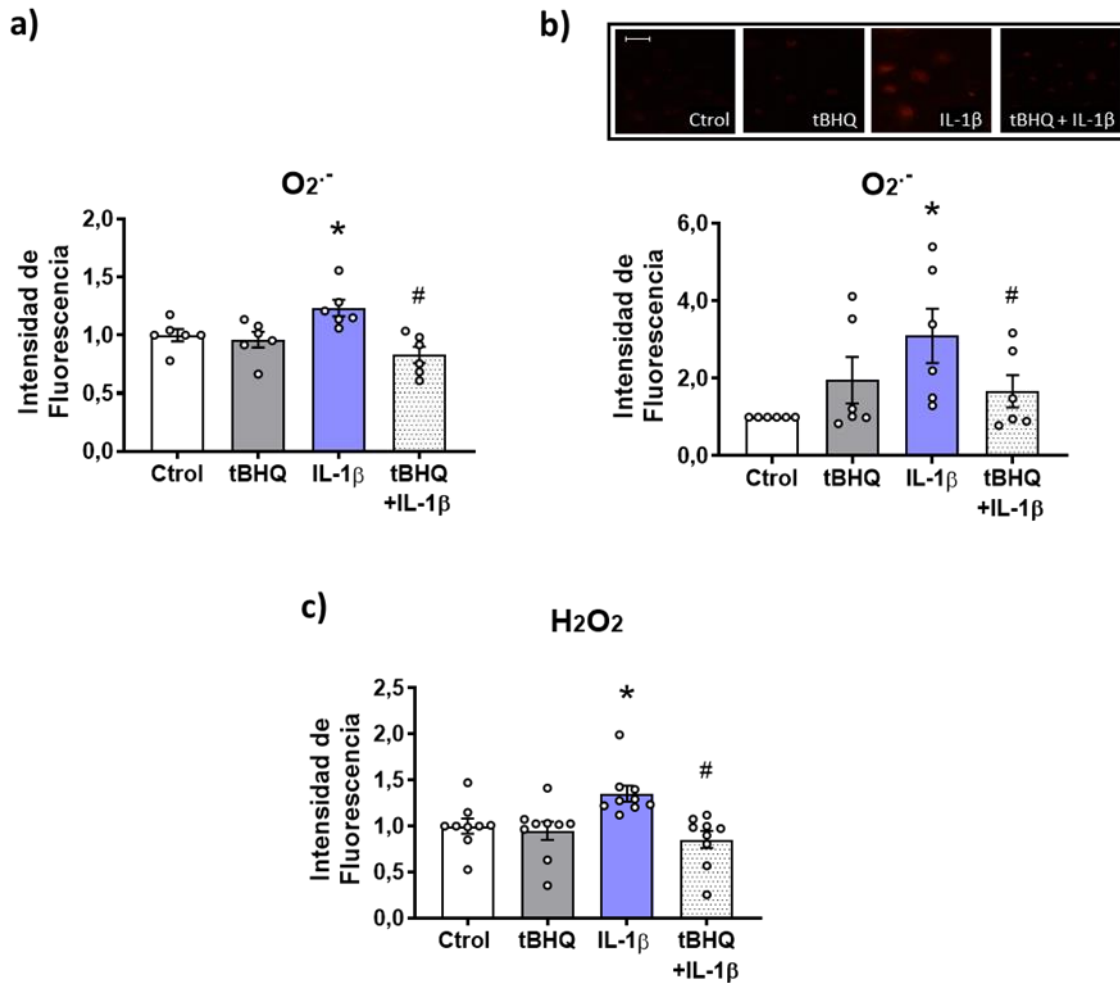
**Figura 85. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modifica la producción de especies reactivas de oxígeno.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu\text{M}$ , 24 h) sobre la producción de anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) en CMLV de aorta de ratón medida por citometría de flujo (a) y microscopía de fluorescencia (b). Las imágenes representativas se muestran en la parte superior. Las imágenes se capturaron con un microscopio de fluorescencia; la barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ . (c) Efecto de tBHQ sobre la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  medida por citometría de flujo. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como valor relativo respecto al control (Ctrlol).

Seguidamente, se estudió si el tratamiento con tBHQ modificaba el estrés oxidativo producido por la citoquina IL-1 $\beta$ . En primer lugar, comprobamos que el pretratamiento de las CMLV con tBHQ redujo el incremento en la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa inducido por IL-1 $\beta$  (Figura 86).



**Figura 86. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa inducido IL-1 $\beta$ .** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la actividad NAD(P)H oxidasa en CMLV de aorta de ratón. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como valor relativo respecto al control (Ctrol). \* $p$ <0,05 vs. control y # $p$ <0,05 vs. IL-1 $\beta$  por  $t$  de Student pareada. URL: unidades relativas de luz.

Además, el pretratamiento con tBHQ inhibió el aumento de la producción tanto de anión superóxido como de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducido por IL-1 $\beta$  (Figura 87).



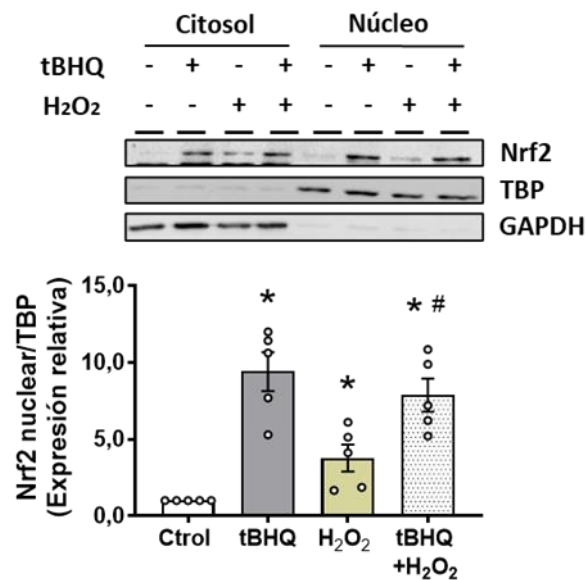
**Figura 87. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno inducido por IL-1 $\beta$ .** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la producción de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) en CMLV de aorta de ratón medida por citometría de flujo (a) y microscopía de fluorescencia (b). Las imágenes representativas se muestran en la parte superior. Las imágenes se capturaron con un microscopio de fluorescencia; la barra de escala representa 100  $\mu$ m. (c) Efecto de tBHQ en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  sobre la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> medida por citometría de flujo. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como valor relativo respecto al control (Ctrlol). \* $p < 0,05$  vs. Ctrlol y # $p < 0,05$  vs. IL-1 $\beta$  por *t* de Student pareada.

En conjunto, los resultados descritos en este apartado indican que la activación de Nrf2 protege frente a los efectos prooxidantes de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ , confirmando así el efecto antioxidante de este factor de transcripción.

#### 4.3.2. Modulación por tBHQ de los efectos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

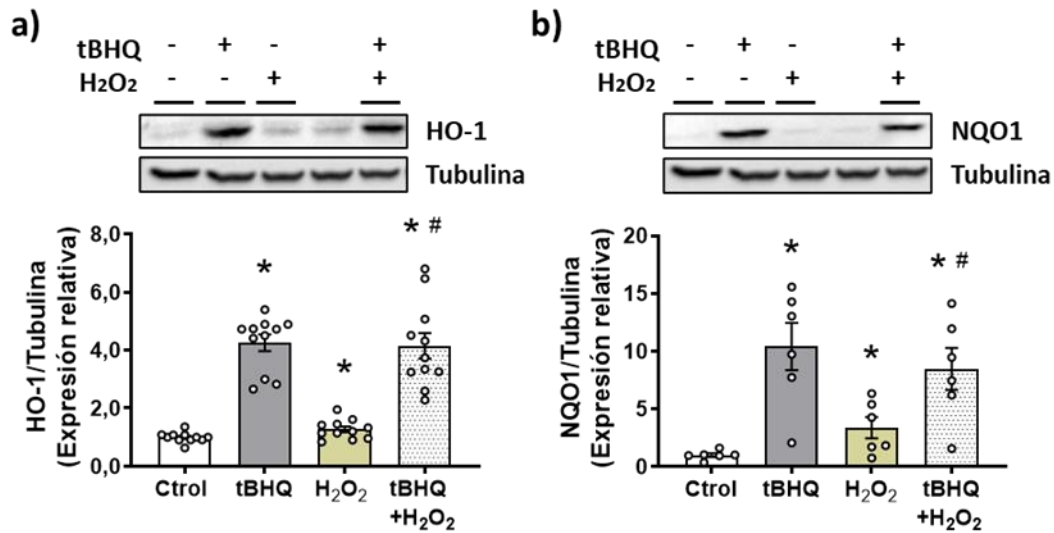
Una vez comprobado que tBHQ reduce la producción de ROS inducida por IL-1 $\beta$ , estudiamos si este activador de Nrf2 modulaba alguno de los efectos de estas ROS.

La estimulación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M, 1 h) de CMLV de ratón pretratadas durante 24 h con tBHQ (20  $\mu$ M) aumentó la translocación al núcleo de Nrf2 (**Figura 88**). Este incremento fue mayor que el inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero similar al inducido únicamente por tBHQ.



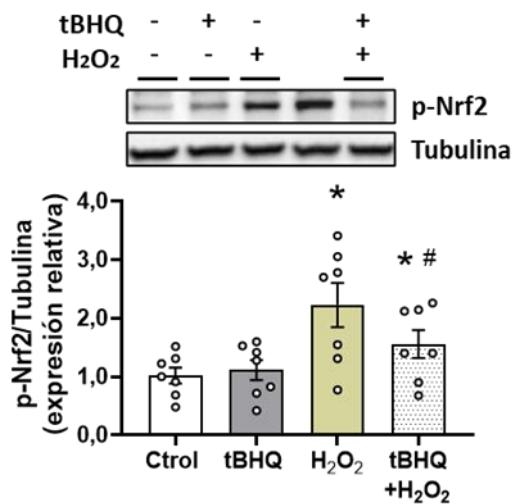
**Figura 88. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modula el efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la expresión nuclear de Nrf2.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M, 1 h) sobre la expresión proteica nuclear de Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo de la expresión en citosol y en núcleo. Para confirmar el éxito en el fraccionamiento celular se utilizó la expresión de TBP en núcleo y la de GAPDH en citosol. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrol). \* $p < 0,05$  vs. Ctrol y # $p < 0,05$  vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por *t* de Student pareada.

Similares resultados se obtuvieron al estudiar la expresión de las proteínas HO-1 y NQO1, que fue aumentada por la estimulación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de CMLV de ratón pretratadas con tBHQ de forma similar al aumento producido por la estimulación sólo con tBHQ (**Figura 89**). Estos resultados sugirieron que la activación de la vía de Nrf2 causada por la estimulación simultánea con tBHQ y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se debe, principalmente, a la acción de tBHQ, descartando así un efecto sumatorio de ambos estímulos.



**Figura 89. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modula el efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la expresión de HO-1 y NQO1.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20 μM, 24 h) en ausencia y presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM, 1 h) sobre la expresión proteica de HO-1 (a) y NQO1 (b) en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestran blots representativos. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \*p<0,05 vs. Ctrl y #p<0,05 vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por *t* de Student pareada.

Como se ha comentado anteriormente, tBHQ no modificó la fosforilación de Nrf2; sin embargo, el tratamiento con este activador inhibió la fosforilación de Nrf2 inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 90).



**Figura 90. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la expresión de p-Nrf2 inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20 μM, 24 h) en ausencia y presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM, 1 h) sobre la expresión proteica de p-Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \*p<0,05 vs. Ctrl y #p<0,05 vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por *t* de Student pareada.

Seguidamente, analizamos la modulación producida por tBHQ del efecto inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre el estrés oxidativo y observamos que el tratamiento de las CMLV con tBHQ abolió el incremento en la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 91), así como el aumento de la producción de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 92), confirmando el efecto antioxidante de este factor de transcripción.

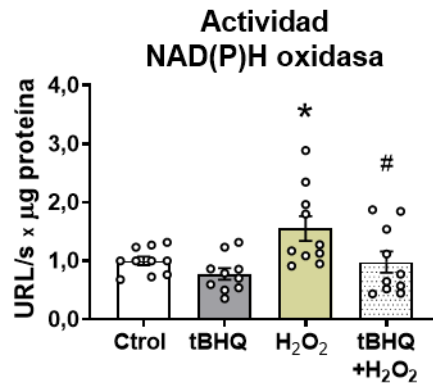


Figura 91. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu\text{M}$ , 24 h) en ausencia y presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ , 1 h) sobre la actividad NAD(P)H oxidasa en CMLV de aorta de ratón. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como valor relativo respecto al control (Ctrlol). \* $p < 0,05$  vs. Ctrlol y # $p < 0,05$  vs.  $\text{H}_2\text{O}_2$  por *t* de Student pareada. URL: unidades relativas de luz.

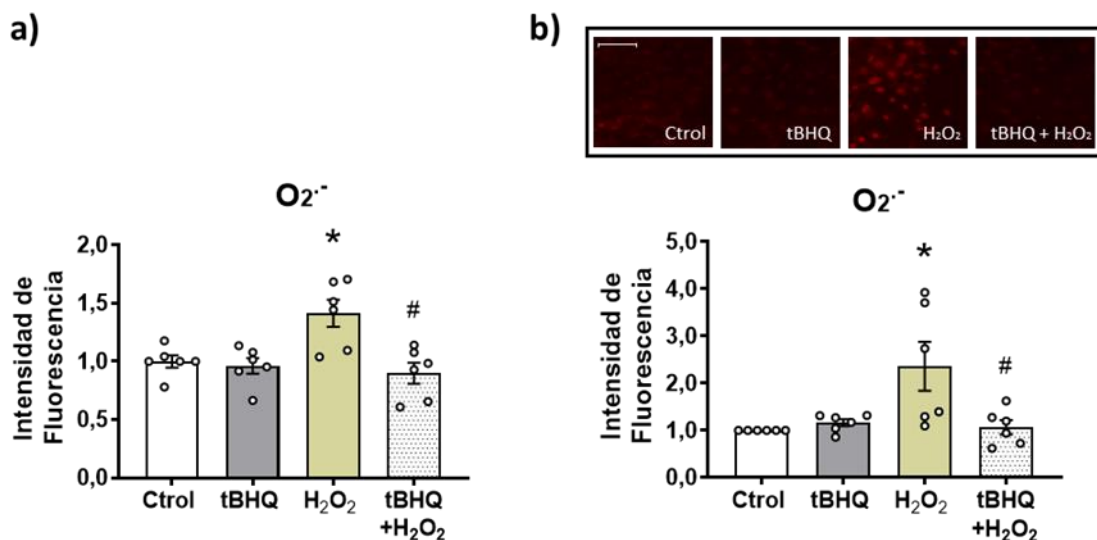
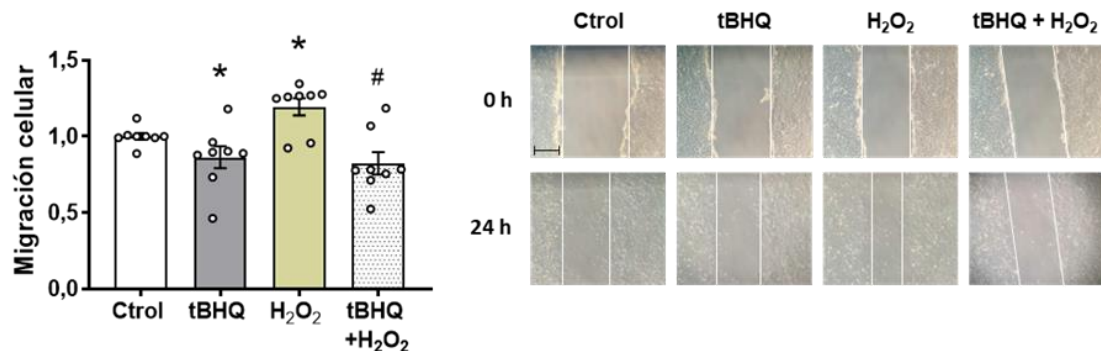


Figura 92. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la producción de anión superóxido inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu\text{M}$ , 24 h) en ausencia y presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ , 1 h) sobre la producción de anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) en CMLV de aorta de ratón medida por citometría de flujo (a) y microscopía de fluorescencia (b). Las imágenes representativas se muestran en la parte superior. Las imágenes se capturaron con un microscopio de fluorescencia; la barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ . Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como valor relativo respecto al control (Ctrlol). \* $p < 0,05$  vs. Ctrlol y # $p < 0,05$  vs.  $\text{H}_2\text{O}_2$  por *t* de Student pareada.

Finalmente, analizamos la modulación por tBHQ del efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre el proceso de migración celular. Como se observa en la **Figura 93**, el tratamiento de las CMLV con tBHQ (20 μM, 24 h) redujo la migración celular en cultivos celulares control y, además, abolió el incremento inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM, 24 h).



**Figura 93.** La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la migración de las CMLV inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20 μM, 24 h) en ausencia y presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM, 24 h) sobre la migración celular de CMLV de aorta de ratón. A la derecha se muestran imágenes representativas. La barra de escala representa 50 μm. Los resultados (media ± ES) están expresados como valor relativo de cierre de la herida respecto a la situación control (Ctról). \*p<0,05 vs. Ctról y #p<0,05 vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por *t* de Student pareada.

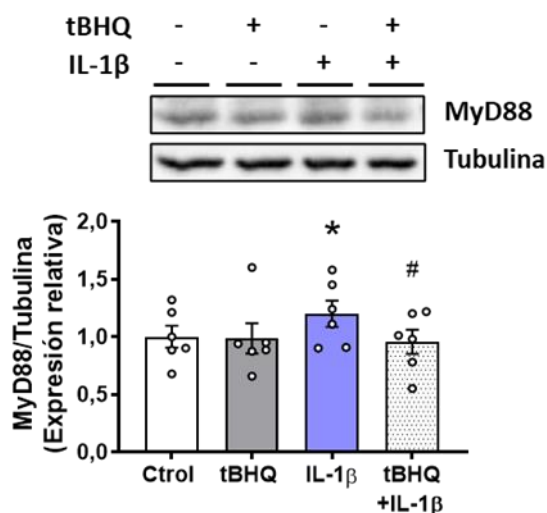
Estos resultados sugieren que la activación de Nrf2 por tBHQ protege frente a los efectos prooxidantes del agua oxigenada añadida de manera exógena, lo que contribuye al efecto antioxidante de este factor de transcripción.

#### 4.4. MODULACIÓN POR tBHQ DE LOS EFECTOS PROINFLAMATORIOS DE IL-1β

A continuación, analizamos la modulación ejercida por la activación de Nrf2 de los efectos de IL-1β sobre la expresión de algunos marcadores proinflamatorios.

##### 4.4.1. Modulación por tBHQ del efecto de IL-1β sobre MyD88

Como hemos visto anteriormente, el receptor TLR4 está implicado en el aumento de MyD88 por IL-1β (**Figura 43**). Aquí observamos que el tratamiento de las CMLV con tBHQ no modificó la expresión de MyD88, pero sí inhibió el aumento de dicha expresión inducido por IL-1β (**Figura 94**).



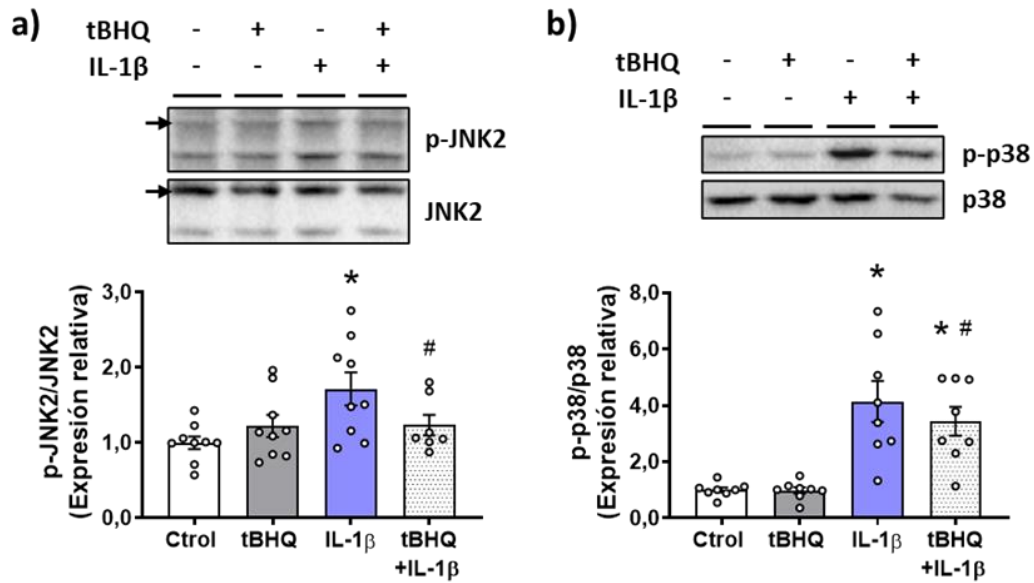
**Figura 94. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la expresión de MyD88 inducido por IL-1 $\beta$ .** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de MyD88 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrlol). \* $p < 0,05$  vs. Ctrlol y # $p < 0,05$  vs. IL-1 $\beta$  por *t* de Student pareada.

#### 4.4.2. Modulación por tBHQ del efecto de IL-1 $\beta$ sobre la vía MAPK/AP-1/COX-2

En apartados anteriores hemos confirmado que IL-1 $\beta$  activa las MAPK p38 y JNK, así como el factor de transcripción AP-1, mecanismo que participa en la inducción de la expresión COX-2 por esta citoquina (Figuras 30, 31, 32). Ahora estudiamos si la activación de Nrf2 modula esta vía proinflamatoria.

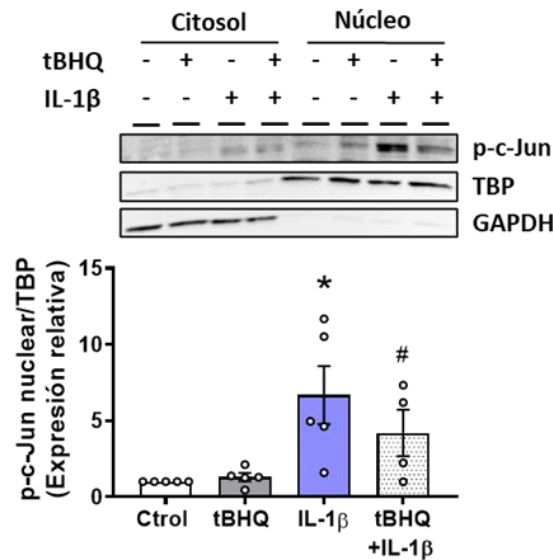
Como se muestra en la Figura 95, la activación de Nrf2 con tBHQ previa al tratamiento de las CMLV con IL-1 $\beta$  redujo la fosforilación tanto de JNK2 como de p38 inducida por IL-1 $\beta$ , no alterando dicha fosforilación en situación control.





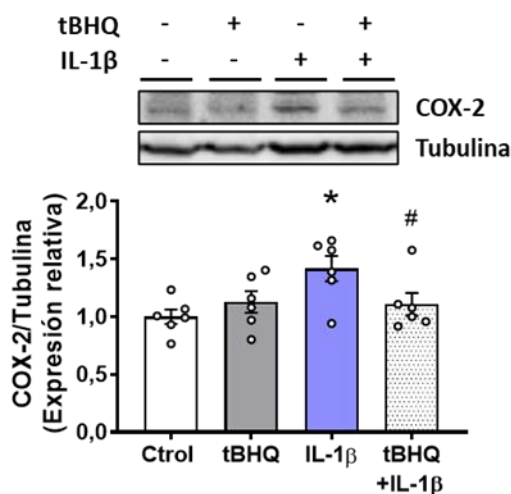
**Figura 95. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la expresión de p-JNK2 y p-p38 inducido por IL-1β.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20 μM, 24 h) en ausencia y presencia de IL-1β (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de p-JNK2 (a) y p-p38 (b) en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestran blots representativos. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \*p<0,05 vs. Ctrl y #p<0,05 vs. IL-1β por *t* de Student pareada.

Además, tBHQ inhibió el aumento de la expresión nuclear de la subunidad p-c-Jun del factor de transcripción AP-1 inducida por IL-1β, mientras que no modificó dicha expresión en cultivos celulares control (**Figura 96**).



**Figura 96. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la expresión nuclear de p-c-Jun inducido por IL-1β.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20 μM, 24 h) en ausencia y presencia de IL-1β (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica nuclear de p-c-Jun en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo de la expresión en citosol y en núcleo. Para confirmar el éxito en el fraccionamiento celular se utilizó la expresión de TBP en núcleo y la de GAPDH en citosol. Los resultados (media ± ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \*p<0,05 vs. Ctrl y #p<0,05 vs. IL-1β por *t* de Student pareada.

Por último, observamos que tBHQ también redujo el aumento de la expresión de la enzima proinflamatoria COX-2 inducida por IL-1 $\beta$ , no alterando dicha expresión en situación control (**Figura 97**).



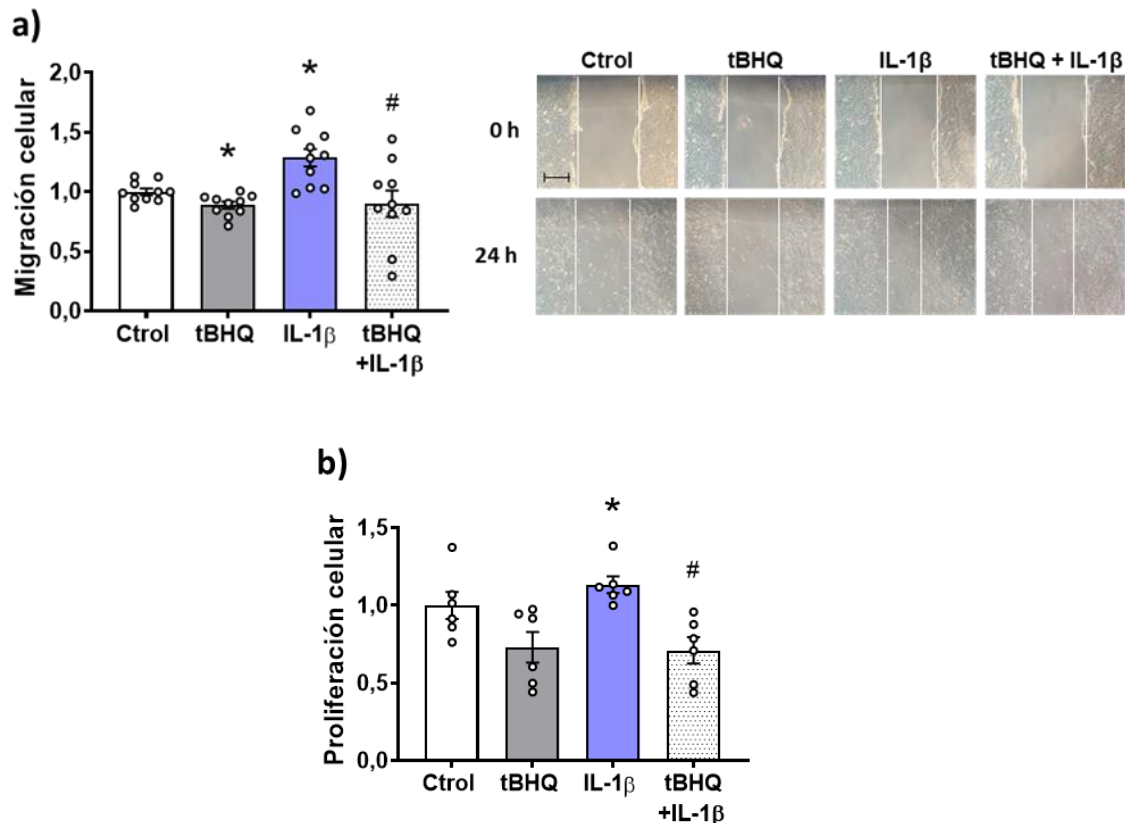
**Figura 97. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la expresión de COX-2 inducido por IL-1 $\beta$ .** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de COX-2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p$ <0,05 vs. Ctrl y # $p$ <0,05 vs. IL-1 $\beta$  por  $t$  de Student pareada.

Por lo tanto, todos estos resultados muestran que tBHQ inhibe la activación de la vía MAPK/AP-1/COX-2 inducida por IL-1 $\beta$  y sugieren, por tanto, que la activación de Nrf2 ejerce un papel protector contra los efectos proinflamatorios de esta citoquina.

#### 4.5. MODULACIÓN POR tBHQ DEL EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA MIGRACIÓN Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Previamente hemos demostrado que el estrés oxidativo y la vía del receptor TLR4 participan en el aumento de la migración y de la proliferación celular inducido por IL-1 $\beta$ . En este apartado analizamos si la activación de Nrf2 por tBHQ modula la estimulación de estos procesos por IL-1 $\beta$ .

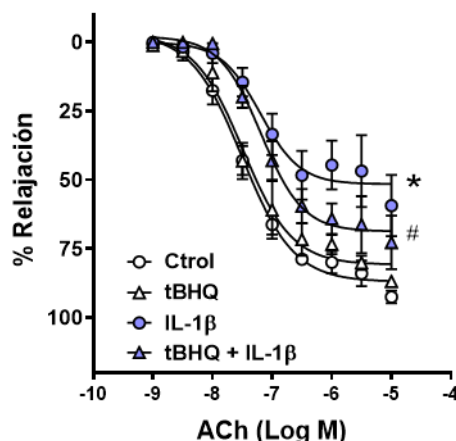
En cultivos celulares en situación control, tBHQ redujo la migración celular, aunque no afectó a la proliferación (**Figura 98**). Además, tBHQ (20  $\mu$ M, 24 h) redujo tanto la migración (**Figura 98a**) como la proliferación celular inducidas por IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 24 h) (**Figura 98b**), sugiriendo un papel protector de la activación de Nrf2 frente a estos procesos celulares.



**Figura 98.** La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la migración y proliferación de las CMLV inducido por IL-1 $\beta$ . (a) Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 24 h) sobre la migración celular de CMLV de aorta de ratón. A la derecha se muestran imágenes representativas. La barra de escala representa 50  $\mu$ m. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como el valor relativo de cierre de la herida respecto a la situación control (Ctrl). (b) Efecto de tBHQ en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  sobre la proliferación celular. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como valor relativo respecto al Ctrl. \* $p$ <0,05 vs. Ctrl y # $p$ <0,05 vs. IL-1 $\beta$  por  $t$  de Student pareada.

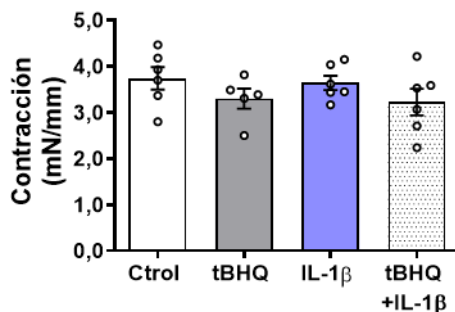
#### 4.6. MODULACIÓN POR tBHQ DEL EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR

Por último, también analizamos el efecto de la activación de Nrf2 sobre la función vascular. El tratamiento de las aortas de ratón con tBHQ (20  $\mu$ M, 24 h) no modificó la respuesta vasodilatadora inducida por ACh; sin embargo, este tratamiento mejoró la vasodilatación dependiente de endotelio que, como hemos comentado, se encuentra deteriorada por acción de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 24 h) (**Figura 99**), mostrando un papel protector del factor de transcripción Nrf2 frente a la disfunción endotelial inducida por esta citoquina.



**Figura 99. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona mejora la disfunción endotelial inducida por IL-1 $\beta$  en aorta de ratón.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) sobre la curva concentración-respuesta a acetilcolina (ACh) en segmentos de aorta de ratón, en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 24 h). Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados en porcentaje de la respuesta a fenilefrina. \* $p < 0,05$  vs. control (Ctrl) y # $p < 0,05$  vs. IL-1 $\beta$ , mediante ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni (n= 5).

Por otra parte, tBHQ no modificó la contracción inducida por K-KHS, ni en ausencia ni en presencia de IL-1 $\beta$  (Figura 100), lo que indica que la activación de Nrf2 no afecta a la contractilidad muscular vascular.



**Figura 100. Terbutilhidroquinona no altera la contractilidad vascular.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 24 h) sobre la contracción inducida por K-KHS en segmentos de aorta de ratón. Los resultados se expresan como media  $\pm$  ES. Ctrl: Control.

## 5. MODULACIÓN POR LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 DEL EFECTO PROINFLAMATORIO DE LPS

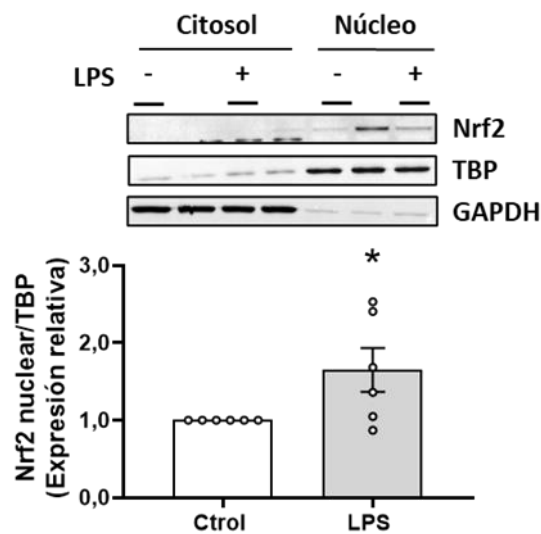
El lipopolisacárido bacteriano (LPS), un componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, es el principal ligando del receptor TLR4. A través de la activación de TLR4, LPS produce ROS, las cuales contribuyen a la respuesta inflamatoria desencadenada por la endotoxina (Asehnoune *et al.*, 2004; Hernanz *et al.*, 2004). Como hemos visto, la vía de TLR4 participa en los efectos de IL-1 $\beta$ , incluida la producción de ROS y la inducción de la expresión de mediadores proinflamatorios. Por otra parte, la activación del factor de transcripción Nrf2 por

tBHQ modula los efectos de IL-1 $\beta$ , entre ellos la activación de la vía TLR4/MyD88. Por todo ello, a continuación, analizamos si la estimulación de la vía de TLR4 por LPS activa al factor de transcripción Nrf2, así como la modulación de los efectos proinflamatorios de LPS producida tras la activación de Nrf2 por tBHQ.

## 5.1. EFECTO DE LPS SOBRE LA VÍA DE Nrf2

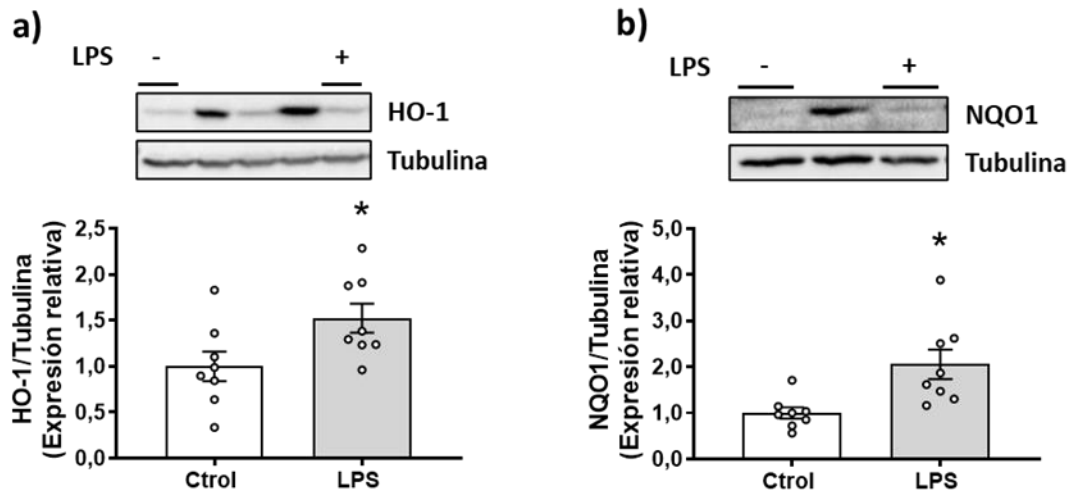
### 5.1.1. Activación de la vía de Nrf2 por LPS

En primer lugar, observamos que el tratamiento de estas células con LPS (10  $\mu$ g/ml, 1 h) indujo un aumento de la translocación al núcleo de Nrf2 (**Figura 101**), indicativo de la activación de este factor de transcripción.



**Figura 101. La activación de TLR4 por LPS incrementa la expresión nuclear de Nrf2.** Efecto de LPS (10  $\mu$ g/ml, 1 h) sobre la expresión proteica nuclear de Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo de la expresión en el citosol y en el núcleo. Para confirmar el éxito en el fraccionamiento celular se utilizó la expresión de TBP en núcleo y la de GAPDH en citosol. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrol). \* $p < 0,05$  por  $t$  de Student pareada.

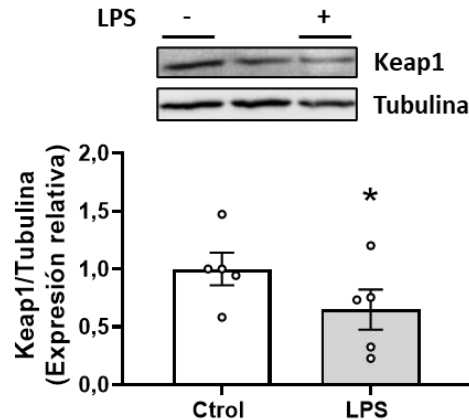
A continuación, analizamos la expresión de algunas de las enzimas reguladas por el factor de transcripción Nrf2. El tratamiento de las CMLV con LPS indujo un aumento en la expresión de HO-1 y NQO1 (**Figura 102**).



**Figura 102. La activación de TLR4 por LPS incrementa la expresión de HO-1 y NQO1.** Efecto de LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ , 1 h) sobre la expresión proteica de HO-1 (a) y NQO1 (b) en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  por  $t$  de Student pareada.

### 5.1.2. Efecto de LPS sobre Keap1

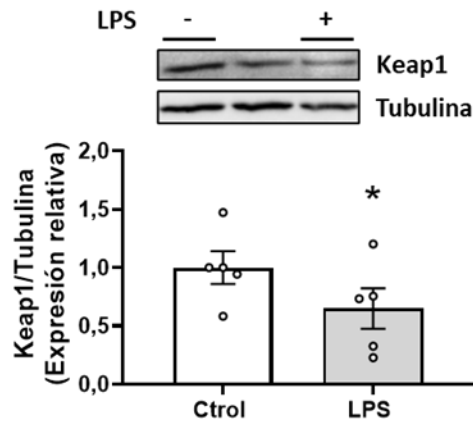
Por otra parte, el tratamiento con LPS redujo la expresión de Keap1 en las CMLV de ratón (Figura 103), lo que estaría favoreciendo la activación de Nrf2 por este estímulo.



**Figura 103. La activación de TLR4 por LPS reduce la expresión de Keap1.** Efecto de LPS (10  $\mu\text{g/ml}$ , 1 h) sobre la expresión proteica de Keap1 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  por  $t$  de Student pareada.

### 5.1.3. Efecto de LPS sobre la fosforilación de Nrf2

Además, analizamos si LPS puede activar Nrf2 mediante la fosforilación de este factor de transcripción. Confirmando esto, el tratamiento con LPS aumentó los niveles de p-Nrf2 (Figura 104).



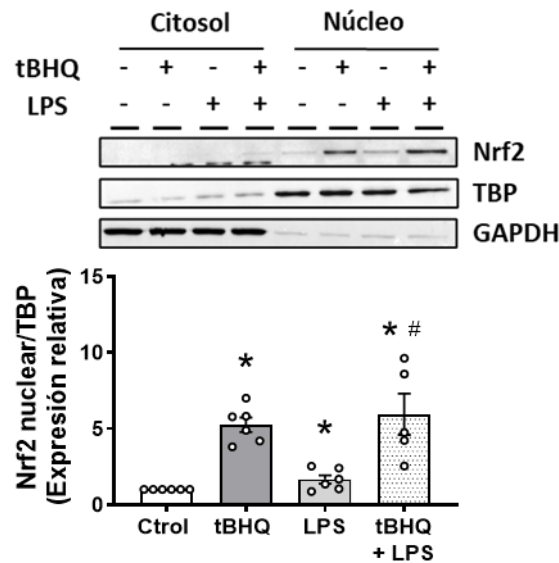
**Figura 104. La activación de TLR4 por LPS incrementa la expresión de p-Nrf2.** Efecto de LPS (10  $\mu$ g/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de p-Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  por  $t$  de Student pareada.

En conjunto, los resultados mostrados en este apartado indican que la vía activada por el factor de transcripción Nrf2 es estimulada por acción del LPS.

## 5.2. MODULACIÓN POR tBHQ DEL EFECTO PROINFLAMATORIO DE LPS

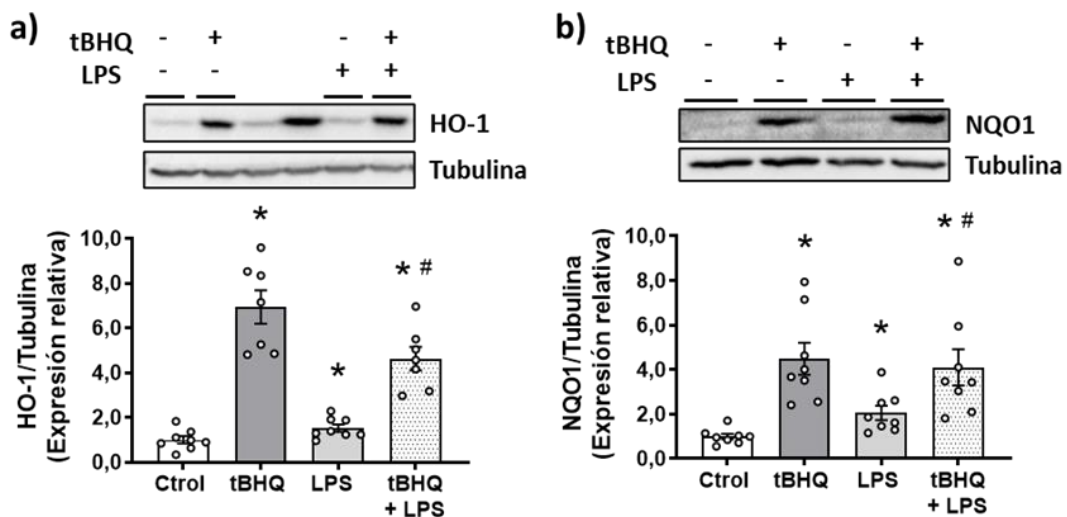
### 5.2.1. Modulación por tBHQ del efecto de LPS sobre la vía de Nrf2

Seguidamente, analizamos si el activador de Nrf2 tBHQ modulaba los efectos del LPS. El pretratamiento de las CMLV con tBHQ (20  $\mu$ M, 24 h) aumentó la translocación al núcleo de Nrf2 inducida LPS (10  $\mu$ g/ml, 1 h, [Figura 105](#)); sin embargo, este aumento, mayor al inducido por LPS, fue similar al ejercido por tBHQ, lo que sugiere que el efecto observado en este caso se debería principalmente a la acción de tBHQ, descartando un efecto sumatorio de la combinación de los dos estímulos.



**Figura 105. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modula el efecto de LPS sobre la expresión nuclear de Nrf2.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de LPS (10  $\mu$ g/ml, 1 h) sobre la expresión proteica nuclear de Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo de la expresión en el citosol y en el núcleo. Para confirmar el éxito en el fraccionamiento celular se utilizó la expresión de TBP en núcleo y la de GAPDH en citosol. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrlol). \*p<0,05 vs. Ctrlol y #p<0,05 vs. LPS por *t* de Student pareada.

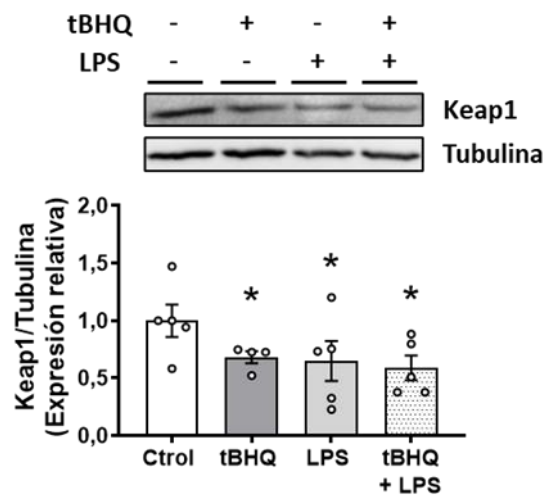
A continuación, estudiamos el efecto de tBHQ sobre la inducción de la expresión de diversas proteínas diana de Nrf2 por LPS. Los resultados obtenidos muestran, del mismo modo que ocurría con la translocación al núcleo de Nrf2, que el pretratamiento con tBHQ de células estimuladas con LPS incrementa la expresión de las proteínas HO-1 y NQO1 de forma similar a lo observado con la estimulación únicamente con tBHQ (Figura 106).



**Figura 106. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modula el efecto de LPS sobre la expresión de HO-1 y NQO1.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de LPS (10  $\mu$ g/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de HO-1 (a) y NQO1 (b) en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestran blots representativos. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrlol). \*p<0,05 vs. Ctrlol y #p<0,05 vs. LPS por *t* de Student pareada.

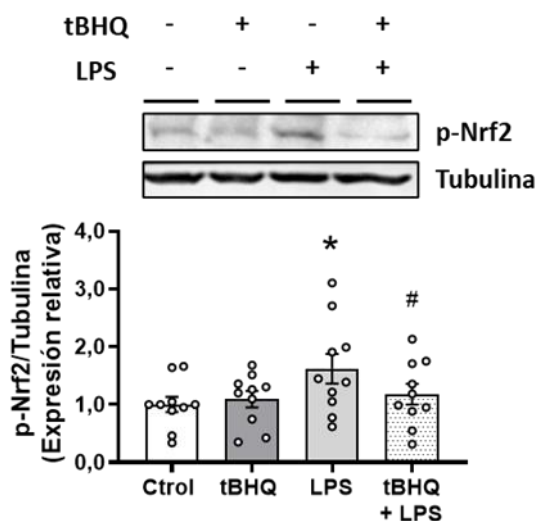


Por su parte, la estimulación con LPS de células tratadas con tBHQ redujo la expresión proteica del inhibidor de Nrf2 Keap1 al mismo nivel que la producida por LPS o tBHQ, descartando así un efecto sumatorio de ambos estímulos (Figura 107).



**Figura 107. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modula el efecto de LPS sobre la expresión de Keap1.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de LPS (10  $\mu$ g/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de Keap1 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  vs. Ctrl por *t* de Student pareada.

A continuación, estudiamos si tBHQ afectaba a la fosforilación de Nrf2 inducida por LPS, y observamos que el pretratamiento con este activador de Nrf2 inhibía el aumento de p-Nrf2 inducido por LPS (Figura 108).

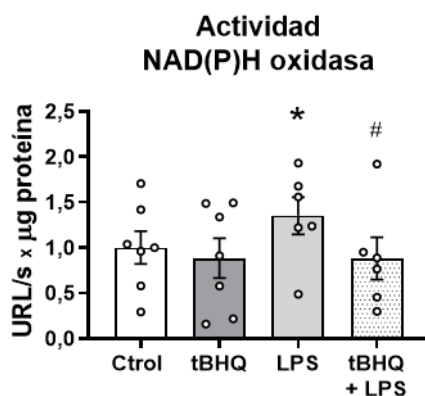


**Figura 108. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la expresión de p-Nrf2 inducido por LPS.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de LPS (10  $\mu$ g/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de p-Nrf2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  vs. Ctrl y # $p < 0,05$  vs. LPS por *t* de Student pareada.

### 5.2.2. Modulación por tBHQ del efecto de LPS sobre el estrés oxidativo

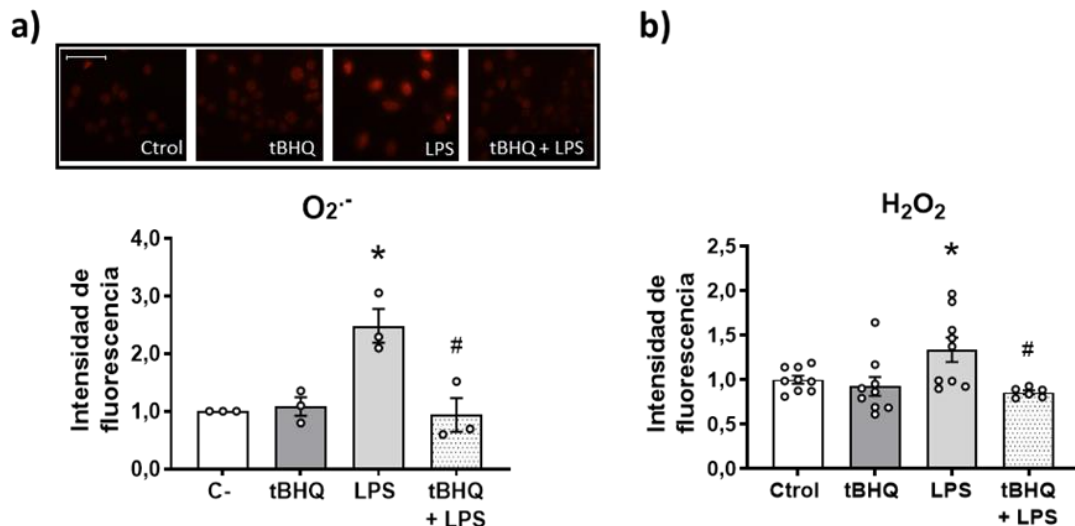
Como se ha comentado, LPS, a través de la interacción con su receptor TLR4, puede inducir la producción de ROS (Asehnoune *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2006). En base a esto, analizamos si la activación del factor de transcripción Nrf2 modulaba la producción de ROS inducida por LPS. Para ello, las CMLV se trataron con el activador de Nrf2 tBHQ previo al tratamiento con LPS y se analizó la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa y la producción de ROS.

Ya hemos descrito previamente que el activador de Nrf2 tBHQ no modifica ni la actividad NAD(P)H oxidasa ni la producción de ROS en las CMLV de ratón; sin embargo, el pretratamiento de las CMLV con tBHQ inhibió el incremento en la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa inducido por LPS (**Figura 109**).



**Figura 109.** La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa inducido por LPS. Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20 µM, 24 h) en ausencia y presencia de LPS (10 µg/ml, 1 h) sobre la actividad NAD(P)H oxidasa en CMLV de aorta de ratón. Los resultados (media ± ES) están expresados como valor relativo respecto al control (Ctról). \*p<0,05 vs. Ctról y #p<0,05 vs. LPS por *t* de Student pareada. URL: unidades relativas de luz.

De forma similar, el tratamiento con tBHQ inhibió el incremento de la producción tanto de anión superóxido como de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducido por LPS (**Figura 110**).



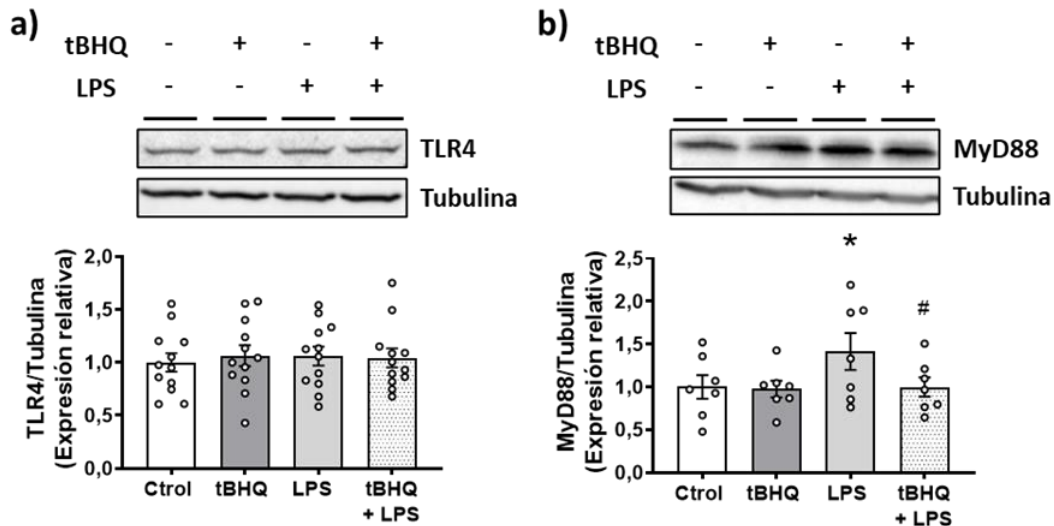
**Figura 110. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno inducido por LPS.** (a) Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de LPS (10  $\mu$ g/ml, 1 h) sobre la producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en CMLV de aorta de ratón medida por microscopía de fluorescencia. Las imágenes representativas se muestran en la parte superior. Las imágenes se capturaron con un microscopio de fluorescencia; la barra de escala representa 100  $\mu$ m. (b) Efecto de tBHQ en ausencia y presencia de LPS sobre la producción de  $H_2O_2$  medida por citometría de flujo. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como valor relativo respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  vs. Ctrl y # $p < 0,05$  vs. LPS por *t* de Student pareada.

En conjunto, los resultados descritos en este apartado indican que la activación de Nrf2 protege frente a los efectos prooxidantes de LPS, confirmando así el efecto antioxidante de este factor de transcripción.

### 5.2.3. Modulación por tBHQ de los efectos proinflamatorios de LPS

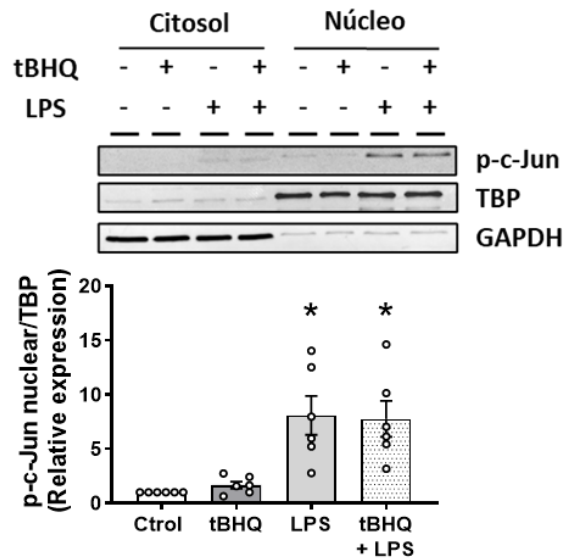
Puesto que LPS es capaz de generar inflamación, a continuación, analizamos el efecto que tiene la activación de Nrf2 sobre las acciones de la endotoxina en la expresión de los marcadores proinflamatorios TLR4, MyD88, p-c-Jun y COX-2.

La estimulación de las CMLV de ratón con LPS no modificó la expresión del receptor de membrana TLR4. El pretratamiento de estas células con el activador de Nrf2 tBHQ tampoco varió la expresión de TLR4, ni en ausencia ni en presencia de LPS (Figura 111a). Sin embargo, LPS aumentó la expresión de la proteína adaptadora MyD88, lo que sugiere que LPS está activando la vía de señalización de TLR4 dependiente de MyD88. tBHQ, como se ha descrito previamente, no modificó la expresión de MyD88 en situación control, pero redujo el aumento en la expresión de esta proteína inducido por LPS (Figura 111b). Estos resultados sugieren que la activación de Nrf2 interfiere con la activación de la vía TLR4/MyD88 inducido por la endotoxina bacteriana.



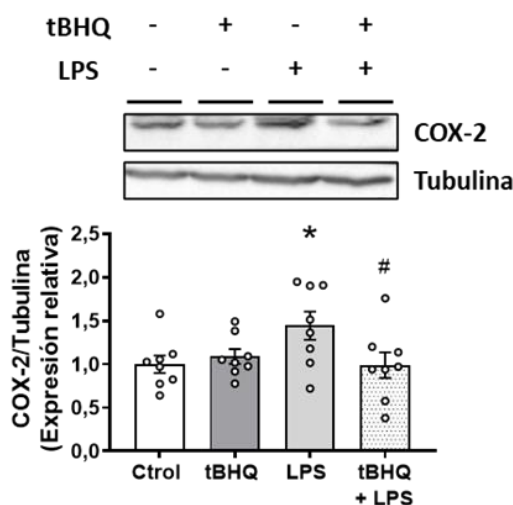
**Figura 111.** La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la expresión de MyD88 inducido por LPS. Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de LPS (10  $\mu$ g/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de TLR4 (a) y de MyD88 (b) en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestran blots representativos. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  vs. Ctrl y # $p < 0,05$  vs. LPS por *t* de Student pareada.

Por otra parte, la estimulación de las CMLV con LPS aumentó la expresión nuclear de p-c-Jun, sugiriendo la activación del factor de transcripción AP-1; el pretratamiento con tBHQ no modificó este efecto de la endotoxina. Como hemos visto previamente, la estimulación de las células únicamente con tBHQ tampoco alteró la expresión nuclear de la subunidad p-c-Jun del factor de transcripción AP-1 (Figura 112).



**Figura 112.** La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modifica el incremento en la expresión nuclear de p-c-Jun inducido por LPS. Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de LPS (10  $\mu$ g/ml, 1 h) sobre la expresión proteica nuclear de p-c-Jun en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo de la expresión en el citosol y en el núcleo. Para confirmar el éxito en el fraccionamiento celular se utilizó la expresión de TBP en núcleo y la de GAPDH en citosol. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  vs. Ctrl por *t* de Student pareada.

Por último, el tratamiento con LPS aumentó la expresión de la enzima proinflamatoria COX-2, efecto que fue inhibido por la activación de Nrf2 con tBHQ. Como se ha comentado previamente, tBHQ no modifica la expresión de COX-2 en situación control (**Figura 113**).



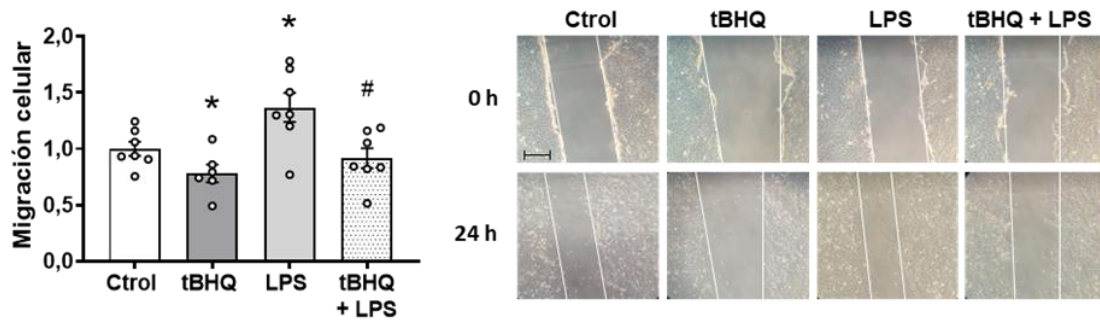
**Figura 113. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la expresión de COX-2 inducido por LPS.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de LPS (10  $\mu$ g/ml, 1 h) sobre la expresión proteica de COX-2 en CMLV de aorta de ratón. En la parte superior se muestra un blot representativo. Los resultados (media  $\pm$  ES) se presentan como expresión relativa respecto al control (Ctrl). \* $p < 0,05$  vs. Ctrl y # $p < 0,05$  vs. LPS por  $t$  de Student pareada.

Los resultados de este apartado sugieren que la activación de Nrf2 por tBHQ podría estar protegiendo frente a los efectos proinflamatorios de LPS, confirmando así el efecto antiinflamatorio de este factor de transcripción.

#### 5.2.4. Modulación por tBHQ del efecto de LPS sobre la migración y la proliferación celular

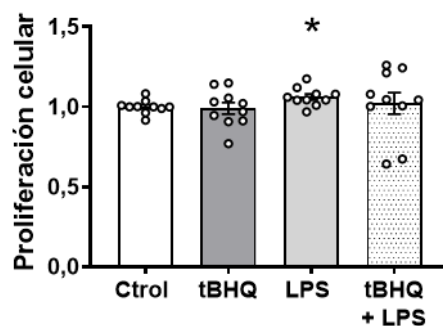
Se ha descrito que la activación de TLR4, a través de la inducción de la inflamación y la producción de ROS, puede aumentar tanto la migración como la proliferación de las CMLV (Yang *et al.*, 2014a; Miyabe *et al.*, 2022). Por ello, a continuación, analizamos si la activación de Nrf2 modulaba el efecto de LPS sobre la proliferación y la migración en la línea de CMLV de ratón. Para llevar a cabo este análisis, las CMLV se trataron con el activador de Nrf2 tBHQ (20  $\mu$ M, 24 h) y con LPS (10  $\mu$ g/ml, 24 h) de manera simultánea.

Como puede observarse en la **Figura 114**, LPS aumentó la migración de las CMLV, efecto que fue inhibido por el pretratamiento con tBHQ. Estos resultados sugieren un papel protector de la activación de Nrf2 frente a la inducción de la migración de las CMLV inducida por LPS. Como hemos mostrado en apartados anteriores (**Figuras 93 y 98**), tBHQ también redujo la migración celular en situación control (**Figura 114**).



**Figura 114. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona inhibe el incremento de la migración de las CMLV inducido por LPS.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de LPS (10  $\mu$ g/ml, 24 h) sobre la migración celular de CMLV de aorta de ratón. A la derecha se muestran imágenes representativas. La barra de escala representa 50  $\mu$ m. Los resultados (media  $\pm$  ES) se expresan como el valor relativo de cierre de la herida respecto a la situación control (Ctrlol). \* $p$ <0,05 vs. Ctrlol y # $p$ <0,05 vs. LPS por  $t$  de Student pareada.

LPS también aumentó ligeramente la proliferación celular, efecto que no fue alterado por el pretratamiento con tBHQ (Figura 115). Este activador de Nrf2 tampoco modificó la proliferación celular en situación control, como hemos comentado previamente.



**Figura 115. La activación de Nrf2 por terbutilhidroquinona no modifica el incremento de la proliferación de las CMLV inducido por LPS.** Efecto de terbutilhidroquinona (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) en ausencia y presencia de LPS (10  $\mu$ g/ml, 24 h) sobre proliferación celular de CMLV de aorta de ratón. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como valor relativo respecto al control (Ctrlol). \* $p$ <0,05 vs. Ctrlol por  $t$  de Student pareada.

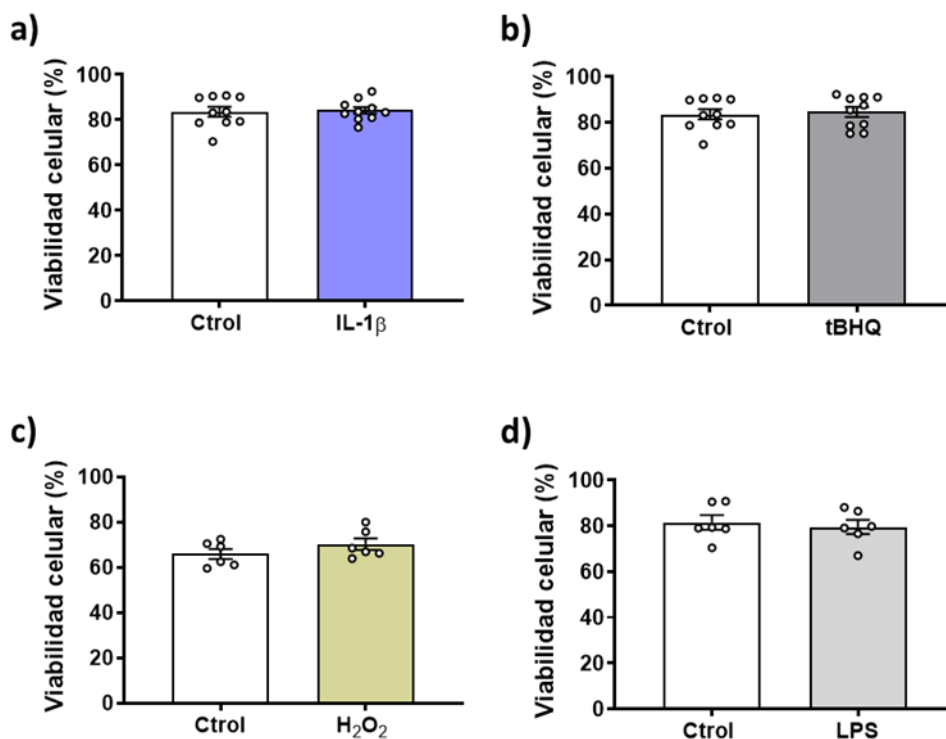
## 6. ESTUDIO DE LA POSIBLE TOXICIDAD CELULAR INDUCIDA POR LOS FÁRMACOS UTILIZADOS EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO

Los dos principales procesos que conducen a la muerte de las células son la apoptosis, o muerte celular programada, y la necrosis, o muerte celular descontrolada. La apoptosis es el proceso por el cual las células dejan de crecer y dividirse y mueren. Durante esta eliminación controlada de las células se evita que el contenido celular salga al medio extracelular, minimizando así el daño a otras células y tejidos de alrededor. La necrosis, por su parte, se caracteriza por una muerte celular descontrolada, normalmente tras un daño o infección grave, que provoca la

ruptura de la membrana celular y la consiguiente salida del contenido de las células al medio extracelular, dañando las células y los tejidos próximos (D'Arcy, 2019).

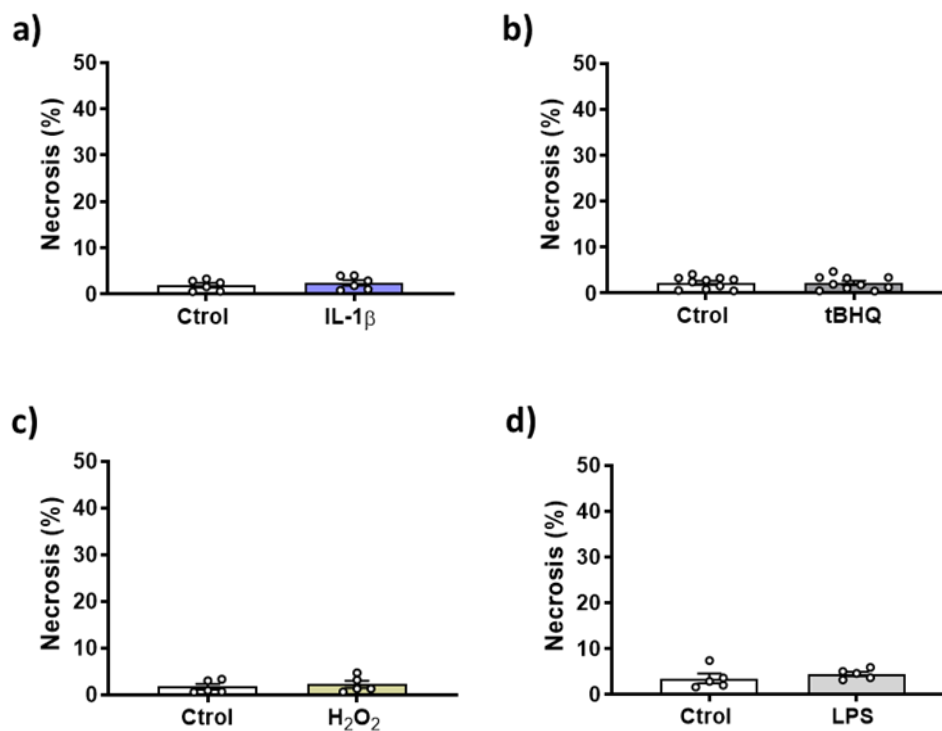
Para comprobar que los estímulos que utilizamos en este estudio no interferían con la viabilidad celular y, por lo tanto, que sus efectos no se debían a su posible toxicidad, analizamos tanto la viabilidad como la necrosis y la apoptosis de las CMLV de ratón por citometría de flujo, utilizando para ello el kit de doble tinción anexina V y ioduro de propidio (IP).

Ninguno de los estímulos utilizados en este estudio, IL-1 $\beta$ , tBHQ, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y LPS, afectó a la viabilidad de las CMLV de ratón, descartando un efecto tóxico de estas sustancias (Figura 116).



**Figura 116. Los estímulos utilizados en este trabajo no afectan a la viabilidad celular.** Efecto de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) (a), tBHQ (20  $\mu$ M, 24 h) (b), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M, 1 h) (c) y LPS (10  $\mu$ g/ml, 1 h) (d) sobre la viabilidad celular de las CMLV de aorta de ratón. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como porcentaje de células vivas tras los tratamientos. Ctról: Control.

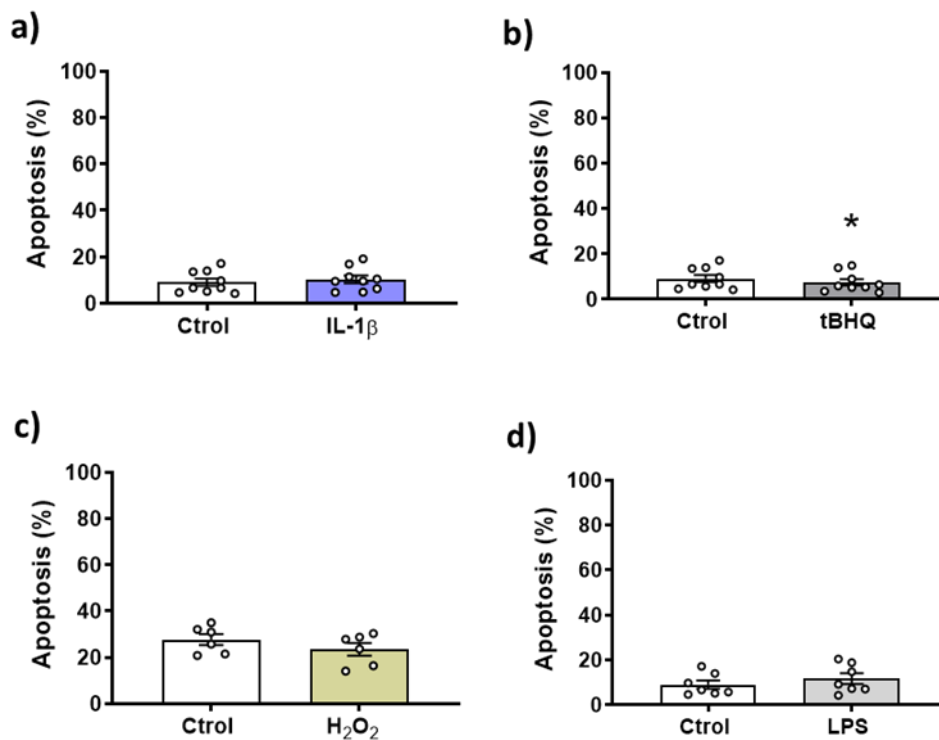
Respecto a la necrosis celular, tampoco los estímulos utilizados en este estudio, IL-1 $\beta$ , tBHQ, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y LPS, indujeron necrosis en las CMLV de ratón (**Figura 117**).



**Figura 117. Los estímulos utilizados en este trabajo no inducen necrosis celular.** Efecto de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) (a), tBHQ (20  $\mu$ M, 24 h) (b), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M, 1 h) (c) y LPS (10  $\mu$ g/ml, 1 h) (d) sobre la necrosis en las CMLV de aorta de ratón. Los resultados (medio  $\pm$  ES) están expresados como porcentaje de células en necrosis tras los tratamientos. Ctrl: control.



Por último, analizamos el efecto de los estímulos utilizados en este estudio sobre la apoptosis de las CMLV de ratón, observando que sólo el tBHQ redujo la apoptosis en las CMLV de ratón. Ni IL-1 $\beta$ , ni H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ni LPS afectaron a la apoptosis de estas células (**Figura 118**).



**Figura 118. De los estímulos utilizados en este trabajo solo tBHQ afecta a la apoptosis celular.** Efecto de IL-1 $\beta$  (10 ng/ml, 1 h) (a), tBHQ (20  $\mu$ M, 24 h) (b), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M, 1 h) (c) y LPS (10  $\mu$ g/ml, 1 h) (d) sobre la apoptosis en las CMLV de aorta de ratón. Los resultados (media  $\pm$  ES) están expresados como porcentaje de células apoptóticas tras los tratamientos. \* $p < 0,05$  por *t* de Student pareada. Ctrlol: control.

En conjunto, estos resultados indican que los estímulos utilizados para la realización de este estudio no son tóxicos a las dosis y a los tiempos utilizados.



# **DISCUSIÓN**



## 1. PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL EFECTO PROINFLAMATORIO DE IL-1 $\beta$

Las ILs son quimioquinas solubles, producidas por diversos tipos celulares como las células del sistema inmune o las de la pared vascular, que son importantes mediadores de la señalización celular. De entre ellas, las de la familia IL-1 juegan un destacado papel en la respuesta inmune innata. Uno de sus miembros, la IL-1 $\beta$ , es un conocido mediador en la inflamación que se asocia a diversas enfermedades cardiovasculares, habiéndose descrito niveles elevados de esta citoquina proinflamatoria en patologías como la aterosclerosis, la hipertensión, la diabetes o el infarto de miocardio, enfermedades que cursan, además, con estrés oxidativo (Vicenová *et al.*, 2009; Krishnan *et al.*, 2014; Pfeiler *et al.*, 2019; Abbate *et al.*, 2020; Mai and Liao, 2020; Melton and Qiu, 2021). Así, por ejemplo, se ha descrito que IL-1 $\beta$  contribuye a la aterogénesis a través de su participación en la formación y el desarrollo de las placas de ateroma (Mai and Liao, 2020). De acuerdo con esto, el bloqueo de la señalización mediada por esta citoquina reduce la formación de las placas de ateroma y con ello la progresión de la aterosclerosis (Bhaskar *et al.*, 2011; Ku *et al.*, 2022). Asimismo, IL-1 $\beta$  contribuye también al desarrollo de hipertensión (Krishnan *et al.*, 2014; Melton and Qiu, 2021). En este sentido, la inhibición de la actividad de IL-1 $\beta$  reduce la presión arterial en modelos de hipertensión en ratones DOCA/salt (Ling *et al.*, 2017) e inducida por Ang II (Akita *et al.*, 2021). Por otra parte, IL-1 $\beta$  provoca un incremento en la migración y la proliferación de las CMLV, así como disfunción endotelial, por mecanismos que implican estrés oxidativo y la subsecuente activación de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B (Jiménez-Altayó *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2012; Krishnan *et al.*, 2014; Aguado *et al.*, 2016).

En la primera parte de esta Tesis Doctoral confirmamos los efectos inflamatorios y oxidativos de IL-1 $\beta$  en la línea celular de CMLV de ratón, MOVAS, que han sido las utilizadas en este estudio.

Las ROS, entre las cuales destacan el O<sub>2</sub><sup>-</sup> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, actúan como segundos mensajeros y participan en la regulación de numerosos procesos celulares fisiológicos como el crecimiento, la diferenciación, la migración y la proliferación celular, la inflamación, la producción de componentes de la MEC, la apoptosis y el remodelado de la pared vascular (Dröge, 2002; Montezano and Touyz, 2012; Schieber and Chandel, 2014). Un exceso en la producción de ROS, que genera estrés oxidativo, tiene un importante papel en la desregulación de todos estos procesos, contribuyendo así al desarrollo de patologías cardiovasculares (Marchio *et al.*, 2019; Senoner and Dichtl, 2019; Griendling *et al.*, 2021; Shaito *et al.*, 2022). La NAD(P)H oxidasa es la fuente principal de ROS en células de la pared vascular y está presente tanto en las células endoteliales como en las CMLV (Chocry and Leloup, 2020; Zhang *et al.*, 2020). Es bien sabido que la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  aumenta la producción de ROS en varios tipos celulares, incluyendo las células del sistema cardiovascular (Brigelius-Flohé *et al.*, 2004; Guikema *et al.*, 2005; Tesoriere *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2016), donde provoca la activación de la NAD(P)H oxidasa (Miller *et al.*, 2007; Ginnan *et al.*, 2013; Aguado *et al.*, 2016). En este estudio observamos que la estimulación con IL-1 $\beta$  indujo un aumento tanto en la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa como en la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en CMLV de aorta de ratón. Resultados similares fueron descritos por nuestro grupo al estimular CMLV de ratas Wistar Kyoto (WKY) y SHR con IL-1 $\beta$  (Martín *et al.*, 2012). Por otra parte, observamos que la adición exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también aumentó la actividad de la NAD(P)H oxidasa y la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en estas células, confirmando

la producción de ROS inducida por ROS, mecanismo que ha sido descrito por nuestro grupo y otros investigadores (Hernanz *et al.*, 2014). Así por ejemplo, en arterias mesentéricas de resistencia de ratas SHR la aplicación exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activa la NAD(P)H oxidasa produciendo O<sub>2</sub><sup>-</sup> (García-Redondo *et al.*, 2009a).

IL-1 $\beta$  contribuye al desarrollo de patologías cardiovasculares, no sólo por inducir estrés oxidativo, sino también debido a sus efectos proinflamatorios al promover la expresión de diferentes mediadores inflamatorios por parte de las células del sistema inmune y de las células vasculares, como las células endoteliales y las CMLV (Sprague and Khalil, 2009; Vicens *et al.*, 2009; Krishnan *et al.*, 2014; Pfeiler *et al.*, 2019). Así, IL-1 $\beta$  induce la activación de VCAM-1, que recluta células inflamatorias a la lesión aterosclerótica (Wang *et al.*, 1995), y promueve la calcificación vascular (Liguori *et al.*, 2019; Sánchez-Duffhues *et al.*, 2019). IL-1 $\beta$  también activa al factor de transcripción inflamatorio NF- $\kappa$ B e incrementa la expresión de la enzima COX-2 en células endoteliales humanas (Toniolo *et al.*, 2015). Además, en un estudio previo, nuestro grupo describió que IL-1 $\beta$  produce un aumento en la expresión de COX-2 en CMLV, que fue mayor en células de ratas SHR que en su control normotenso, las ratas WKY (Martín *et al.*, 2012). En la pared vascular, la enzima COX-2 se induce por estrés oxidativo y estímulos inflamatorios (Zhao *et al.*, 2021) y actúa como mediador de la respuesta inflamatoria mediante la liberación de prostanoïdes, que además pueden contribuir a aumentar la contractilidad vascular e inducir disfunción endotelial (Dorrance, 2007; Félétou *et al.*, 2011; De Queiroz *et al.*, 2017; Lopes *et al.*, 2022). Niveles elevados de COX-2 se relacionan con el desarrollo y la progresión de patologías que cursan con estrés oxidativo e inflamación (Weksler, 2015; Zhao *et al.*, 2021). En este sentido, se han descrito niveles elevados de COX-2 y de prostanoïdes vasoconstrictores en modelos de hipertensión como las ratas SHR (Félétou, *et al.*, 2011; Viridis *et al.*, 2013), en arterias de ratones (Bagi *et al.*, 2005) y pacientes (Feng *et al.*, 2017) diabéticos y en las placas de ateroma de pacientes con aterosclerosis (Baker *et al.*, 1999; Schönbeck *et al.*, 1999). Además, numerosas evidencias apuntan a la existencia de una relación entre el aumento del estrés oxidativo y la expresión de COX-2 tras la exposición a varios estímulos. Así, Feng *et al.* (1995) demostraron que el estrés oxidativo inducido por IL-1 $\beta$ , LPS o TNF- $\alpha$  aumentaba los niveles de ARNm y proteína de COX-2 en células mesangiales de rata. En CMLV de SHR, nuestro grupo ha descrito que la producción de ROS por la NAD(P)H oxidasa participa en la inducción de la expresión de COX-2 por Ang II, IL-1 $\beta$  o ET-1 (Martín *et al.*, 2012; Pérez-Girón *et al.*, 2014; Palacios-Ramírez *et al.*, 2019). Por su parte, Di Mari *et al.* (2003) describieron que las ROS estaban implicadas en la inducción de COX-2 en miofibroblastos estimulados por IL-1 $\alpha$ . Otros autores también demostraron la activación de COX-2 por las ROS inducidas en respuesta a TNF- $\alpha$  o por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células endoteliales humanas (Eligini *et al.*, 2005; 2009). Por otra parte, trabajos de nuestro grupo mostraron que el tratamiento con los antioxidantes apocinina y mito-TEMPO reducía la aumentada expresión de COX-2 en arterias de ratones hipertensos por infusión con Ang II (Martínez-Revelles *et al.*, 2013), confirmando la contribución del estrés oxidativo en la misma. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  induce la expresión del ARNm y de la proteína de COX-2 en cultivos de CMLV de ratón, efecto que fue abolido por los antioxidantes apocinina y catalasa, corroborando así la participación del estrés oxidativo en dicha inducción.

Se ha descrito que la activación del factor de transcripción AP-1 está implicada en el aumento de la expresión de COX-2 inducido por estímulos inflamatorios como IL-1 $\beta$ , ET-1, LPS, o Ang II

(Hu *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2002; Kwon *et al.*, 2013; Pérez-Girón *et al.*, 2014; Palacios-Ramírez *et al.*, 2019). Además, la activación de AP-1 y, consecuentemente, la inducción de COX-2 están mediadas por las MAPK. Así, AP-1 se activa por fosforilación en el extremo N-terminal de c-jun por la quinasa JNK (Whitmarsh and Davis, 1996; Manning and Davis, 2003). Resultados previos de nuestro grupo habían demostrado que ET-1 incrementaba la fosforilación de JNK y los niveles de ARNm de c-jun en CMLV de SHR, sugiriendo la activación de AP-1, y que JNK participaba en la activación de COX-2 (Palacios-Ramírez *et al.*, 2019). Otros autores como Sawano *et al.* (2002) demostraron la participación de la vía JNK/AP-1 en la activación de COX-2 en células mesangiales de rata estimuladas con IL-1 $\beta$ . Por otro lado, se ha descrito que p38 también está implicada en la inducción de COX-2 en CMLV estimuladas con Ang II (Ohnaka *et al.*, 2000), así como en fibroblastos de rata estimulados con IL-1 $\beta$  y Ang II (Beltrán *et al.*, 2009; Galán *et al.*, 2011). De acuerdo con esto, nosotros observamos que IL-1 $\beta$  aumentó la fosforilación de las MAPK p-38 y JNK, así como la translocación nuclear de la subunidad p-c-Jun del factor de transcripción AP-1 en las CMLV de ratón. Observamos, además, que JNK estaba implicada tanto en el aumento de la expresión de COX-2 como en la translocación al núcleo de p-c-Jun inducidas por IL-1 $\beta$ , ya que el tratamiento de estas células con el inhibidor específico de JNK SP600125 revertía estos efectos. Asimismo, comprobamos que las ROS también participaban en la activación de AP-1 por IL-1 $\beta$ , ya que ambos antioxidantes, apocinina y catalasa, revirtieron la translocación al núcleo de p-c-Jun inducida por esta citoquina en las CMLV de ratón. El papel de ROS en la activación del factor de transcripción proinflamatorio AP-1 ha sido previamente descrito en CMLV (Kim *et al.*, 2012; Chou *et al.*, 2019). Asimismo, Mendes *et al.* (2003) observaron que la supresión de la síntesis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por inhibición de la NAD(P)H oxidasa, es una estrategia efectiva para prevenir la activación de AP-1 inducida por IL-1 $\beta$  en condrocitos articulares bovinos.

Una vez demostrada la participación de las ROS en la expresión COX-2 y AP-1 inducida por IL-1 $\beta$ , analizamos si estas podían también modular otros efectos celulares ejercidos por la citoquina. Las CMLV son células capaces de modificar su fenotipo en función de las condiciones del entorno, mediante un proceso reversible de diferenciación-desdiferenciación que conlleva cambios funcionales, estructurales y mecánicos (Zhang *et al.*, 2016; Frismantiene *et al.*, 2018). Así, en condiciones fisiológicas las CMLV presentan un fenotipo contráctil, con expresión de proteínas contráctiles y una baja tasa de proliferación y migración celular, mientras que en condiciones de estrés sufren una desdiferenciación, pasando a un fenotipo sintético, caracterizado por el aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias, la disminución de la expresión de marcadores contráctiles específicos y tasas de proliferación y migración elevadas (Zhang *et al.*, 2016; Frismantiene *et al.*, 2018; Zhuge *et al.*, 2020). Se ha descrito que diversos estímulos inflamatorios, entre ellos IL-1 $\beta$ , por mecanismos que implican a los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1 y al estrés oxidativo, pueden inducir la adquisición del fenotipo sintético por parte de las CMLV (Touyz *et al.*, 2018; Basatemur *et al.*, 2019; Badran *et al.*, 2020). Además, las MAPK (Nagayama *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2017), el factor de transcripción AP-1 (Zhang *et al.*, 2012a; Ji *et al.*, 2020) y la enzima COX-2 (Hu *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2008; Aguado *et al.*, 2015) están estrechamente relacionados con la estimulación de los procesos de migración y proliferación celular en CMLV. En relación con esto, en este trabajo observamos que IL-1 $\beta$  aumentaba tanto la tasa de migración como la de proliferación de las CMLV de ratón.

Es conocido que las ROS juegan un importante papel en la migración y la proliferación de las CMLV (Stanic *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2018). Resultados de nuestro grupo han

mostrado que NOX1 y NOX4 están implicadas en la migración de CMLV inducida por estímulos inflamatorios (Aguado *et al.*, 2016); asimismo, IL-1 $\beta$ , a través del aumento de ROS, induce la proliferación de las CMLV (Martín *et al.*, 2012). Nosotros observamos que la migración celular inducida por IL-1 $\beta$  fue inhibida por apocinina y catalasa, lo que indica que las ROS están implicadas en este proceso. Además, el tratamiento de las CMLV de ratón con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógena aumentó la migración celular, efecto que fue reducido por apocinina, apoyando la participación del O<sub>2</sub><sup>-</sup> en este proceso celular. Respecto a la proliferación celular inducida por IL-1 $\beta$ , esta fue inhibida por apocinina, mientras que el detoxificante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalasa no tuvo ningún efecto. Estos resultados sugieren un papel diferente para el O<sub>2</sub><sup>-</sup> y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la proliferación celular. En línea con esos resultados, se ha sugerido que diferencias en la fuente de producción, el tipo y la concentración de ROS, puedan explicar los diferentes efectos que estas producen sobre la migración y la proliferación de las CMLV (Clempus and Griendling, 2006; Badran *et al.*, 2020). Así por ejemplo, se ha descrito que el O<sub>2</sub><sup>-</sup> producido por NOX1 está implicado en el aumento de la migración y la proliferación de las CMLV inducido por PDGF (Pescatore *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2015a). Respecto al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se ha observado que induce el crecimiento y la proliferación de las CMLV a altas concentraciones (Baas and Berk, 1995), pero detiene el crecimiento de estas células a concentraciones menores (Nickenig *et al.*, 2002). En relación con esto, el papel de NOX4, que produce principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es controvertido, ya que se ha visto que puede tanto estimular la migración y la proliferación de las CMLV (Meng *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2019), como inhibir su proliferación (Di Marco *et al.*, 2016).

Por otra parte, es conocido que la citoquina IL-1 $\beta$ , a través de la inducción de inflamación y estrés oxidativo, puede contribuir al desarrollo de disfunción endotelial y de alteraciones en la función de las CMLV (Briones *et al.*, 2005; Jiménez-Altayó *et al.*, 2006; Mai and Liao, 2020; Melton and Qiu, 2021), ambos procesos asociados a patologías cardiovasculares. Así, Vallejo *et al.* (2014) observaron que la inhibición de IL-1 $\beta$  mejoraba la disfunción endotelial provocada por esta citoquina. Aquí, nosotros confirmamos que IL-1 $\beta$  deterioraba la relajación dependiente de endotelio inducida por acetilcolina en aorta de ratón, vasodilatación que estaba mediada por NO, como sugiere el hecho de que fuera bloqueada por el inhibidor de la NOS, L-NAME. Como se ha comentado en la introducción, las ROS, al reducir la biodisponibilidad de NO, dan lugar a disfunción endotelial (Landmesser *et al.*, 2003; Brown and Griendling, 2015; Zhang *et al.*, 2020). Por lo tanto, es posible que la inducción de estrés oxidativo por IL-1 $\beta$  contribuya a la disfunción endotelial que observamos en nuestras condiciones experimentales. Sin embargo, IL-1 $\beta$  no afectó a la respuesta vasoconstrictora a K-KHS en aorta de ratón, lo que descarta un efecto directo sobre la función muscular.

Hasta aquí, nuestros resultados muestran que la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ , a través de la producción de ROS, induce la activación de la vía JNK/AP-1/COX-2 en las CMLV de ratón, vía que podría estar implicada en la regulación de los procesos de migración y proliferación celular, aunque serían necesarios más experimentos para comprobar esta participación. Además, observamos que esta citoquina también genera disfunción endotelial en aorta de ratón, probablemente a través de una reducción de la biodisponibilidad de NO como consecuencia del estrés oxidativo inducido por IL-1 $\beta$ . Cabe destacar que todos estos procesos están implicados en las alteraciones vasculares que se observan en patologías como la hipertensión, la aterosclerosis, las enfermedades renales o la diabetes (Briones *et al.*, 2005; Clempus and



Griendling, 2006; Jiménez-Altayó *et al.*, 2006; Vokurkova *et al.*, 2007; Badran *et al.*, 2020; Mai and Liao, 2020; Griendling *et al.*, 2021; Melton and Qiu, 2021).

## 2. PARTICIPACIÓN LA VÍA DE TLR4 EN EL EFECTO PROINFLAMATORIO DE IL-1 $\beta$

Los receptores TLR juegan un papel importante en la respuesta inmune innata. Entre ellos, el receptor TLR4, presente en células del sistema inmune, pero también en células del sistema cardiovascular, reconoce LPS y otras DAMP (Vaure and Liu, 2014; Nunes *et al.*, 2019; Ciesielska *et al.*, 2021). Se ha descrito, además, que este receptor contribuye a la disfunción endotelial y el remodelado vascular asociados a patologías cardiovasculares como la diabetes, la hipertensión y la aterosclerosis, a través de la inducción de vías de señalización proinflamatorias en las cuales, en muchos casos, está implicado el estrés oxidativo (den Dekker *et al.*, 2010; De Batista *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2014b; Hernanz *et al.*, 2015; de Oliveira and Nunes, 2021; Qi *et al.*, 2021). TLR4 activa dos vías de señalización, la vía dependiente de MyD88 y la vía independiente de MyD88 o dependiente de TRIF, que finalmente dan lugar a la expresión y activación de citoquinas proinflamatorias, la liberación de péptidos antimicrobianos, la producción de ROS y especies reactivas de nitrógeno y la maduración de las células presentadoras de antígeno del sistema inmune (Abreu and Arditi, 2004; Kawai and Akira, 2007). En los últimos años se ha sugerido la existencia de una posible conexión entre TLR4 y la citoquina IL-1 $\beta$ . Así, las vías de señalización de TLR4 y de IL-1 $\beta$  convergen en la activación de la proteína adaptadora MyD88 (Gay *et al.*, 2014; Dinarello, 2018; Abbate *et al.*, 2020). Además, se ha descrito que IL-1 $\beta$  puede activar la vía de señalización TLR4/NF- $\kappa$ B, tanto la dependiente como la independiente de MyD88 (Liu *et al.*, 2014; Gu *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2020), activación que desaparece al inhibir TLR4 (Liu *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2020). Por ello, nuestro siguiente objetivo de la Tesis Doctoral se centra en estudiar la posible participación de TLR4 en los efectos inducidos por IL-1 $\beta$ . Los trabajos de Liu *et al.* (2014) y Gu *et al.* (2017) describieron un aumento en la expresión de TLR4 en condrocitos humanos tratados con la citoquina IL-1 $\beta$ ; sin embargo, Chen *et al.* (2013) no observaron cambios en la expresión del receptor tras la estimulación con esta citoquina y Visintin *et al.* (2006) describieron en macrófagos que, aunque TLR4 se expresa de manera constitutiva en la membrana celular y es funcional, no se activa hasta que no se produce la interacción entre MD2 y LPS. En nuestro trabajo observamos que IL-1 $\beta$  no modificó la expresión del receptor TLR4 en las CMLV de ratón, aunque sí aumentó la expresión de la proteína adaptadora MyD88, efecto que se previno con el inhibidor de TLR4 CLI-095. Este fármaco se une al dominio intracelular de TLR4 bloqueando así su interacción con las proteínas adaptadoras y, por lo tanto, inhibiendo su señalización (Matsunaga *et al.*, 2011; Ono *et al.*, 2020). Por ello, nuestros resultados sugieren que la vía de señalización TLR4/MyD88 es activada por la citoquina IL-1 $\beta$  en CMLV.

Es conocido que la activación de TLR4 estimula la producción de ROS, las cuales, a su vez, están implicadas en la activación de mediadores inflamatorios (Asehnoune *et al.*, 2004; Hernanz *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2019). Además, TLR4 da lugar a la activación de las MAPK y de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1 (Kawai and Akira, 2007; Roy *et al.*, 2016), mecanismo por el cual puede inducir la expresión de diversos mediadores proinflamatorios, entre ellos COX-2 (Küper *et al.*, 2012; Yoon and Park, 2021). Confirmando estos efectos de TLR4, en CMLV de ratón LPS

aumentó la actividad de la NADP(H) oxidasa y la producción de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$ , estimuló la translocación al núcleo de la subunidad de AP-1 p-c-Jun e indujo la expresión de COX-2. Además, aunque LPS no modificó la expresión de TLR4, incrementó la expresión de MyD88, sugiriendo la activación de esta vía de señalización y su posible participación en los efectos inducidos por la endotoxina. Puesto que, como hemos indicado, IL-1 $\beta$  activa la vía de señalización TLR4/MyD88 en CMLV de ratón, estudiamos si esta vía participa en el estrés oxidativo y en la activación de la vía MAPK/AP-1/COX-2 que produce la citoquina proinflamatoria. Nuestros resultados muestran que el aumento en la producción de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  inducido por IL-1 $\beta$  en las CMLV era prevenido por el inhibidor de TLR4 CLI-095. Además, la inhibición de TLR4 redujo la fosforilación de JNK, la translocación al núcleo de p-c-Jun, así como la expresión de COX-2 estimulada por IL-1 $\beta$ . Todos estos resultados indican que TLR4 participa en el estrés oxidativo y en la activación de la vía MAPK/AP-1/COX-2 que induce IL-1 $\beta$  en las CMLV de ratón.

Se ha descrito que la activación de TLR4 induce migración y proliferación celular (Yang *et al.*, 2014a; Zhu *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2021; Miyabe *et al.*, 2022); de acuerdo con esto, en este trabajo LPS estimuló la migración y la proliferación de las CMLV de ratón. Además, se ha sugerido que TLR4 participa en el aumento de estos procesos celulares inducido por diversos estímulos inflamatorios. Así, la inhibición de TLR4 o la reducción de su expresión disminuyen la migración y la proliferación celular inducidas por estímulos tales como PDGF o TNF- $\alpha$  (Pi *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2021), LPS (Zhang *et al.*, 2011) y Ang II (De Batista *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2021; Qi *et al.*, 2021); este efecto contribuiría a explicar el efecto beneficioso del bloqueo de TLR4 sobre el remodelado vascular descrito en ratones hipertensos por infusión con Ang II (Hernanz *et al.*, 2015). Aquí nosotros observamos que la inhibición de TLR4 con CLI-095 reducía tanto la proliferación como la migración celular inducidas por IL-1 $\beta$  en las CMLV, confirmando la participación de la vía de TLR4 en estos efectos de la citoquina.

Nuestro grupo y otros autores hemos descrito los efectos beneficiosos de la inhibición de TLR4 sobre la disfunción endotelial observada en modelos de hipertensión (De Batista *et al.*, 2014; Hernanz *et al.*, 2015), aterosclerosis (Chen *et al.*, 2020) y diabetes (Romacho *et al.*, 2020). En este estudio, confirmamos que el inhibidor de TLR4 CLI-095 prevenía los efectos deletéreos de IL-1 $\beta$  sobre la relajación dependiente de endotelio en aortas de ratón, sin afectar a la contractilidad vascular. Aunque no hemos analizado los mecanismos implicados, la reducción del estrés oxidativo tras la inhibición de TLR4 podría contribuir a explicar este efecto, como se ha demostrado en la disfunción vascular asociada a la hipertensión inducida por Ang II (Hernanz *et al.*, 2015).

En conjunto, todos estos resultados indican que los efectos de la citoquina IL-1 $\beta$  están mediados, al menos en parte, por la activación de la vía de TLR4 y revelan la existencia de una interacción entre IL-1 $\beta$  y TLR4, describiendo así un nuevo mecanismo por el que estas vías podrían estar ejerciendo sus efectos proinflamatorios. Sin embargo, desconocemos los mecanismos implicados en esta interacción. Es posible que alguna molécula, cuya expresión sea inducida por IL-1 $\beta$ , interactúe con el receptor de membrana TLR4. En este sentido, se ha descrito que la DAMP HMGB1 es inducida por estímulos inflamatorios como IL-1 $\beta$  o TNF- $\alpha$ , siendo liberada al medio extracelular donde actúa como mediador proinflamatorio (Cai *et al.*, 2015). HMGB1 es secretada principalmente por las células del sistema inmune, pero también puede ser secretada por las células la pared vascular como las células endoteliales o las CMLV (Porto *et al.*, 2006; Cai

*et al.*, 2015). HMGB1 puede interactuar con TLR4 actuando como ligando endógeno de este receptor y desencadenar la respuesta inflamatoria (Cai *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2015b). Así, en CMLV, a través de su interacción con TLR4, HMGB1 participa en la inducción de la inflamación (Kim *et al.*, 2018) y en la regulación de la modulación fenotípica de estas células, induciendo la migración y la proliferación de las mismas (Wang *et al.*, 2017). Este mecanismo se ha asociado también al remodelado vascular (Zabini *et al.*, 2015). Por todo esto, HMGB1 podría actuar como nexo entre la señalización mediada por IL-1 $\beta$  y TLR4 en nuestros experimentos.

### 3. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 POR IL-1 $\beta$

#### 3.1. EFECTO DE IL-1 $\beta$ SOBRE LA VÍA DE Nrf2 Y PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO

Es bien conocido que un exceso en la producción de ROS conduce a la ruptura del equilibrio redox y da lugar a daños y a alteraciones moleculares (Clempus and Griendling, 2006; Senoner and Dichtl, 2019; Griendling *et al.*, 2021). Para contrarrestar niveles excesivos de ROS que generan estrés oxidativo, las células disponen de diversos mecanismos antioxidantes, siendo el factor de transcripción redox-sensible Nrf2 uno de ellos. Nrf2 protege frente al estrés oxidativo al inducir la expresión de proteínas antioxidantes y enzimas detoxificantes en respuesta a cambios en el balance redox intracelular (Yamamoto *et al.*, 2018). Entre las proteínas activadas por Nrf2 destacan enzimas de detoxificación de fase II como NQO1, proteínas de respuesta a estrés como HO-1, y enzimas antioxidantes como TRx, SOD1, SOD2, GPx y catalasa, entre otras (Yamamoto *et al.*, 2018; Drummond *et al.*, 2019; He *et al.*, 2020; Lee and Hu, 2020). Debido a ese papel clave defensivo, la activación de Nrf2 podría constituir un mecanismo beneficioso frente a las alteraciones que tienen lugar en las patologías cardiovasculares que presentan un importante componente oxidante e inflamatorio (Mimura and Itoh, 2015; Satta *et al.*, 2017; Da Costa *et al.*, 2019; Robledinos-Antón *et al.*, 2019; Tanase *et al.*, 2019). Así por ejemplo, la activación de Nrf2, a través de la reducción del estrés oxidativo, mejora la disfunción endotelial inducida por Ang II en ratas SHR-SP (Lopes *et al.*, 2015) y previene el remodelado vascular y la disfunción vascular en el modelo de hipertensión inducida por Ang II en ratones (Wang *et al.*, 2018). Asimismo, se ha descrito que la activación de Nrf2 tiene un papel protector frente a las alteraciones vasculares asociadas a la diabetes (Alves-Lopes *et al.*, 2016) y que reduce la síntesis de ácidos grasos y previene la obesidad en ratones tratados con dieta alta en grasa (Shin *et al.*, 2009). Por otra parte, la activación de la enzima regulada por Nrf2 HO-1, que incrementa la producción del antioxidante bilirrubina y del vasodilatador CO (Drummond *et al.*, 2019), también ha demostrado tener efectos beneficiosos. Así, se ha descrito que la inducción específica a nivel renal de HO-1 protege frente al desarrollo de hipertensión inducida por Ang II en ratones (Vera *et al.*, 2008) y que resveratrol, a través de la inducción de HO-1, reduce la disfunción endotelial observada en ratas diabéticas (Hammad *et al.*, 2019). Además, se ha observado un efecto protector de la sobreexpresión de HO-1 en lesiones ateroscleróticas (Yao *et al.*, 2022), mientras que la inhibición de esta enzima resultó en la progresión de aterosclerosis (Yet *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2012). Por otra parte, en cultivos celulares se ha mostrado que la activación de Nrf2/HO-1 reduce los niveles de los mediadores proinflamatorios MCP-1, ICAM-1 y VCAM-1 inducidos por ox-LDL en células endoteliales vasculares (Zhang *et al.*, 2013a), así como la

liberación de MCP-1 y el estrés oxidativo inducidos por ox-LDL en macrófagos (Orozco *et al.*, 2007).

A continuación, analizamos el efecto de la citoquina IL-1 $\beta$  sobre la activación de Nrf2. Nuestros resultados mostraron que IL-1 $\beta$  inducía un aumento en la translocación al núcleo de Nrf2, así como en la expresión de algunas de las proteínas reguladas por este factor de transcripción como HO-1, NQO1, SOD1 y SOD2 en las CMLV de ratón. Paralelamente, observamos que IL-1 $\beta$  reducía la expresión de Keap1, el regulador negativo de Nrf2 (Dinkova-Kostova *et al.*, 2017). Como se ha indicado en la introducción, la vía canónica de activación de Nrf2 implica la modificación por el estrés oxidativo o los compuestos electrófilos de residuos de cisteína en Keap1, induciendo un cambio conformacional en el mismo, que da lugar a su inhibición y que permite la translocación de Nrf2 al núcleo, donde interacciona con el ADN y regula la expresión de sus proteínas diana (Dinkova-Kostova *et al.*, 2017; Baird and Yamamoto, 2020; Crisman *et al.*, 2023). Además, se ha descrito que el estrés oxidativo puede activar a la proteína adaptadora de la autofagia p62/SQSTM1, la cual interacciona directamente con Keap1 transportándolo a los autofagosomas para su degradación, e inhibiendo de manera competitiva la unión de Keap1 con Nrf2 (Jiang *et al.*, 2015; Baird and Yamamoto, 2020; Liu *et al.*, 2022). En este sentido, Yin and Cao (2015) observaron que la reducción de la expresión de Keap1 en células estimuladas con LPS se debe a la activación de la autofagia mediada por la activación de p62/SQSTM1. Este mecanismo podría explicar la disminución en la expresión de Keap1 que nosotros observamos en las CMLV de ratón estimuladas con IL-1 $\beta$ .

Además de la vía canónica de activación anteriormente indicada, la activación del factor de transcripción Nrf2 también puede estar regulada por otros mecanismos, entre los que destaca la regulación postraduccional de Nrf2 por fosforilación llevada a cabo por diversas quinasas como PKC (Huang *et al.*, 2002) o MAPK (Vari *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2016; Tonelli *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2021), que interrumpe la interacción entre Keap1 y Nrf2. La fosforilación de Nrf2 puede, además, aumentar la estabilidad de este factor de transcripción, probablemente a través del bloqueo de los sitios de unión de los complejos ubiquitina ligasa, favoreciendo así la activación del mismo (Nguyen *et al.*, 2003). De acuerdo con esto, nosotros observamos que IL-1 $\beta$  inducía la fosforilación de Nrf2 en las CMLV de ratón, debida, al menos en parte, al efecto de JNK, ya que la inhibición de esta MAPK con SP600125 revertía esta fosforilación.

Una vez demostrada la capacidad de IL-1 $\beta$  para activar Nrf2, analizamos la participación de ROS en dicha activación. Observamos que tanto apocinina como catalasa prevenían el aumento en la translocación nuclear de Nrf2 inducido por IL-1 $\beta$  en las CMLV. Además, apocinina abolió el incremento de la expresión de las proteínas diana de Nrf2 HO-1 y SOD2, lo que sugiere la participación del estrés oxidativo en la activación de este factor de transcripción por la citoquina. En este sentido, Khan *et al.* (2018) observaron que IL-1 $\beta$ , a través del aumento en la producción de ROS por activación de la enzima NAD(P)H oxidasa, induce la activación de Nrf2 en condrocitos humanos. Apoyando el papel del estrés oxidativo en la activación de la vía de Nrf2, observamos que la adición exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estimulaba la translocación al núcleo de Nrf2, inducía la fosforilación de este factor de transcripción y aumentaba la expresión de HO-1 y NQO1 en CMLV de ratón.

Todos estos resultados indican que IL-1 $\beta$  activa al factor de transcripción Nrf2, estimulando la expresión de diversas enzimas antioxidantes, lo que podría explicarse como un mecanismo de defensa de las CMLV frente a los efectos deletéreos prooxidantes de la propia citoquina. En este sentido, nosotros y otros autores hemos descrito la capacidad de diversos estímulos, entre ellos IL-1 $\beta$  y LPS, para aumentar la expresión de mecanismos antioxidantes tales como SOD y TRx (Hernanz *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2007; Martín *et al.*, 2012).

Puesto que, como hemos comprobado, la vía de señalización de TLR4 está implicada en diversos efectos de IL-1 $\beta$ , analizamos si este receptor también participaba en la activación de Nrf2 por la citoquina. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento de las CMLV con el inhibidor farmacológico de TLR4 CLI-095 abolía tanto la fosforilación de Nrf2 como la expresión de HO-1 y SOD2 estimuladas por IL-1 $\beta$ . Uno de los mecanismos mediante los cuales TLR4 podría participar en la activación de Nrf2 por fosforilación podría ser a través de JNK, ya que, como hemos comentado previamente, TLR4 participa en la activación de JNK inducida por IL-1 $\beta$ , y esta MAPK está implicada en la fosforilación de Nrf2 inducida por la citoquina en las CMLV de ratón. Más adelante se discutirán en detalle los mecanismos por los que la estimulación de la vía de TLR4 puede activar Nrf2.

### 3.2. EFECTO PROTECTOR DE LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 POR IL-1 $\beta$

Una vez demostrado que IL-1 $\beta$  activa la vía de Nrf2, a continuación, analizamos el papel de esta vía en los efectos inducidos por la citoquina proinflamatoria. Para ello utilizamos brusatol, un inhibidor farmacológico de Nrf2 que reduce los niveles de este factor de transcripción promoviendo su ubiquitinación y la subsecuente degradación por la vía del proteasoma (Ren *et al.*, 2011). A este respecto, observamos que el tratamiento de las CMLV de ratón con brusatol redujo el aumento inducido por IL-1 $\beta$  de la expresión de Nrf2 y de la fosforilación de este factor de transcripción, así como de la expresión de HO-1, sin producir ningún efecto en ausencia de IL-1 $\beta$ . Además, brusatol revirtió la disminución de la expresión del regulador negativo de Nrf2 Keap1 inducida por esta citoquina. En este sentido, Ren *et al.* (2011) también describieron que brusatol producía una disminución en la ubiquitinación de Keap1 y, por lo tanto, una reducción en la degradación de este. Todos estos resultados confirman el efecto de este fármaco inhibiendo la vía de Nrf2.

A continuación, estudiamos el papel de la activación de Nrf2 en los efectos inflamatorios de IL-1 $\beta$ . En CMLV de ratón, observamos que el tratamiento de las CMLV con brusatol potenció el aumento de la fosforilación de las MAPK p38 y JNK inducido por IL-1 $\beta$ , lo que indica que Nrf2 está modulando a la baja la activación de estas quinasas. En el mismo sentido, brusatol potenció el aumento en la tasa de migración de las CMLV inducido por IL-1 $\beta$ . Estudios previos han descrito un papel protector del factor de transcripción Nrf2 frente a los efectos negativos causados por estímulos inflamatorios. Así, la inhibición de Nrf2 con brusatol aumenta los niveles de marcadores proinflamatorios y el estrés oxidativo en células endoteliales estimuladas con ox-LDL (Lin *et al.*, 2021). Por otra parte, el silenciamiento de Nrf2 en una línea celular de condrocitos humanos aumentó los efectos dañinos de IL-1 $\beta$ , como son el aumento de los niveles de marcadores proinflamatorios o de la apoptosis, efectos que se reducían cuando estas células eran tratadas con un activador de Nrf2 (Jiang and Cai, 2021). Asimismo, el silenciamiento de Nrf2 en monocitos/macrófagos inhibió la expresión de las enzimas HO-1 y NQO1 inducidas por

LPS y potenció la producción de mediadores proinflamatorios como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Rushworth *et al.*, 2005; 2008). Sin embargo, respecto a la migración celular se han descrito efectos contradictorios. Por un lado, la inhibición de Nrf2 con brusatol en células cancerígenas de pulmón redujo la migración celular que estaba aumentada por sobreexpresión de Nrf2 (Ko *et al.*, 2021). Algo similar describieron Hallis *et al.* (2023) en células de cáncer colorrectal, donde la sobreexpresión del factor de transcripción aumentaba el crecimiento y la migración de las células tumorales, en las cuales tanto la inhibición de Nrf2 con brusatol como su silenciamiento redujeron estos procesos celulares. Por el contrario, Xue *et al.*, (2016) observaron que el aumento de expresión de Nrf2 en células de cáncer de próstata reducía la migración celular, mientras que su silenciamiento la aumentaba.

En conjunto, de estos resultados sugerimos que la activación del factor de transcripción Nrf2 por IL-1 $\beta$  actuaría como un mecanismo compensatorio frente a los efectos deletéreos de la citoquina que observamos en las CMLV de ratón.

#### 4. MODULACIÓN DE LOS EFECTOS PROOXIDANTES Y PROINFLAMATORIOS DE IL-1 $\beta$ POR LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 POR tBHQ

tBHQ es un compuesto fenólico sintético ampliamente utilizado como activador selectivo de Nrf2 (Shi *et al.*, 2016; Bai *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019). Su mecanismo de acción incluye, entre otros, la modificación covalente del residuo Cys151 de Keap1, que induce un cambio conformacional en el mismo y origina su disociación de Nrf2 inhibiendo su degradación (Zhang and Hannink, 2003). También se ha descrito que tBHQ puede activar Nrf2 por inducir la ubiquitinación y posterior degradación de Keap1 (Zhang *et al.*, 2005). Como cabía esperar, tras el tratamiento de las CMLV con tBHQ se observó un aumento en la expresión de Nrf2, efecto que fue prevenido por brusatol. Consecuentemente, tBHQ también incrementó los niveles de HO-1, NQO1, SOD1 y SOD2 mientras que redujo la expresión de Keap1. Todos estos resultados confirman la activación del factor de transcripción por tBHQ. Aunque tBHQ también podría activar a Nrf2 mediante su fosforilación (Gharavi *et al.*, 2007), el tratamiento de las CMLV con tBHQ no afectó a la fosforilación de Nrf2, descartando este mecanismo.

A continuación, comprobamos si la activación de Nrf2 por tBHQ modulaba los efectos de IL-1 $\beta$  sobre la propia vía de Nrf2. En este sentido, observamos que el tratamiento de las CMLV con IL-1 $\beta$  en presencia de tBHQ indujo un aumento en la expresión nuclear de Nrf2 y en la expresión de las enzimas HO-1 y NQO1, que fue mayor al inducido por IL-1 $\beta$ , pero similar al inducido por el activador solo. Además, el tratamiento de las CMLV con tBHQ e IL-1 $\beta$  redujo la expresión de Keap1 al mismo nivel que lo hacían IL-1 $\beta$  y tBHQ por si solos. Esto sugiere que los efectos observados aquí se deben principalmente a la acción del tBHQ, descartando un efecto sumatorio de la co-estimulación con IL-1 $\beta$  y tBHQ. Del mismo modo, los efectos observados de la estimulación de las CMLV con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de tBHQ sobre la translocación al núcleo de Nrf2 y la expresión de HO-1 y NQO1 fueron similares a los provocados por tBHQ solo, lo que sugiere que la activación de la vía de Nrf2 se debe principalmente a la acción del activador. Resultados similares fueron observados por Sharma *et al.* (2007) al estudiar la expresión de TRx

en astrocitos co-estimulados con IL-1 $\beta$  y quercetina. Sin embargo, tBHQ inhibió el incremento en la expresión de SOD2 inducido por IL-1 $\beta$ , lo que sugiere que la expresión de esta enzima puede estar regulada por otros mecanismos. En este sentido, se ha descrito la participación de JNK en la regulación de SOD2, de manera que tanto el silenciamiento de esta quinasa como su inhibición farmacológica con SP600125 reducen la transcripción de SOD2 (Liu *et al.*, 2020). Esto, junto con el hecho de que, como mencionaremos más adelante, tBHQ reducía el aumento en la fosforilación de JNK inducido por IL-1 $\beta$  en las CMLV de ratón, podría contribuir a explicar el efecto de este activador de Nrf2 sobre SOD2.

Por otro lado, a pesar de que tBHQ por sí solo no modificaba la fosforilación de Nrf2, el pretratamiento de las CMLV con tBHQ redujo la fosforilación de este factor de transcripción inducida tanto por IL-1 $\beta$  como por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este efecto de tBHQ también podría estar relacionado con el hecho de que tBHQ aboliese el aumento de la fosforilación de las MAPK p38 y JNK inducido por la citoquina, las cuales, como se ha comentado, participan en la fosforilación de Nrf2 (Vari *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2021).

Dado el efecto antioxidante de Nrf2, es lógico pensar que los activadores de este factor de transcripción como tBHQ ejercen sus efectos protectores a través de la reducción del estrés oxidativo. Así, Wei *et al.* (2019) observaron que la activación por tBHQ de Nrf2 y de sus proteínas diana HO-1 y NQO1 protegía, a través de la reducción de la producción de ROS, frente a la calcificación de las CMLV inducida por niveles elevados de fosfato. También el tratamiento con tBHQ, mediante la activación de la vía Nrf2/HO-1 y la reducción del estrés oxidativo, atenúa la hipertensión en ratas SHR (Bai *et al.*, 2017) y proporciona protección frente a la aterosclerosis (Lazaro *et al.*, 2018). Además, Sun *et al.* (2021) observaron que la activación de Nrf2 posee un efecto antiartrítico por reducir el aumento de la producción de ROS inducido por IL-1 $\beta$  en condrocitos. De acuerdo con esto, nuestros resultados muestran que tBHQ revirtió el incremento de la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa y de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducidas por IL-1 $\beta$  en las CMLV de ratón. Asimismo, tBHQ también inhibió el aumento de la actividad NAD(P)H oxidasa y de la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> provocado por la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en estas células. Sin embargo, en situación control, donde no hay un exceso de ROS, tBHQ no modificó ni la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa ni la producción de ROS. El conjunto de estos resultados sugiere un papel protector de la activación de Nrf2 frente a los efectos prooxidantes de IL-1 $\beta$  y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en estas células.

Además de un efecto protector frente al estrés oxidativo, Nrf2 también posee propiedades antiinflamatorias (Muri *et al.*, 2020; Alonso-Piñeiro *et al.*, 2021). Así, se ha descrito que la activación de Nrf2 inhibe al factor de transcripción proinflamatorio NF- $\kappa$ B (Ahmed *et al.*, 2017). Asimismo, la activación de Nrf2 por exposición a corto plazo a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduce la producción de ROS y la expresión de mediadores proinflamatorios como NF- $\kappa$ B y COX-2 estimulados por IL-1 $\beta$  en células endoteliales humanas (Toniolo *et al.*, 2015). La activación de la vía de Nrf2/HO-1 también reduce el aumento de la expresión de las enzimas proinflamatorias COX-2 e iNOS y de los niveles de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 observado en CMLV y macrófagos expuestos a diversos estímulos inflamatorios, tales como la propia IL-1 $\beta$  o LPS (Ho *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2018). Asimismo, sulforafano, un potente activador de Nrf2, reduce la inducción de COX-2 e iNOS tras la estimulación con LPS mediante la reducción de la fosforilación de las MAPK, principalmente JNK, y la inhibición de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1 (Subedi *et al.*,

2019). Además, se ha descrito que la activación de Nrf2 también reduce la fosforilación de JNK y de c-Jun y la expresión de COX-2 e iNOS en condrocitos murinos estimulados con IL-1 $\beta$  (Sun *et al.*, 2021). Por otra parte, tBHQ reduce los elevados niveles de IL-1 $\beta$  e IL-6 e inhibe la activación de NF- $\kappa$ B en un modelo de hipertensión inducida por una dieta rica en sal (Bai *et al.*, 2017). Por todo ello, a continuación, analizamos la modulación por la activación de Nrf2 de los efectos proinflamatorios inducidos por la citoquina IL-1 $\beta$ . En este sentido, tBHQ redujo el aumento de expresión de la proteína adaptadora de TLR4 MyD88, así como el aumento en la fosforilación de las MAPK p-38 y JNK inducidos por IL-1 $\beta$  en las CMLV de ratón. Además, el activador de Nrf2 redujo la expresión nuclear de la subunidad p-c-Jun del factor de transcripción AP-1. Dada la contribución de AP-1 y JNK a la inducción de COX-2 inducida por IL-1 $\beta$ , tBHQ redujo también la expresión de dicha enzima. Estos resultados apuntan que la activación de Nrf2 con tBHQ revierte la activación de la vía TLR4/MAPK/AP-1/COX-2 inducida por IL-1 $\beta$  en CMLV, lo que sugiere un papel protector de Nrf2 frente a los efectos proinflamatorios de esta citoquina.

Además de los mencionados efectos antioxidantes y antiinflamatorios, la activación de Nrf2 con tBHQ redujo la migración y la proliferación inducidas por IL-1 $\beta$  en CMLV. De acuerdo con esto, otros estudios han demostrado que la inducción de enzimas reguladas por Nrf2 como HO-1 y NQO1 inhibe la proliferación y la migración celular (Duckers *et al.*, 2001; Ashino *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2015; Jiang *et al.*, 2022). Como hemos comentado previamente, las ROS están implicadas en el aumento en la proliferación y la migración de las CMLV estimuladas con IL-1 $\beta$ , por lo que la reducción del estrés oxidativo podría ser uno de los mecanismos implicados en la regulación de estos procesos por tBHQ. Apoyando este argumento, observamos que tBHQ también reducía la migración de las CMLV inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por otro lado, es conocido que la inflamación también contribuye a los procesos de migración y proliferación celular. En este sentido, se ha observado que la activación del inflammasoma NLRP3 en respuesta a NF- $\kappa$ B contribuye a la proliferación de las CMLV y al remodelado vascular en hipertensión (Sun *et al.*, 2017) y que la inhibición de la vía de TLR4 reduce la proliferación de las CMLV y el remodelado vascular inducidos por Ang II (Huang *et al.*, 2021). Por lo tanto, el efecto antiinflamatorio de la activación de Nrf2 también podría estar participando en la reducción de la migración y proliferación celular inducida por tBHQ en CMLV de ratón estimuladas con IL-1 $\beta$ .

Por último, analizamos la modulación por tBHQ del efecto de IL-1 $\beta$  sobre la función vascular. Como hemos descrito anteriormente, IL-1 $\beta$  inducía disfunción endotelial en aorta de ratón, probablemente por incrementar el estrés oxidativo. En este efecto de IL-1 $\beta$  participaba, además, la vía de TLR4. Ahora observamos que la activación de Nrf2 por tBHQ redujo la disfunción endotelial inducida por IL-1 $\beta$ , sin alterar la contractilidad vascular. Esto sugiere un efecto protector de la activación de Nrf2 frente a la disfunción endotelial, que posiblemente se deba a los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de este factor de transcripción. Consistente con esto, otros autores han descrito que tBHQ y sulforafano mejoraban la disfunción endotelial inducida por Ang II a través de la reducción del estrés oxidativo (Lopes *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018). También se ha descrito que la activación de Nrf2, a través de sus efectos antiinflamatorios, protege frente a la disfunción endotelial inducida por LPS (Gao *et al.*, 2019). Además, la sobreexpresión de HO-1 en las células del endotelio vascular atenúa, de manera significativa, la producción de mediadores proinflamatorios y mejora las respuestas vasodilatadoras alteradas por ox-LDL en segmentos aórticos (Kawamura *et al.*, 2005).



En resumen, todos estos resultados describen un papel protector del activador del factor de transcripción Nrf2 frente a los efectos prooxidantes y proinflamatorios inducidos por IL-1 $\beta$ , así como frente a la migración y la proliferación celular y la disfunción endotelial inducidas por esta citoquina. Estos efectos podrían ser debidos a la acción antioxidante y antiinflamatoria de este factor de transcripción.

## 5. MODULACIÓN DEL EFECTO PROINFLAMATORIO DE LPS POR LA ACTIVACIÓN DE Nrf2 POR tBHQ

El LPS, componente principal de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, es el ligando principal del receptor TLR4 y contribuye a la respuesta inflamatoria a través de la inducción de la expresión de mediadores proinflamatorios (Stoll *et al.*, 2006; Kawai and Akira, 2007; Küper *et al.*, 2012; Nunes *et al.*, 2019) y de la producción de ROS (Asehnoune *et al.*, 2004; Hernanz *et al.*, 2004). De acuerdo con esto, ya hemos comentado que la activación de la vía de TLR4 participa en la producción de ROS y la inducción de la expresión de mediadores inflamatorios estimulados por IL-1 $\beta$  en las CMLV. Además, la vía de TLR4 participa en la activación de Nrf2 por esta citoquina. En base a esto, en primer lugar, analizamos el efecto de la activación de TLR4 sobre la vía de Nrf2. Los resultados mostraron que el tratamiento de las CMLV con LPS induce un aumento de la expresión nuclear del factor de transcripción Nrf2, así como de la expresión de las enzimas reguladas por este factor, HO-1 y NQO1. LPS también aumentó la fosforilación de Nrf2, mientras que redujo la expresión de Keap1 en estas células, lo que, como ya hemos comentado, favorece la activación del factor de transcripción. Estos resultados sugieren que LPS, al igual que vimos con IL-1 $\beta$ , podría estar activando Nrf2 como un mecanismo de defensa frente a los efectos deletéreos provocados por la endotoxina. Por el contrario, otros autores como Zhang *et al.* (2021) y Kang *et al.* (2022) describieron una disminución de los niveles de Nrf2 en respuesta a la inflamación generada por el tratamiento con LPS en ratones; en estos trabajos, el uso de diferentes compuestos antioxidantes que aumentan la expresión y la activación de Nrf2 protege frente a la inflamación inducida por la endotoxina. Sin embargo, y en línea con nuestros resultados, Vijayan *et al.* (2011) describieron que la activación de HO-1 tras la estimulación de TLR4 con LPS en macrófagos estaba mediada por la activación de Nrf2. También en estas células se ha observado que LPS induce las enzimas HO-1 y NQO1 a través de la activación de Nrf2 (Rushworth *et al.*, 2005; 2008; Park *et al.*, 2021).

A continuación, analizamos la modulación de los efectos de LPS tras la activación de Nrf2 con tBHQ y encontramos que el tratamiento con tBHQ de células estimuladas con LPS aumentaba la expresión nuclear de Nrf2 y la expresión de las enzimas HO-1 y NQO1, un efecto que fue mayor al inducido por LPS, pero similar al inducido por tBHQ solo, lo que descarta un efecto sumatorio de ambos estímulos. Adicionalmente, tBHQ redujo la expresión proteica de Keap1 al mismo nivel que la reducían LPS y tBHQ solos. Sin embargo, tBHQ redujo la fosforilación de Nrf2 inducida por LPS en CMLV. Aunque no hemos investigado el mecanismo por el cual ocurre este efecto, la inhibición de las MAPK producida por tBHQ podría explicarlo. En este sentido, Khodagholi and Tusi (2011) observaron en células de feocromocitoma de rata que tBHQ, a través de la inhibición de las MAPK, reducía la apoptosis inducida por LPS.

Se ha descrito que la activación de Nrf2 también puede contrarrestar los efectos prooxidantes y proinflamatorios de LPS (Mohan and Gupta, 2018). En este sentido, la activación de Nrf2 por compuestos como la quercetina o el derivado de los ácidos grasos omega 3 maresina 1, reduce el estrés oxidativo generado por LPS en diferentes tipos celulares (Li *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2022). De acuerdo con esto, en las CMLV de ratón tBHQ redujo la actividad NAD(P)H oxidasa y la producción tanto de  $O_2^{\cdot-}$  como de  $H_2O_2$  inducidas por LPS. Además, y de acuerdo con la participación de ROS en la inducción de la expresión de COX-2 por LPS (Feng *et al.*, 1995; Peng *et al.*, 2005), observamos que el pretratamiento con tBHQ de CMLV estimuladas con LPS también abolió el aumento de expresión de COX-2. En este sentido, se ha descrito que la activación de Nrf2 por tBHQ, a través de la reducción del estrés oxidativo, disminuye la expresión de COX-2 en células de feocromocitoma estimuladas con LPS (Khodagholi and Tusi, 2011). Asimismo, sulforafano, también reduce la expresión de enzimas proinflamatorias como COX-2 e iNOS inducida por la endotoxina (Subedi *et al.*, 2019). Por otra parte, en nuestro estudio encontramos que tBHQ reducía la aumentada expresión de MyD88 observada en las CMLV estimuladas con LPS, lo que puede contribuir al efecto antiinflamatorio del activador de Nrf2. De acuerdo con esto, se ha observado que la activación de Nrf2/HO-1 reduce la expresión de la vía TLR4/MyD88 en macrófagos estimulados con LPS (He *et al.*, 2019), efecto que desaparece al inhibir HO-1 (Park *et al.*, 2021). Sorprendentemente, tBHQ no modificó la expresión nuclear de p-c-Jun inducida por la endotoxina, al contrario de lo descrito por Wang *et al.* (2017b) y Lin *et al.* (2020), que observaron que la activación de Nrf2 reduce la activación de factores de transcripción proinflamatorios como AP-1 y NF- $\kappa$ B. Sin embargo, como se ha comentado, tBHQ sí que redujo la inducción de COX-2 por LPS en las CMLV de ratón. En este sentido, se ha descrito que la activación de Nrf2 reduce la activación de la vía NF- $\kappa$ B/COX-2 por LPS en células gliales (Wu *et al.*, 2018) y en macrófagos (Wang *et al.*, 2021). Por ello, es necesario investigar en mayor profundidad la participación de AP-1 y NF- $\kappa$ B en la inducción de la expresión de COX-2 por LPS en las CMLV de ratón de nuestro estudio para clarificar el mecanismo de acción de tBHQ.

LPS, a través de la interacción con su receptor TLR4, puede estimular la proliferación y la migración celular (Yang *et al.*, 2014a; 2015a; Nguyen *et al.*, 2021; Miyabe *et al.*, 2022). Cuando analizamos si la activación de Nrf2 modulaba el efecto de LPS sobre estos procesos celulares en CMLV, observamos que tBHQ, si bien no modificaba la proliferación celular, inhibía el incremento de la migración inducido por LPS. En consonancia con esto, se ha descrito que la activación de Nrf2, a través de la reducción del estrés oxidativo y la inhibición de la vía MyD88/NF- $\kappa$ B, reduce el aumento de la migración de la microglía inducido por LPS (Rong *et al.*, 2022). Además, la activación de HO-1, a través de sus efectos antiinflamatorios, también reduce la migración leucocitaria inducida por la endotoxina (Konrad *et al.*, 2017). Esto sugiere que los efectos antiinflamatorios y antioxidantes de Nrf2 podrían explicar el papel protector de este factor de transcripción frente a la migración inducida por LPS en las CMLV de ratón.

En resumen, los resultados mostrados en este apartado describen un papel protector de la activación del factor de transcripción Nrf2 frente a los efectos prooxidantes y proinflamatorios inducidos por LPS.

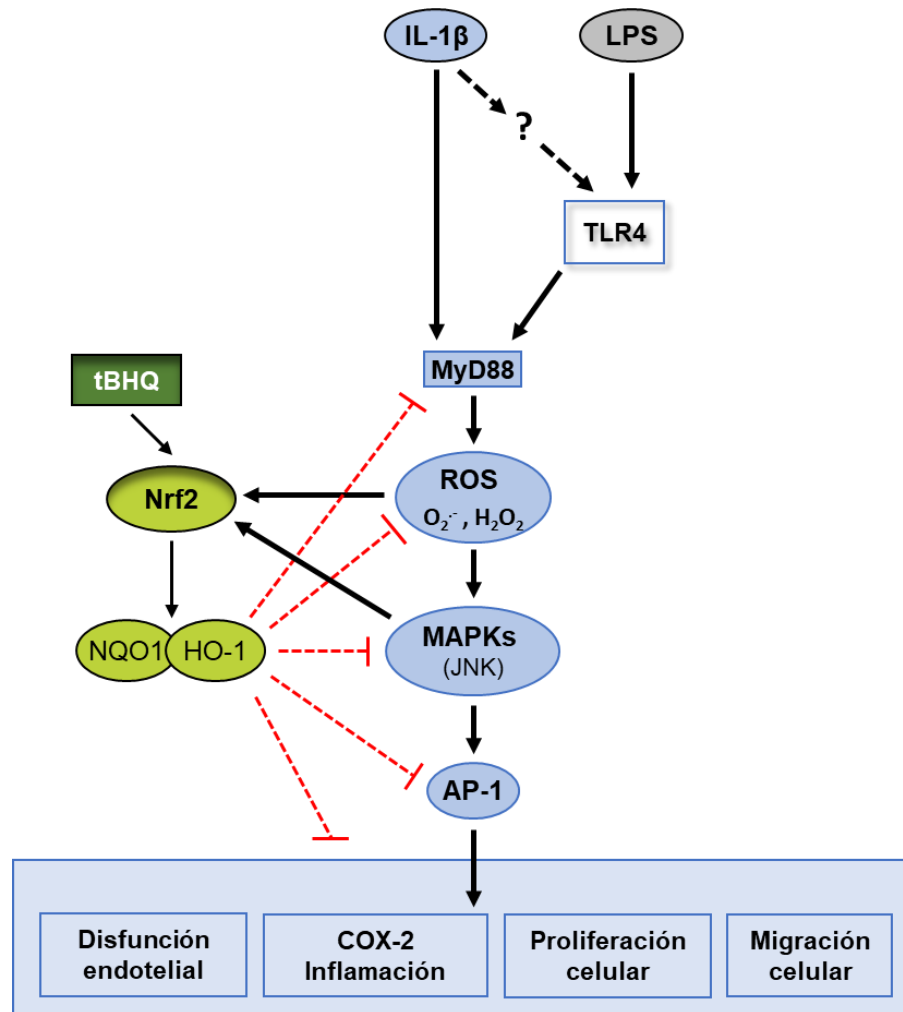
Por último, comprobamos que las concentraciones y tiempos de los estímulos utilizados a lo largo de este trabajo IL-1 $\beta$ ,  $H_2O_2$ , LPS y tBHQ, no afectaron significativamente a la viabilidad celular ni indujeron necrosis en las CMLV de aorta de ratón. Esto elimina la posibilidad de que

alguno de los efectos observados en este estudio se deba a la toxicidad de dichos estímulos. Por otra parte, IL-1 $\beta$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y LPS tampoco estimularon la apoptosis en las CMLV de ratón, aunque tBHQ sí que la redujo, lo que podría estar asociado a los efectos antioxidantes derivados de la activación del factor de transcripción Nrf2. En este sentido, se ha descrito que la activación de Nrf2 reduce la apoptosis de CMLV inducida por NO (Liu *et al.*, 2007). tBHQ también reduce la apoptosis en cardiomiocitos (Wang *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2016) y en células de feocromocitoma estimuladas con LPS (Khodaghali and Tusi, 2011).

**En resumen**, el presente estudio demuestra que la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$  induce estrés oxidativo, inflamación, un aumento en la tasa de migración y proliferación celular y disfunción endotelial, al menos en parte, a través de su interacción con la vía de señalización de TLR4, aunque el mecanismo exacto por el cual se produce esta interacción entre IL-1 $\beta$  y TLR4 requiere de más investigación; sin embargo, no podemos descartar que algunos de los efectos observados puedan también ser producidos tras la activación por IL-1 $\beta$  de su receptor IL-1R. Por otra parte, IL-1 $\beta$  activa la vía del factor de transcripción antioxidante y antiinflamatorio Nrf2, el cual ejerce un efecto protector frente a los efectos deletéreos de esta citoquina. Además, nuestros resultados también muestran que el uso de un activador de Nrf2 protege frente a los efectos prooxidantes y proinflamatorios de la citoquina IL-1 $\beta$ , lo que puede deberse, al menos en parte, a la interferencia con la vía de TLR4. Asimismo, la activación del factor de transcripción Nrf2 previene el aumento en la migración y la proliferación celular, así como la disfunción endotelial inducidos por IL-1 $\beta$ , procesos en los que está implicado el estrés oxidativo. Adicionalmente, en el presente trabajo observamos que el uso de un activador de Nrf2 previene los efectos prooxidantes y proinflamatorios inducidos por la activación de la vía TLR4/MyD88 por LPS (**Figura 119**).

Por todo ello, los resultados descritos en este trabajo permiten conocer más en profundidad los mecanismos inflamatorios de IL-1 $\beta$  en células vasculares, entre los cuales cobra importancia la participación del receptor de membrana TLR4. Además, el efecto protector de la activación de Nrf2 que observamos puede ayudar a establecer nuevas estrategias terapéuticas frente a diversas enfermedades cardiovasculares en las que la inflamación vascular juega un papel relevante. Sin embargo, se necesita una investigación más en profundidad para conocer mejor el posible uso clínico de los activadores de Nrf2 en el tratamiento de estas enfermedades.

Una de las limitaciones del estudio llevado a cabo durante esta Tesis Doctoral es el uso, en la mayor parte de los experimentos, de una línea celular. Aunque aporta información básica y de gran interés acerca de los mecanismos moleculares implicados en la señalización de Nrf2, IL-1 $\beta$  y TLR4, todos ellos relevantes en la inflamación vascular, el uso de un único tipo celular nos da una información limitada, ya que en los cultivos celulares no se producen las interacciones con otros tipos de células y/o con los diferentes tejidos y órganos, interacciones que sí se producirían en un modelo animal. Aun así, estos resultados son la base necesaria para poder llevar la investigación a otros tipos celulares y, principalmente, a modelos animales con patología cardiovascular.



**Figura 119. Esquema resumen de los resultados obtenidos en la Tesis Doctoral.** IL-1 $\beta$ , a través del aumento en el estrés oxidativo, induce inflamación, migración y proliferación celular, así como disfunción endotelial, en parte por su interacción con la vía de señalización del receptor TLR4/MyD88. La activación de Nrf2 por tBHQ protege frente a los efectos deletéreos de la citoquina y de la activación de TLR4 con LPS. AP-1: proteína activadora 1; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno; HO-1: hemoxigenasa-1; IL-1 $\beta$ : interleuquina-1 $\beta$ ; JNK: proteína quinasa el extremo N-terminal de c-Jun; LPS: lipopolisacárido bacteriano; MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos; MyD88: factor de diferenciación mieloides 88; NQO1: NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1; Nrf2: factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2; O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anión superóxido; ROS: especies reactivas de oxígeno; tBHQ: terbutilhidroquinona; TIR: dominio con homología al receptor de IL-1; TLR4: receptor de tipo toll 4.

# **CONCLUSIONES/CONCLUSIONS**



## CONCLUSIONES

1. IL-1 $\beta$ , a través de la inducción de estrés oxidativo, activa la vía de señalización inflamatoria de MAPK/AP-1/COX-2 en CMLV de aorta de ratón, y aumenta la tasa de migración y proliferación de estas células. El estrés oxidativo también podría estar implicado en la disfunción endotelial inducida por IL-1 $\beta$  en aorta de ratón.
2. La activación de la vía de señalización de TLR4/MyD88 por IL-1 $\beta$  participa en el estrés oxidativo, en la inflamación, en la migración y proliferación celular, así como en la disfunción endotelial inducida por la citoquina.
3. IL-1 $\beta$  activa el factor de transcripción Nrf2 a través de la inducción de estrés oxidativo y de la activación de la vía de señalización de TLR4. Además, la reducción de la expresión de su regulador negativo Keap1 y la fosforilación de Nrf2 por JNK contribuyen a la activación del factor de transcripción.
4. La activación del factor de transcripción Nrf2 por IL-1 $\beta$  actúa como mecanismo compensatorio frente a los efectos deletéreos de la citoquina.
5. El uso del activador farmacológico de Nrf2 tBHQ protege frente a los efectos de IL-1 $\beta$  sobre el estrés oxidativo, la inflamación, los procesos de migración y proliferación celular y la disfunción endotelial, al menos en parte, mediante la interferencia con la vía de TLR4/MyD88.
6. El ligando de TLR4 LPS activa Nrf2 por mecanismos que implican, al menos en parte, la reducción de la expresión de Keap1 y la fosforilación del factor de transcripción.
7. La activación de Nrf2 por tBHQ tiene un efecto protector frente a los efectos prooxidantes y proinflamatorios inducido por la activación de la vía TLR4/MyD88 por LPS.

El presente estudio aporta nuevos datos acerca del mecanismo proinflamatorio de IL-1 $\beta$  a nivel vascular, estableciendo su interacción con la vía de señalización del receptor TLR4. Por otra parte, pone de manifiesto el papel protector de la activación de Nrf2 frente a los efectos inflamatorios y prooxidantes inducidos por IL-1 $\beta$ /TLR4. De esta manera, los activadores de Nrf2 se postulan como buenos candidatos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares en las cuales la inflamación vascular juega un papel importante.

## CONCLUSIONS

1. IL-1 $\beta$  activates MAPK/AP-1/COX-2 inflammatory signaling pathway in mouse aortic VSMC and increases the migration and proliferation rate of these cells through the induction of oxidative stress. Oxidative stress would also be involved in IL-1 $\beta$ -induced endothelial dysfunction in mouse aorta.
2. Activation of TLR4/MyD88 signaling pathway by IL-1 $\beta$  is involved in IL-1 $\beta$ -induced oxidative stress, inflammation, cell migration and proliferation, as well as in the cytokine-induced endothelial dysfunction.
3. IL-1 $\beta$  activates the transcription factor Nrf2 through induction of oxidative stress and activation of the TLR4 pathway. In addition, reduction in the expression of its negative regulator Keap1 and phosphorylation of the transcription factor by JNK also contribute to IL-1 $\beta$ -induced Nrf2 activation.
4. Activation of Nrf2 transcription factor by IL-1 $\beta$  acts as a compensatory mechanism against the deleterious effects of the cytokine.
5. The use of the Nrf2 pharmacological activator tBHQ protects against IL-1 $\beta$ -induced effects on oxidative stress, inflammation, cell migration and proliferation processes, and endothelial dysfunction, at least in part, by interfering with TLR4/MyD88 pathway.
6. TLR4 ligand LPS activates Nrf2 by mechanisms involving, at least in part, reduction of Keap1 expression and phosphorylation of the transcription factor.
7. Nrf2 activation by tBHQ has a protective role against prooxidant and proinflammatory effects induced by the LPS/TLR4/MyD88 pathway.

The present study provides new data on the proinflammatory mechanism of IL-1 $\beta$  at vascular level, by establishing its interaction with the TLR4 signaling pathway. In addition, it highlights the protective role of Nrf2 activation against IL-1 $\beta$ /TLR4-induced inflammatory and prooxidant effects. Thus, Nrf2 activators are proposed as good candidates for the treatment of cardiovascular diseases in which vascular inflammation plays an important role.



# **BIBLIOGRAFÍA**



- Abbate, A., Toldo, S., Marchetti, C., Kron, J., Van Tassel, B. W., and Dinarello, C. A. (2020). Interleukin-1 and the Inflammasome as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 1260–1280. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.120.315937.
- Acevedo, A., and González-Billault, C. (2018). Crosstalk between Rac1-mediated actin regulation and ROS production. *Free Radic. Biol. Med.* 116, 101–113. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.008.
- Aghajanian, A., Wittchen, E. S., Campbell, S. L., and Burrige, K. (2009). Direct Activation of RhoA by Reactive Oxygen Species Requires a Redox-Sensitive Motif. *PLoS ONE* 4, e8045. doi: 10.1371/journal.pone.0008045.
- Aguado, A., Fischer, T., Rodríguez, C., Manea, A., Martínez-González, J., Touyz, R. M., *et al.* (2016). Hu antigen R is required for NOX-1 but not NOX-4 regulation by inflammatory stimuli in vascular smooth muscle cells. *J. Hypertens.* 34, 253–265. doi: 10.1097/HJH.0000000000000801.
- Aguado, A., Rodríguez, C., Martínez-Revelles, S., Avendaño, M. S., Zhenyukh, O., Orriols, M., *et al.* (2015). HuR mediates the synergistic effects of angiotensin II and IL-1 $\beta$  on vascular COX-2 expression and cell migration. *Br. J. Pharmacol.* 172, 3028–3042. doi: 10.1111/bph.13103.
- Ahmed, S. M. U., Luo, L., Namani, A., Wang, X. J., and Tang, X. (2017). Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *BBA - Mol. Basis Dis.* 1863, 585–597. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.11.005.
- Akita, K., Isoda, K., Ohtomo, F., Isobe, S., Niida, T., Sato-Okabayashi, Y., *et al.* (2021). Blocking of interleukin-1 suppresses angiotensin II-induced renal injury. *Clin. Sci. (Lond).* 135(17), 2035–2048. doi: 10.1042/CS20201406/919271/cs-2020-1406
- Allahverdian, S., Chaabane, C., Boukais, K., Francis, G. A., and Bochaton-Piallat, M.-L. (2018). Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 114, 540–550. doi: 10.1093/cvr/cvy022.
- Alonso-piñeiro, J. A., Gonzalez-rovira, A., Sánchez-gomar, I., Moreno, J. A., and Durán-ruiz, M. C. (2021). Nrf2 and heme oxygenase-1 involvement in atherosclerosis related oxidative stress. *Antioxidants* 10. doi: 10.3390/antiox10091463.
- Alves-Lopes, R., Neves, K. B., Montezano, A. C., Harvey, A., Carneiro, F. S., Touyz, R. M., *et al.* (2016). Internal Pudental Artery Dysfunction in Diabetes Mellitus Is Mediated by NOX1-Derived ROS-, Nrf2-, and Rho Kinase-Dependent Mechanisms. *Hypertension* 68, 1056–1064. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07518.
- Ambrosino, P., Bachetti, T., D'Anna, S. E., Galloway, B., Bianco, A., D'Agnano, V., *et al.* (2022). Mechanisms and Clinical Implications of Endothelial Dysfunction in Arterial Hypertension. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 9, 136. doi: 10.3390/jcdd9050136.
- Amponsah-Offeh, M., Diaba-Nuhoho, P., Speier, S., and Morawietz, H. (2023). Oxidative Stress, Antioxidants and Hypertension. *Antioxidants* 12, 281. doi: 10.3390/antiox12020281.
- Aoki, T., Nishimura, M., Matsuoka, T., Yamamoto, K., Furuyashiki, T., Kataoka, H., *et al.* (2011). PGE<sub>2</sub>-EP<sub>2</sub> signalling in endothelium is activated by haemodynamic stress and induces cerebral aneurysm through an amplifying loop via NF- $\kappa$ B: PGE<sub>2</sub>-EP<sub>2</sub> induce cerebral aneurysm via NF- $\kappa$ B. *Br. J. Pharmacol.* 163, 1237–1249. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01358.x.
- Asehnoune, K., Strassheim, D., Mitra, S., Kim, J. Y., and Abraham, E. (2004). Involvement of Reactive Oxygen Species in Toll-Like Receptor 4-Dependent Activation of NF- $\kappa$ B. *J. Immunol.* 172, 2522–2529. doi: 10.4049/jimmunol.172.4.2522.

- Ashino, T., Yamamoto, M., and Numazawa, S. (2016). Nrf2/Keap1 system regulates vascular smooth muscle cell apoptosis for vascular homeostasis: Role in neointimal formation after vascular injury. *Sci. Rep.* 6, 1–5. doi: 10.1038/srep26291.
- Ashino, T., Yamamoto, M., Yoshida, T., and Numazawa, S. (2013). Redox-Sensitive Transcription Factor Nrf2 Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Neointimal Hyperplasia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 760–768. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300614.
- Avendaño, M. S., Martínez-Revelles, S., Aguado, A., Simões, M. R., González-Amor, M., Palacios, R., *et al.* (2016). Role of COX-2-derived PGE<sub>2</sub> on vascular stiffness and function in hypertension: COX-2 and vascular remodelling in hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 173, 1541–1555. doi: 10.1111/bph.13457.
- Baas, A. S., and Berk, B. C. (1995). Differential Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ. Res.* 77, 29–36. doi: 10.1161/01.RES.77.1.29.
- Badran, A., Nasser, S. A., Mesmar, J., El-Yazbi, A. F., Bitto, A., Fardoun, M. M., *et al.* (2020). Reactive oxygen species: Modulators of phenotypic switch of vascular smooth muscle cells. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–21. doi: 10.3390/ijms21228764.
- Bagi, Z., Erdei, N., Toth, A., Li, W., Hintze, T. H., Koller, A., *et al.* (2005). Type 2 Diabetic Mice Have Increased Arteriolar Tone and Blood Pressure: Enhanced Release of COX-2-Derived Constrictor Prostaglandins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1610–1616. doi: 10.1161/01.ATV.0000172688.26838.9f.
- Bai, J., Yu, X. J., Liu, K. L., Wang, F. F., Li, H. B., Shi, X. L., *et al.* (2017). Tert-butylhydroquinone attenuates oxidative stress and inflammation in hypothalamic paraventricular nucleus in high salt-induced hypertension. *Toxicol. Lett.* doi: 10.1016/j.toxlet.2017.08.018.
- Baird, L., Llères, D., Swift, S., and Dinkova-Kostova, A. T. (2013). Regulatory flexibility in the Nrf2-mediated stress response is conferred by conformational cycling of the Keap1-Nrf2 protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 15259–15264. doi: 10.1073/pnas.1305687110.
- Baird, L., and Yamamoto, M. (2020). The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Mol. Cell. Biol.* 40, e00099-20. doi: 10.1128/MCB.00099-20.
- Baker, C. S. R., Hall, R. J. C., Evans, T. J., Pomerance, A., Maclouf, J., Creminon, C., *et al.* (1999). Cyclooxygenase-2 Is Widely Expressed in Atherosclerotic Lesions Affecting Native and Transplanted Human Coronary Arteries and Colocalizes With Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitrotyrosine Particularly in Macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 646–655. doi: 10.1161/01.ATV.19.3.646.
- Basatemur, G. L., Jørgensen, H. F., Clarke, M. C. H., Bennett, M. R., and Mallat, Z. (2019). Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* 16, 727–744. doi: 10.1038/s41569-019-0227-9.
- Beccacece, L., Abondio, P., Bini, C., Pelotti, S., and Luiselli, D. (2023). The Link between Prostanoids and Cardiovascular Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 4193. doi: 10.3390/ijms24044193.
- Bedard, K., and Krause, K.-H. (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313. doi: 10.1152/physrev.00044.2005.
- Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A., and Donato, R. (2018). Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *BBA - Mol. Cell Res.* 1865, 721–733. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.02.010.
- Beltrán, A. E., Briones, A. M., García-Redondo, A. B., Rodríguez, C., Miguel, M., Álvarez, Y., *et al.* (2009). p38 MAPK contributes to angiotensin II-induced COX-2 expression in aortic fibroblasts from normotensive and hypertensive rats. *J. Hypertens.* 27, 142–154. doi: 10.1097/HJH.0b013e328317a730.

- Bendall, J. K., Rinze, R., Adlam, D., Tatham, A. L., De Bono, J., and Channon, K. M. (2007). Endothelial Nox2 Overexpression Potentiates Vascular Oxidative Stress and Hemodynamic Response to Angiotensin II: Studies in Endothelial-Targeted Nox2. *Circ. Res.* 100:1016-1025. doi.org/10.1161/01.RES.0000263381.83835.7b
- Berry, C. E., and Hare, J. M. (2004). Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications: Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease. *J. Physiol.* 555, 589–606. doi: 10.1113/jphysiol.2003.055913.
- Biernacki, M., Ambrożewicz, E., Gęgotek, A., Toczek, M., Bielawska, K., and Skrzydlewska, E. (2018a). Redox system and phospholipid metabolism in the kidney of hypertensive rats after FAAH inhibitor URB597 administration. *Redox Biol.* 15, 41–50. doi: 10.1016/j.redox.2017.11.022.
- Biernacki, M., Luczaj, W., Jarocka-Karpowicz, I., Ambrozewicz, E., Toczek, M., and Skrzydlewska, E. (2018b). The effect of long-term administration of fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 on oxidative metabolism in the heart of rats with primary and secondary hypertension. *Molecules* 23, 1–16. doi: 10.3390/molecules23092350.
- Bhaskar, V., Yin, J., Mirza, A. M., Phan, D., Vanegas, S., Issafras, H., *et al.* (2011). Monoclonal antibodies targeting IL-1 beta reduce biomarkers of atherosclerosis in vitro and inhibit atherosclerotic plaque formation in Apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 216, 313–320. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.026.
- Bomfim, G. F., dos Santos, R. A., Oliveira, M. A., Giachini, F. R., Akamine, E. H., Tostes, R. C., *et al.* (2012). Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci (Lond)*. 122, 535–543. doi: 10.1042/CS20110523.
- Bos, C. L., Richel, D. J., Ritsema, T., Peppelenbosch, M. P., and Versteeg, H. H. (2004). Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1187–1205. doi: 10.1016/j.biocel.2003.08.006.
- Boutouyrie, P., Chowienczyk, P., Humphrey, J. D., and Mitchell, G. F. (2021). Arterial Stiffness and Cardiovascular Risk in Hypertension. *Circ. Res.* 128, 864–886. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318061.
- Brennan, M. S., Matos, M. F., Li, B., Hronowski, X., Gao, B., Juhasz, P., *et al.* (2015). Dimethyl Fumarate and Monoethyl Fumarate Exhibit Differential Effects on KEAP1, NRF2 Activation, and Glutathione Depletion In Vitro. *PLoS ONE* 10, e0120254. doi: 10.1371/journal.pone.0120254.
- Breuss, J., Atanasov, A., and Uhrin, P. (2019). Resveratrol and Its Effects on the Vascular System. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1523. doi: 10.3390/ijms20071523.
- Brigelius-Flohé, R., Banning, A., Kny, M., and Böhl, G. F. (2004). Redox events in interleukin-1 signaling. *Arch. Biochem. Biophys.* 423, 66–73. doi: 10.1016/j.abb.2003.12.008.
- Briones, A.M., Aras-Lopez, R., Alonso, M., and Salaices, M. (2014). Small Artery Remodeling in Obesity and Insulin Resistance. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 12, 427–437. doi:10.2174/1570161112666140423221319
- Briones, A. M., Arribas, S. M., and Salaices, M. (2010). Role of extracellular matrix in vascular remodeling of hypertension: *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 19, 187–194. doi: 10.1097/MNH.0b013e328335eec9.
- Briones, A. M., Salaices, M., and Vila, E. (2005). Ageing alters the production of nitric oxide and prostanoids after IL-1 $\beta$  exposure in mesenteric resistance arteries. *Mech. Ageing Dev.* 126, 710–721. doi: 10.1016/j.mad.2005.01.006.

- Briones, A. M., Tabet, F., Callera, G. E., Montezano, A. C., Yogi, A., He, Y., *et al.* (2011). Differential regulation of Nox1, Nox2 and Nox4 in vascular smooth muscle cells from WKY and SHR. *J. Am. Soc. Hypertens.* 5, 137–153. doi: 10.1016/j.jash.2011.02.001.
- Briones, A. M., Xavier, F. E., Arribas, S. M., González, M. C., Rossoni, L. V., Alonso, M. J., *et al.* (2006). Alterations in structure and mechanics of resistance arteries from ouabain-induced hypertensive rats. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 291, H193–H201. doi: 10.1152/ajpheart.00802.2005.
- Brock, T. G., McNish, R. W., and Peters-Golden, M. (1999). Arachidonic Acid Is Preferentially Metabolized by Cyclooxygenase-2 to Prostacyclin and Prostaglandin E2. *J. Biol. Chem.* 274, 11660–11666. doi: 10.1074/jbc.274.17.11660.
- Brown, D. I., and Griendling, K. K. (2015). Regulation of Signal Transduction by Reactive Oxygen Species in the Cardiovascular System. *Circ Res* 116, 531–549. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303584.
- Brown, I. A. M., Diederich, L., Good, M. E., DeLalio, L. J., Murphy, S. A., Cortese-Krott, M. M., *et al.* (2018). Vascular Smooth Muscle Remodeling in Conductive and Resistance Arteries in Hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38, 1969–1985. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311229.
- Buelna-Chontal, M., and Zazueta, C. (2013). Redox activation of Nrf2 & NF- $\kappa$ B: A double end sword? *Cell. Signall.* 25, 2548–2557. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.08.007.
- Cai, J., Wen, J., Bauer, E., Zhong, H., Yuan, H., and Chen, A. F. (2015). The Role of HMGB1 in Cardiovascular Biology: Danger Signals. *Antioxid. Redox Signal.* 23, 1351–1369. doi: 10.1089/ars.2015.6408.
- Cantero-Navarro, E., Fernández-Fernández, B., Ramos, A. M., Rayego-Mateos, S., Rodrigues-Diez, R. R., Sánchez-Niño, M. D., *et al.* (2021). Renin-angiotensin system and inflammation update. *Mol. Cell. Endocrinol.* 529, 111254. doi: 10.1016/j.mce.2021.111254.
- Cautivo, K. M., Steer, C. A., and Molofsky, A. B. (2020). Immune outposts in the adventitia: One foot in sea and one on shore. *Curr. Opin. Immunol.* 64, 34–41. doi: 10.1016/j.coi.2020.03.005.
- Cervantes-Gracia, K., Llanas-Cornejo, D., and Husi, H. (2017). CVD and Oxidative Stress. *J. Clin. Med.* 6, 22. doi: 10.3390/jcm6020022.
- Chang, L., Garcia-Barrio, M. T., and Chen, Y. E. (2020). Perivascular Adipose Tissue Regulates Vascular Function by Targeting Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 40, 1094–1109. doi: 10.1161/ATVBAHA.120.312464.
- Chen, G., Chen, X. L., Xu, C. B., Lin, J., Luo, H. L., Xie, X., *et al.* (2020). Toll-like receptor protein 4 monoclonal antibody inhibits mmLDL-induced endothelium-dependent vasodilation dysfunction of mouse mesenteric arteries. *Microvasc. Res.* 127. doi: 10.1016/j.mvr.2019.103923.
- Chen, L. G., Zhang, Y. Q., Wu, Z. Z., Hsieh, C. W., Chu, C. S., and Wung, B. S. (2017). Peanut arachidin-1 enhances Nrf2-mediated protective mechanisms against TNF- $\alpha$ -induced ICAM-1 expression and NF- $\kappa$ B activation in endothelial cells. *Int J Mol Med.* doi: 10.3892/ijmm.2017.3238.
- Chen, M., Ye, X., He, X., and Ouyang, D. (2021). The Signaling Pathways Regulating NLRP3 Inflammasome Activation. *Inflammation* 44, 1229–1245. doi: 10.1007/s10753-021-01439-6.
- Chen, S. C., Huang, J. C., Su, H. M., Chiu, Y. W., Chang, J. M., Hwang, S. J., *et al.* (2018). Prognostic Cardiovascular Markers in Chronic Kidney Disease. *Kidney Blood Press Res* 43, 1388–1407. doi: 10.1159/000492953.
- Chen, W., Sun, Z., Wang, X. J., Jiang, T., Huang, Z., Fang, D., *et al.* (2009). Direct Interaction between Nrf2 and p21Cip1/WAF1 Upregulates the Nrf2-Mediated Antioxidant Response. *Mol. Cell* 34, 663–673. doi: 10.1016/j.molcel.2009.04.029.

- Chen, X. L., Dodd, G., Thomas, S., Zhang, X., Wasserman, M. A., Rovin, B. H., *et al.* (2006). Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H1862–H1870. doi: 10.1152/ajpheart.00651.2005.
- Chen, Y. J., Tsai, K. S., Chiu, C. Y., Yang, T. H., Lin, T. H., Fu, W. M., *et al.* (2013). EGb761 inhibits inflammatory responses in human chondrocytes and shows chondroprotection in osteoarthritic rat knee. *J. Orthop. Res.* 31, 1032–1038. doi: 10.1002/jor.22339.
- Cheng, F., Torzewski, M., Degreif, A., Rossmann, H., Canisius, A., and Lackner, K. J. (2013). Impact of Glutathione Peroxidase-1 Deficiency on Macrophage Foam Cell Formation and Proliferation: Implications for Atherogenesis. *PLoS ONE* 8, e72063. doi: 10.1371/journal.pone.0072063.
- Cho, K.-J., Seo, J. M., and Kim, J. H. (2011). Bioactive lipxygenase metabolites stimulation of NADPH oxidases and reactive oxygen species. *Mol. Cells.* 32, 1–5. doi: 10.1007/s10059-011-1021-7.
- Chocry, M., and Leloup, L. (2020). The NADPH Oxidase Family and Its Inhibitors. *Antioxid. Redox Signal.* 33, 332–353. doi: 10.1089/ars.2019.7915.
- Choi, H. C., Kim, H. S., Lee, K. Y., Chang, K. C., and Kang, Y. J. (2008). NS-398, a selective COX-2 inhibitor, inhibits proliferation of IL-1 $\beta$ -stimulated vascular smooth muscle cells by induction of HO-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376, 753–757. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.09.056.
- Choi, H. Y., Lee, J. H., Jegal, K. H., Cho, I. J., Kim, Y. W., and Kim, S. C. (2016). Oxyresveratrol abrogates oxidative stress by activating ERK–Nrf2 pathway in the liver. *Chem. Biol. Interact.* 245, 110–121. doi: 10.1016/j.cbi.2015.06.024.
- Choi, S. H., Park, S., Oh, C. J., Leem, J., Park, K.-G., and Lee, I.-K. (2015). Dipeptidyl peptidase-4 inhibition by gemigliptin prevents abnormal vascular remodeling via NF-E2-related factor 2 activation. *Vascul. Pharmacol.* 73, 11–19. doi: 10.1016/j.vph.2015.07.005.
- Chou, C. C., Wang, C. P., Chen, J. H., and Lin, H. H. (2019). Anti-Atherosclerotic Effect of Hibiscus Leaf Polyphenols against Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Induced Abnormal Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Proliferation. *Antioxidants (Basel)* 8, 620. doi: 10.3390/antiox8120620.
- Chowdhry, S., Zhang, Y., McMahon, M., Sutherland, C., Cuadrado, A., and Hayes, J. D. (2013). Nrf2 is controlled by two distinct  $\beta$ -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. *Oncogene* 32, 3765–3781. doi: 10.1038/onc.2012.388.
- Chun, K.-S., and Surh, Y.-J. (2004). Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochem. Pharmacol.* 68, 1089–1100. doi: 10.1016/j.bcp.2004.05.031.
- Ciesielska, A., Matyjek, M., and Kwiatkowska, K. (2021). TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 1233–1261. doi: 10.1007/s00018-020-03656-y.
- Cipollone, F., Prontera, C., Pini, B., Marini, M., Fazio, M., De Cesare, D., *et al.* (2001). Overexpression of Functionally Coupled Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin E Synthase in Symptomatic Atherosclerotic Plaques as a Basis of Prostaglandin E<sub>2</sub>-Dependent Plaque Instability. *Circulation* 104, 921–927. doi: 10.1161/hc3401.093152.
- Cleasby, A., Yon, J., Day, P. J., Richardson, C., Tickle, I. J., Williams, P. A., *et al.* (2014). Structure of the BTB Domain of Keap1 and Its Interaction with the Triterpenoid Antagonist CDDO. *PLoS ONE* 9, e98896. doi: 10.1371/journal.pone.0098896.

- Clempus, R. E., Sorescu, D., Dikalova, A. E., Pounkova, L., Jo, P., Sorescu, G. P., *et al.* (2007). Nox4 Is Required for Maintenance of the Differentiated Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 42–48. doi: 10.1161/01.ATV.0000251500.94478.18.
- Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Polentarutti, N., Sironi, M., *et al.* (1993). Interleukin-1 Type II Receptor: A Decoy Target for IL-1 That Is Regulated by IL-4. *Science* 261, 472–475.
- Costa, R. M., Alves-Lopes, R., Alves, J. V., Servian, C. P., Mestriner, F. L., Carneiro, F. S., *et al.* (2022). Testosterone Contributes to Vascular Dysfunction in Young Mice Fed a High Fat Diet by Promoting Nuclear Factor E2–Related Factor 2 Downregulation and Oxidative Stress. *Front. Physiol.* 13, 837603. doi: 10.3389/fphys.2022.837603.
- Crisman, E., Duarte, P., Dauden, E., Cuadrado, A., Rodríguez-Franco, M. I., López, M. G., *et al.* (2023). KEAP1-NRF2 protein–protein interaction inhibitors: Design, pharmacological properties and therapeutic potential. *Med. Res. Rev.* 43, 237–287. doi: 10.1002/med.21925.
- Da Costa, R. M., Rodrigues, D., Pereira, C. A., Silva, J. F., Alves, J. V., Lobato, N. S., *et al.* (2019). Nrf2 as a potential mediator of cardiovascular risk in metabolic diseases. *Front. Pharmacol.* 10, 1–12. doi: 10.3389/fphar.2019.00382.
- Daenen, K., Andries, A., Mekahli, D., Van Schepdael, A., Jouret, F., and Bammens, B. (2019). Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr. Nephrol.* 34, 975–991. doi: 10.1007/s00467-018-4005-4.
- D’Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell. Biol. Int.* 43, 582–592. doi: 10.1002/cbin.11137.
- De Batista, P. R., Palacios, R., Martín, A., Hernanz, R., Médici, C. T., Silva, M. A. S. C., *et al.* (2014). Toll-like receptor 4 upregulation by angiotensin II contributes to hypertension and vascular dysfunction through reactive oxygen species production. *PLoS ONE* 9. doi: 10.1371/journal.pone.0104020.
- de Graaf, R., Kloppenburg, G., Kitslaar, P. J., Bruggeman, C. A., and Stassen, F. (2006). Human heat shock protein 60 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through Toll-like receptors 2 and 4. *Microbes infect.* 8(7), 1859–1865. doi.org/10.1016/j.micinf.2006.02.024
- de Lima, R. S., Silva, J. C. S., Lima, C. T., de Souza, L. E., da Silva, M. B., Baladi, M. G., *et al.* (2019). Proinflammatory Role of Angiotensin II in the Aorta of Normotensive Mice. *BioMed Res.Int.* 2019, 9326896. doi.org/10.1155/2019/9326896
- de Oliveira, A. A., and Nunes, K. P. (2021). Crosstalk of TLR4, vascular NADPH oxidase, and COVID-19 in diabetes: What are the potential implications? *Vascul. Pharmacol.* 139, 106879. doi: 10.1016/j.vph.2021.106879.
- de Oliveira, H. T., Couto, G. K., Davel, A. P., Xavier, F. E., and Rossoni, L. V. (2021). Chronic cyclooxygenase-2 inhibition prevents the worsening of hypertension and endothelial dysfunction induced by ouabain in resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *Vascul. Pharmacol.* 139, 106880. doi: 10.1016/j.vph.2021.106880.
- De Queiroz, D. B., Ramos-Alves, F. E., Santos-Rocha, J., Duarte, G. P., and Xavier, F. E. (2017). Losartan reverses COX-2-dependent vascular dysfunction in offspring of hyperglycaemic rats. *Life Sci.* 184, 71–80. doi: 10.1016/j.lfs.2017.07.013.
- den Dekker, W. K., Cheng, C., Pasterkamp, G., and Duckers, H. J. (2010). Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization. *Atherosclerosis* 209, 314–320. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.09.075.
- Di Marco, E., Gray, S. P., Kennedy, K., Szyndralewicz, C., Lyle, A. N., Lassègue, B., *et al.* (2016). NOX4-derived reactive oxygen species limit fibrosis and inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells



- in diabetic atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* 97, 556–567. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.013.
- Di Mari, J. F., Mifflin, R. C., Adegboyega, P. A., Saada, J. I., and Powell, D. W. (2003). IL-1 $\alpha$ -induced COX-2 expression in human intestinal myofibroblasts is dependent on a PKC $\zeta$ -ROS pathway. *Gastroenterology* 124, 1855–1865. doi: 10.1016/S0016-5085(03)00399-8.
- Diebold, I., Petry, A., Hess, J., and Görlach, A. (2010). The NADPH Oxidase Subunit NOX4 Is a New Target Gene of the Hypoxia-inducible Factor-1. *Mol. Biol. Cell.* 21, 2087–2096. doi: 10.1091/mbc.e09-12-1003.
- Dikalov, S. I., and Dikalova, A. E. (2019). Crosstalk Between Mitochondrial Hyperacetylation and Oxidative Stress in Vascular Dysfunction and Hypertension. *Antioxid. Redox Signal.* 31, 710–721. doi: 10.1089/ars.2018.7632.
- Dikalova, A., Clempus, R., Lassègue, B., Cheng, G., McCoy, J., Dikalov, S., *et al.* (2005). Nox1 Overexpression Potentiates Angiotensin II-Induced Hypertension and Vascular Smooth Muscle Hypertrophy in Transgenic Mice. *Circulation*, 112, 2668–2676. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.538934.
- Dinarello, C. A. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol. Rev.* 281, 8–27. doi: 10.1111/imr.12621.
- Dinh, Q. N., Baird, G. R., Sobey, C. G., and Chrissobolis, S. (2014). Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension. *BioMed Res. Int.* 2014. doi: 10.1155/2014/406960.
- Dinkova-Kostova, A. T., Kostov, R. V., and Canning, P. (2017). Keap1, the cysteine-based mammalian intracellular sensor for electrophiles and oxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* 617, 84–93. doi: 10.1016/j.abb.2016.08.005.
- Doehner, W., and Landmesser, U. (2011). Xanthine Oxidase and Uric Acid in Cardiovascular Disease: Clinical Impact and Therapeutic Options. *Semin. Nephrol.* 31, 433–440. doi: 10.1016/j.semnephrol.2011.08.007.
- Dorrance, A. M. (2007). Interleukin 1-beta (IL-1 $\beta$ ) enhances contractile responses in endothelium-denuded aorta from hypertensive, but not normotensive, rats. *Vascul. Pharmacol.* 47, 160–165. doi: 10.1016/j.vph.2007.05.007.
- Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95. doi: 10.1152/physrev.00018.2001.
- Drummond, G. S., Baum, J., Greenberg, M., Lewis, D., and Abraham, N. G. (2019). HO-1 overexpression and underexpression: Clinical implications. *Arch. Biochem. Biophys.* 673. doi: 10.1016/j.abb.2019.108073.
- Dubois-Deruy, E., Peugnet, V., Turkieh, A., and Pinet, F. (2020). Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants* 9, 864. doi: 10.3390/antiox9090864.
- Duckers, H. J., Boehm, M., True, A. L., Yet, S.-F., San, H., Park, J. L., *et al.* (2001). Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nat. Med.* 7, 693–698. doi: 10.1038/89068.
- Eble, J., and Niland, S. (2009). The Extracellular Matrix of Blood Vessels. *Curr. Pharm. Des.* 15, 1385–1400. doi: 10.2174/138161209787846757.
- Eligini, S., Arenaz, I., Barbieri, S. S., Faleri, M. L., Crisci, M., Tremoli, E., *et al.* (2009). Cyclooxygenase-2 mediates hydrogen peroxide-induced wound repair in human endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 1428–1436. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.026.

- Eligini, S., Stellabarbieri, S., Cavalca, V., Camera, M., Brambilla, M., Defranceschi, M., *et al.* (2005). Diversity and similarity in signaling events leading to rapid Cox-2 induction by tumor necrosis factor- $\alpha$  and phorbol ester in human endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 65, 683–693. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.10.024.
- Endemann, D. H., Pu, Q., De Ciuceis, C., Savoia, C., Viridis, A., Neves, M. F., *et al.* (2004). Persistent Remodeling of Resistance Arteries in Type 2 Diabetic Patients on Antihypertensive Treatment. *Hypertension* 43, 399–404. doi: 10.1161/01.HYP.0000112029.03691.e7.
- Fan, X., Wu, J., Yang, H., Yan, L., and Wang, S. (2017). Paeoniflorin blocks the proliferation of vascular smooth muscle cells induced by platelet-derived growth factor-BB through ROS mediated ERK1/2 and p38 signaling pathways. *Mol. Med. Report.* doi: 10.3892/mmr.2017.8093.
- Farooqui, Z., Mohammad, R. S., Lokhandwala, M. F., and Banday, A. A. (2021). Nrf2 inhibition induces oxidative stress, renal inflammation and hypertension in mice. *Clin. Exp. Hypertens.* 43, 175–180. doi: 10.1080/10641963.2020.1836191.
- Félétou, M., Huang, Y., and Vanhoutte, P. M. (2011). Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br. J. Pharmacol.* 164, 894–912. doi: 10.1111/bph.2011.164.issue-3.
- Feng, J., Anderson, K., Singh, A. K., Ehsan, A., Mitchell, H., Liu, Y., *et al.* (2017). Diabetes Upregulation of Cyclooxygenase 2 Contributes to Altered Coronary Reactivity After Cardiac Surgery. *Ann. Thorac. Surg.* 104, 568–576. doi: 10.1016/j.athoracsur.2016.11.025.
- Feng, L., Xia, Y., Garcia, G. E., Hwang, D., and Wilson, C. B. (1995). Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* 95, 1669–1675. doi: 10.1172/JCI117842.
- Fernández-Tresguerres, J. A. F., Cachofeiro, V., Cardinali, D., Delpón, E., Rey, E., Escrich, E., *et al.* (2020). *Fisiología Humana*. 5th ed. McGraw-Hill Interamericana
- Forrester, S. J., Booz, G. W., Sigmund, C. D., Coffman, T. M., Kawai, T., Rizzo, V., *et al.* (2018). Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Rev.* 98, 1627–1738. doi: 10.1152/physrev.00038.2017.
- Förstermann, U., and Li, H. (2011). Therapeutic effect of enhancing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and preventing eNOS uncoupling: Prevention of eNOS uncoupling. *Br. J. Pharmacol.* 164, 213–223. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01196.x.
- Frismantiene, A., Philippova, M., Erne, P., and Resink, T. J. (2018). Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity. *Cell. Signall.* 52, 48–64. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.08.019.
- Fukai, T., and Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antiox. Redox Signal.* 15, 1583–1606. doi: 10.1089/ars.2011.3999.
- Galán, M., Miguel, M., Beltrán, A. E., Rodríguez, C., García-Redondo, A. B., Rodríguez-Calvo, R., *et al.* (2011). Angiotensin II differentially modulates cyclooxygenase-2, microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and prostaglandin I2 synthase expression in adventitial fibroblasts exposed to inflammatory stimuli. *J. Hypertens.* 29(3), 529–536. doi:10.1097/HJH.0b013e328342b271
- Gao, F., Li, J., Xi, C., Li, H., Liu, Y., Wang, Y., *et al.* (2019). Magnesium lithospermate B protects the endothelium from inflammation-induced dysfunction through activation of Nrf2 pathway. *Acta. Pharmacol. Sin.* 40, 867–878. doi: 10.1038/s41401-018-0189-1.

- Gao, Y. (2017). "Architecture of the Blood Vessels," in *Biology of Vascular Smooth Muscle: Vasoconstriction and Dilatation* (Singapore: Springer Singapore), 3–12. doi: 10.1007/978-981-10-4810-4\_1.
- García-Redondo, A. B., Aguado, A., Briones, A. M., and Salaices, M. (2016). NADPH oxidases and vascular remodeling in cardiovascular diseases. *Pharmacol. Res.* 114, 110–120. doi: 10.1016/j.phrs.2016.10.015.
- García-Redondo, A. B., Briones, A. M., Avendaño, M. S., Hernanz, R., Alonso, M. J., and Salaices, M. (2009a). Losartan and tempol treatments normalize the increased response to hydrogen peroxide in resistance arteries from hypertensive rats. *J. Hypertens.* 27, 1814–1822. doi: 10.1097/HJH.0b013e32832d23e6.
- García-Redondo, A. B., Briones, A. M., Beltrán, A. E., Alonso, M. J., Simonsen, U., and Salaices, M. (2009b). Hypertension Increases Contractile Responses to Hydrogen Peroxide in Resistance Arteries through Increased Thromboxane A<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup>, and Superoxide Anion Levels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 328, 19–27. doi: 10.1124/jpet.108.144295.
- García-Redondo, A. B., Esteban, V., Briones, A. M., Díaz Del Campo, L. S., González-Amor, M., Méndez-Barbero, N., *et al.* (2018). Regulator of calcineurin 1 modulates vascular contractility and stiffness through the upregulation of COX-2-derived prostanoids. *Pharmacol. Res.* 133, 236–249. doi: 10.1016/j.phrs.2018.01.001.
- Gay, N. J., Symmons, M. F., Gangloff, M., and Bryant, C. E. (2014). Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 546–558. doi: 10.1038/nri3713.
- Gerthoffer, W. T. (2007). Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Cell Migration. *Circ. Res.* 100, 607–621. doi: 10.1161/01.RES.0000258492.96097.47.
- Gharavi, N., Haggarty, S., and S. El-Kadi, A. (2007). Chemoprotective and Carcinogenic Effects of tert-Butylhydroquinone and Its Metabolites. *Curr. Drug Metab.* 8, 1–7. doi: 10.2174/138920007779315035.
- Gimbrone, M. A., and García-Cardena, G. (2016). Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ. Res.* 118, 620–636. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306301.
- Ginnan, R., Jourd'heuil, F. L., Guikema, B., Simons, M., Singer, H. A., and Jourd'heuil, D. (2013). NADPH oxidase 4 is required for interleukin-1 $\beta$ -mediated activation of protein kinase C $\delta$  and downstream activation of c-jun N-terminal kinase signaling in smooth muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 54, 125–134. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.026.
- Gliozzi, M., Scicchitano, M., Bosco, F., Musolino, V., Carresi, C., Scarano, F., *et al.* (2019). Modulation of Nitric Oxide Synthases by Oxidized LDLs: Role in Vascular Inflammation and Atherosclerosis Development. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3294. doi: 10.3390/ijms20133294.
- Gómez-Guzmán, M., Jiménez, R., Sánchez, M., Zarzuelo, M. J., Galindo, P., Quintela, A. M., *et al.* (2012). Epicatechin lowers blood pressure, restores endothelial function, and decreases oxidative stress and endothelin-1 and NADPH oxidase activity in DOCA-salt hypertension. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 70–79. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.015.
- Gomi, K., Zhu, F.-G., and Marshall, J. S. (2000). Prostaglandin E2 Selectively Enhances the IgE-Mediated Production of IL-6 and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor by Mast Cells Through an EP1/EP3-Dependent Mechanism. *J. Immunol.* 165, 6545–6552. doi: 10.4049/jimmunol.165.11.6545.

- Goswami, S. K., Ranjan, P., Dutta, R. K., and Verma, S. K. (2021). Management of inflammation in cardiovascular diseases. *Pharmacol. Res.* 173, 105912. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105912.
- Gray, S. P., Di Marco, E., Kennedy, K., Chew, P., Okabe, J., El-Osta, A., *et al.* (2016). Reactive Oxygen Species Can Provide Atheroprotection via NOX4-Dependent Inhibition of Inflammation and Vascular Remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 295–307. doi: 10.1161/ATVBAHA.115.307012.
- Gray, S. P., Di Marco, E., Okabe, J., Szyndralewicz, C., Heitz, F., Montezano, A. C., *et al.* (2013). NADPH Oxidase 1 Plays a Key Role in Diabetes Mellitus–Accelerated Atherosclerosis. *Circulation* 127, 1888–1902. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.132159.
- Griendling, K. K., Camargo, L. L., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Montezano, A. C., and Touyz, R. M. (2021). Oxidative Stress and Hypertension. *Circ. Res.* 993–1020. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318063.
- Grootaert, M. O. J., and Bennett, M. R. (2021). Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis: time for a re-assessment. *Cardiovasc. Res.* 117, 2326–2339. doi: 10.1093/cvr/cvab046.
- Gu, H., Jiao, Y., Yu, X., Li, X., Wang, W., Ding, L., *et al.* (2017). Resveratrol inhibits the IL-1 $\beta$ -induced expression of MMP-13 and IL-6 in human articular chondrocytes via TLR4/MyD88-dependent and -independent signaling cascades. *Int. J. Mol. Med.* 39, 734–740. doi: 10.3892/ijmm.2017.2885.
- Guikema, B. J., Ginnan, R., Singer, H. A., and Jourd’heuil, D. (2005). Catalase potentiates interleukin-1 $\beta$ -induced expression of nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 597–605. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.11.022.
- Gupta, V., and Grandeallen, K. (2006). Effects of static and cyclic loading in regulating extracellular matrix synthesis by cardiovascular cells. *Cardiovasc Res.* 72, 375–383. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.08.017.
- Guzik, T. J., Marvar, P. J., Czesnikiewicz-Guzik, M., and Korbout, R. (2007). Perivascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessel axis: role in vascular inflammation and dysfunction. *J. Physiol. Pharmacol.* 58(4), 591–610.
- Haga, J. H., Li, Y.-S. J., and Chien, S. (2007). Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells. *J. Biomech.* 40, 947–960. doi: 10.1016/j.jbiomech.2006.04.011.
- Halper, J. (2018). “Basic Components of Vascular Connective Tissue and Extracellular Matrix,” in *Adv. Pharmacol.* 95–127. doi: 10.1016/bs.apha.2017.08.012.
- Hammad, A. S. A., Ahmed, A.-S. F., Heeba, G. H., and Taye, A. (2019). Heme oxygenase-1 contributes to the protective effect of resveratrol against endothelial dysfunction in STZ-induced diabetes in rats. *Life Sci.* 239, 117065. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117065.
- Han, Y., Sun, H. J., Tong, Y., Chen, Y. Z., Ye, C., Qiu, Y., *et al.* (2019). Curcumin attenuates migration of vascular smooth muscle cells via inhibiting NF $\kappa$ B-mediated NLRP3 expression in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Biochem.* 72, 108212. doi: 10.1016/j.jnutbio.2019.07.003.
- Harada, N., Ito, K., Hosoya, T., Mimura, J., Maruyama, A., Noguchi, N., *et al.* (2012). Nrf2 in bone marrow-derived cells positively contributes to the advanced stage of atherosclerotic plaque formation. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 2256–2262. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.001.
- Harijith, A., Ebenezer, D. L., and Natarajan, V. (2014). Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation. *Front. Physiol.* 5. doi: 10.3389/fphys.2014.00352.
- Hayes, J. D., Chowdhry, S., Dinkova-Kostova, A. T., and Sutherland, C. (2015). Dual regulation of transcription factor Nrf2 by Keap1 and by the combined actions of  $\beta$ -TrCP and GSK-3. *Biochem. Soc. Trans.* 43, 611–620. doi: 10.1042/BST20150011.

- He, F., Ru, X., and Wen, T. (2020). NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 4777. doi: 10.3390/ijms21134777.
- He, J., Han, S., Li, X.-X., Wang, Q.-Q., Cui, Y., Chen, Y., *et al.* (2019). Diethyl Blechnic Exhibits Anti-Inflammatory and Antioxidative Activity via the TLR4/MyD88 Signaling Pathway in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells. *Molecules* 24, 4502. doi:10.3390/molecules24244502.
- Heitzer, T., Krohn, K., Albers, S., and Meinertz, T. (2000). Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 43, 1435–1438. doi: 10.1007/s001250051551.
- Heo, J., and Campbell, S. L. (2005). Mechanism of Redox-mediated Guanine Nucleotide Exchange on Redox-active Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* 280, 31003–31010. doi: 10.1074/jbc.M504768200.
- Hernanz, R., Briones, A. M., Alonso, M. J., Vila, E., and Salaices, M. (2004). Hypertension alters role of iNOS, COX-2, and oxidative stress in bradykinin relaxation impairment after LPS in rat cerebral arteries. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 287, H225–H234. doi: 10.1152/ajpheart.00548.2003.
- Hernanz, R., Briones, A. M., Salaices, M., and Alonso, M. J. (2014). New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. *Clin. Sci.* 126, 111–121. doi: 10.1042/CS20120651.
- Hernanz, R., Martínez-Revelles, S., Palacios, R., Martín, A., Cachofeiro, V., Aguado, A., *et al.* (2015). Toll-like receptor 4 contributes to vascular remodelling and endothelial dysfunction in angiotensin II-induced hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 172, 3159–3176. doi: 10.1111/bph.13117.
- Higashi, Y., Sasaki, S., Nakagawa, K., Fukuda, Y., Matsuura, H., Oshima, T., *et al.* (2002). Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals. *Am. J. Hypertens.* 15, 326–332. doi: 10.1016/S0895-7061(01)02317-2.
- Ho, F. M., Kang, H. C., Lee, S. T., Chao, Y., Chen, Y. C., Huang, L. J., *et al.* (2007). The anti-inflammatory actions of LCY-2-CHO, a carbazole analogue, in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* 74, 298–308. doi: 10.1016/j.bcp.2007.04.008.
- Horie, Y., Suzuki, T., Inoue, J., Iso, T., Wells, G., Moore, T. W., *et al.* (2021). Molecular basis for the disruption of Keap1–Nrf2 interaction via Hinge & Latch mechanism. *Commun. Biol.* 4, 576. doi: 10.1038/s42003-021-02100-6.
- Houde, M., Desbiens, L., and D'Orléans-Juste, P. (2016). Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity. *Adv. Pharmacol.* 143–175. doi: 10.1016/bs.apha.2016.05.002.
- Hu, Z.-W., Kerb, R., Shi, X.-Y., Wei-Lavery, T., and Hoffman, B. B. (2002). Angiotensin II Increases Expression of Cyclooxygenase-2: Implications for the Function of Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 563–573. doi: 10.1124/jpet.102.037705.
- Huang, H.-C., Nguyen, T., and Pickett, C. B. (2000). Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 12475–12480. doi: 10.1073/pnas.220418997.
- Huang, H.-C., Nguyen, T., and Pickett, C. B. (2002). Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by Protein Kinase C Regulates Antioxidant Response Element-mediated Transcription. *J. Biol. Chem.* 277, 42769–42774. doi: 10.1074/jbc.M206911200.
- Huang, S., You, S., Qian, J., Dai, C., Shen, S., Wang, J., *et al.* (2021). Myeloid differentiation 2 deficiency attenuates AngII-induced arterial vascular oxidative stress, inflammation, and remodeling. *Aging* 13, 4409–4427. doi: 10.18632/aging.202402.

- lizuka, T., Ishii, Y., Itoh, K., Kiwamoto, T., Kimura, T., Matsuno, Y., *et al.* (2005). Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema: Nrf2 regulation of emphysema. *Genes Cells*. 10, 1113–1125. doi: 10.1111/j.1365-2443.2005.00905.x.
- Incalza, M. A., D’Oria, R., Natalicchio, A., Perrini, S., Laviola, L., and Giorgino, F. (2018). Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul. Pharmacol.* 100, 1–19. doi: 10.1016/j.vph.2017.05.005.
- Ishikawa, K., Navab, M., and Lusis, A. J. (2012). Vasculitis, atherosclerosis, and altered HDL composition in heme-oxygenase-1-knockout mice. *Int. J. Hypertens.* 2012. doi: 10.1155/2012/948203.
- Isoda, K., Shiigai, M., Ishigami, N., Matsuki, T., Horai, R., Nishikawa, K., *et al.* (2003). Deficiency of Interleukin-1 Receptor Antagonist Promotes Neointimal Formation After Injury. *Circulation* 108, 516–518. doi: 10.1161/01.CIR.0000085567.18648.21.
- Jagadeesha, D. K., Takapoo, M., Banfi, B., Bhalla, R. C., and Miller, F. J. (2012). Nox1 transactivation of epidermal growth factor receptor promotes N-cadherin shedding and smooth muscle cell migration. *Cardiovasc Res.* 93, 406–413. doi: 10.1093/cvr/cvr308.
- Jaminon, A., Reesink, K., Kroon, A., & Schurgers, L. (2019). The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in Arterial Remodeling: Focus on Calcification-Related Processes. *Int. J. Mol. Sci* 20(22), 5694. doi.org/10.3390/ijms20225694
- Jaulmes, A., Thierry, S., Janvier, B., Raymondjean, M., Maréchal, V., Jaulmes, A., *et al.* (2006). Activation of sPLA2-IIA and PGE2 production by high mobility group protein B1 in vascular smooth muscle cells sensitized by IL-1 $\beta$ . *FASEB J.* 20, 1727–1729. doi: 10.1096/fj.05-5514fje.
- Javkhedkar, A. A., and Banday, A. A. (2015). Antioxidant resveratrol restores renal sodium transport regulation in SHR. *Physiol. Rep.* 3, 1–9. doi: 10.14814/phy2.12618.
- Ji, R., Gu, Y., Zhang, J., Gao, C., Gao, W., Zang, X., *et al.* (2020). TRIM7 promotes proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis through activating c-Jun/AP-1. *IUBMB Life.* 72, 247–258. doi: 10.1002/iub.2181.
- Jiang, H., Zhao, Y., Feng, P., and Liu, Y. (2022). Sulfiredoxin-1 Inhibits PDGF-BB-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration by Enhancing the Activation of Nrf2/ARE Signaling. *Int. Heart J.* 63, 113–121. doi: 10.1536/ihj.21-213.
- Jiang, J., and Cai, M. (2021). Cardamonin Inhibited IL-1 $\beta$  Induced Injury by Inhibition of NLRP3 Inflammasome via Activating Nrf2/NQO-1 Signaling Pathway in Chondrocyte. *J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 794–802. doi: 10.4014/jmb.2103.03057.
- Jiang, T., Harder, B., Rojo De La Vega, M., Wong, P. K., Chapman, E., and Zhang, D. D. (2015). p62 links autophagy and Nrf2 signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 88, 199–204. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.014.
- Jiménez-Altayó, F., Briones, A. M., Giraldo, J., Planas, A. M., Salaices, M., and Vila, E. (2006). Increased Superoxide Anion Production by Interleukin-1 $\beta$  Impairs Nitric Oxide-Mediated Relaxation in Resistance Arteries. *J Pharmacol. Exp. Ther* 316, 42–52. doi: 10.1124/jpet.105.088435.
- Judkins, C. P., Diep, H., Broughton, B. R. S., Mast, A. E., Hooker, E. U., Miller, A. A., *et al.* (2010). Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 298, H24–H32. doi: 10.1152/ajpheart.00799.2009.

- Jung, Y. D., Fan, F., McConkey, D. J., Jean, M. E., Liu, W., Reinmuth, N., *et al.* (2002). Role of P38 MAPK, AP-1, and NF-kappaB in interleukin-1beta-induced IL-8 expression in human vascular smooth muscle cells. *Cytokine*, 18(4), 206–213. <https://doi.org/10.1006/cyto.2002.1034>
- Jurk, D., Wilson, C., Passos, J. F., Oakley, F., Correia-Melo, C., Greaves, L., *et al.* (2014). Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nat. Commun.* 5, 4172. doi: 10.1038/ncomms5172.
- Kang, J. Y., Xu, M. M., Sun, Y., Ding, Z. X., Wei, Y. Y., Zhang, D. W., *et al.* (2022). Melatonin attenuates LPS-induced pyroptosis in acute lung injury by inhibiting NLRP3-GSDMD pathway via activating Nrf2/HO-1 signaling axis. *Int. Immunopharmacol.* 109, 108782. doi: 10.1016/j.intimp.2022.108782.
- Kaspar, J. W., and Jaiswal, A. K. (2010). Antioxidant-induced phosphorylation of tyrosine 486 leads to rapid nuclear export of Bach1 that allows Nrf2 to bind to the antioxidant response element and activate defensive gene expression. *J. Biol. Chem.* 285, 153–162. doi: 10.1074/jbc.M109.040022.
- Kattoor, A. J., Pothineni, N. V. K., Palagiri, D., and Mehta, J. L. (2017). Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 19, 42. doi: 10.1007/s11883-017-0678-6.
- Kawai, T., and Akira, S. (2007). TLR signaling. *Semin. Immunol.* 19, 24–32. doi: 10.1016/j.smim.2006.12.004.
- Kawamura, K., Ishikawa, K., Wada, Y., Kimura, S., Matsumoto, H., Kohro, T., *et al.* (2005). Bilirubin From Heme Oxygenase-1 Attenuates Vascular Endothelial Activation and Dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 155–160. doi: 10.1161/01.ATV.0000148405.18071.6a.
- Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., and He, Y. (2019). The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3328. doi: 10.3390/ijms20133328.
- Kensler, T. W., Qian, G. S., Chen, J. G., and Groopman, J. D. (2003). Translational strategies for cancer prevention in liver. *Nat. Rev. Cancer* 3, 321–329. doi: 10.1038/nrc1076.
- Khan, N. M., Ahmad, I., and Haqqi, T. M. (2018). Nrf2/ARE pathway attenuates oxidative and apoptotic response in human osteoarthritis chondrocytes by activating ERK1/2/ELK1-P70S6K-P90RSK signaling axis. *Free Radic. Biol. Med.* 116, 159–171. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.013.
- Khimji, A., and Rockey, D. C. (2010). Endothelin—Biology and disease. *Cell. Signall.* 22, 1615–1625. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.05.002.
- Khodagholi, F., and Tusi, S. K. (2011). Stabilization of Nrf2 by tBHQ prevents LPS-induced apoptosis in differentiated PC12 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 354, 97–112. doi: 10.1007/s11010-011-0809-2.
- Ki, S. H., Cho, I. J., Choi, D. W., and Kim, S. G. (2005). Glucocorticoid Receptor (GR)-Associated SMRT Binding to C/EBP<sub>NL</sub> TAD and Nrf2 Neh4/5: Role of SMRT Recruited to GR in GSTA2 Gene Repression. *Mol. Cell. Biol.* 25(10), 4150–4165. doi.org/10.1128/MCB.25.10.4150-4165.2005
- Kim, E. J., Park, S. Y., Baek, S. E., Jang, M. A., Lee, W. S., Bae, S. S., *et al.* (2018). HMGB1 Increases IL-1 $\beta$  production in vascular smooth muscle cells via NLRP3 inflammasome. *Front. Physiol.* 9. doi: 10.3389/fphys.2018.00313.
- Kim, H. J., Kim, M. Y., Hwang, J. S., Kim, H. J., Lee, J. H., Chang, K. C., *et al.* (2010). PPAR $\delta$  inhibits IL-1 $\beta$ -stimulated proliferation and migration of vascular smooth muscle cells via up-regulation of IL-1Ra. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2119–2130. doi: 10.1007/s00018-010-0328-4.

- Kim, J., and Shim, M. (2016). COX-2 inhibitor NS-398 suppresses doxorubicin-induced p53 accumulation through inhibition of ROS-mediated Jnk activation: COX-2 as an upstream regulator of p53. *Mol. Carcinog.* 55, 2156–2167. doi: 10.1002/mc.22458.
- Kim, J. Y., Park, H. J., Um, S. H., Sohn, E. H., Kim, B. O., Moon, E. Y., *et al.* (2012). Sulforaphane suppresses vascular adhesion molecule-1 expression in TNF- $\alpha$ -stimulated mouse vascular smooth muscle cells: Involvement of the MAPK, NF- $\kappa$ B and AP-1 signaling pathways. *Vascul. Pharmacol* 56, 131–141. doi: 10.1016/j.vph.2011.11.007.
- Kobayashi, E. H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., Sekine, H., *et al.* (2016). Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat. Commun.* 7, 1–14. doi: 10.1038/ncomms11624.
- Konrad, F. M., Zwergel, C., Ngamsri, K. C., and Reutershan, J. (2017). Anti-inflammatory Effects of Heme Oxygenase-1 Depend on Adenosine A2A- and A2B-Receptor Signaling in Acute Pulmonary Inflammation. *Front. Immunol.* 8, 1874. doi: 10.3389/fimmu.2017.01874.
- Konukoglu, D., and Uzun, H. (2016a). Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Adv. Exp. Med. Biol.* 956, 511–540. doi: 10.1007/5584\_2016\_90.
- Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., and Chlubek, D. (2013). The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *J. Physiol. Pharmacol.* 64(4), 409–421.
- Koushki, K., Shahbaz, S. K., Mashayekhi, K., Sadeghi, M., Zayeri, Z. D., Taba, M. Y., *et al.* (2021). Anti-inflammatory Action of Statins in Cardiovascular Disease: the Role of Inflammasome and Toll-Like Receptor Pathways. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 60, 175–199. doi: 10.1007/s12016-020-08791-9.
- Krishnan, S. M., Sobey, C. G., Latz, E., Mansell, A., and Drummond, G. R. (2014). IL-1 $\beta$  and IL-18: Inflammatory markers or mediators of hypertension? *Br. J. Pharmacol.* 171, 5589–5602. doi: 10.1111/bph.12876.
- Krüger-Genge, Blocki, Franke, and Jung (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 4411. doi: 10.3390/ijms20184411.
- Krzemińska, J., Wronka, M., Młynarska, E., Franczyk, B., and Rysz, J. (2022). Arterial Hypertension—Oxidative Stress and Inflammation. *Antioxidants* 11. doi: 10.3390/antiox11010172.
- Ku, E. J., Kim, B. R., Lee, J. I., Lee, Y. K., Oh, T. J., Jang, H. C., *et al.* (2022). The Anti-Atherosclerosis Effect of Anakinra, a Recombinant Human Interleukin-1 Receptor Antagonist, in Apolipoprotein E Knockout Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 4906. doi: 10.3390/ijms23094906.
- Küper, C., Beck, F. X., and Neuhofer, W. (2012). Toll-like receptor 4 activates NF- $\kappa$ B and MAP kinase pathways to regulate expression of proinflammatory COX-2 in renal medullary collecting duct cells Küper C, Beck FX, Neuhofer W. Toll-like receptor 4 activates NF- $\kappa$ B and MAP kinase pathways to regulate expression of proinflammatory COX-2 in renal medullary collecting duct cells. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 302, 38–46. doi: 10.1152/ajprenal.00590.2010.-Binding.
- Kwon, D. J., Ju, S. M., Youn, G. S., Choi, S. Y., and Park, J. (2013). Suppression of iNOS and COX-2 expression by flavokawain A via blockade of NF- $\kappa$ B and AP-1 activation in RAW 264.7 macrophages. *Food Chem. Toxicol.* 58, 479–486. doi: 10.1016/j.fct.2013.05.031.
- Lacolley, P., Regnault, V., Segers, P., and Laurent, S. (2017). Vascular Smooth Muscle Cells and Arterial Stiffening: Relevance in Development, Aging, and Disease. *Physiol. Rev.* 97, 1555–1617. doi: 10.1152/physrev.00003.2017.



- Landmesser, U., Dikalov, S., Price, S. R., McCann, L., Fukai, T., Holland, S. M., *et al.* (2003). Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J. Clin. Invest.* 111, 1201–1209. doi: 10.1172/JCI200314172.
- Landmesser, U., Spiekermann, S., Preuss, C., Sorrentino, S., Fischer, D., Manes, C., *et al.* (2007). Angiotensin II Induces Endothelial Xanthine Oxidase Activation: Role for Endothelial Dysfunction in Patients With Coronary Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 943–948. doi: 10.1161/01.ATV.0000258415.32883.bf.
- Lau, A., Tian, W., Whitman, S. A., and Zhang, D. D. (2013). The Predicted Molecular Weight of Nrf2: It Is What It Is Not. *Antiox. Redox Signal.* 18, 91–93. doi: 10.1089/ars.2012.4754.
- Laurent, S., and Boutouyrie, P. (2015). The Structural Factor of Hypertension: Large and Small Artery Alterations. *Circ. Res.* 116, 1007–1021. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303596.
- Lazaro, I., Lopez-Sanz, L., Bernal, S., Oguiza, A., Recio, C., Melgar, A., *et al.* (2018). Nrf2 Activation Provides Atheroprotection in Diabetic Mice Through Concerted Upregulation of Antioxidant, Anti-inflammatory, and Autophagy Mechanisms. *Front. Pharmacol.* 9, 819. doi: 10.3389/fphar.2018.00819.
- Lee, G.-L., Wu, J.-Y., Tsai, C.-S., Lin, C.-Y., Tsai, Y.-T., Lin, C.-S., *et al.* (2016). TLR4-Activated MAPK-IL-6 Axis Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Function. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 1394. doi: 10.3390/ijms17091394.
- Lee, M. Y., Martin, A. S., Mehta, P. K., Dikalova, A. E., Garrido, A. M., Datla, S. R., *et al.* (2009). Mechanisms of Vascular Smooth Muscle NADPH Oxidase 1 (Nox1) Contribution to Injury-Induced Neointimal Formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 480–487. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.181925.
- Lee, S., and Hu, L. (2020). Nrf2 activation through the inhibition of Keap1–Nrf2 protein–protein interaction. *Med. Chem. Res.* 29, 846–867. doi: 10.1007/s00044-020-02539-y.
- Lee, S. J., Seo, K. W., Yun, M. R., Bae, S. S., Lee, W. S., Hong, K. W., *et al.* (2008). 4-Hydroxynonenal enhances MMP-2 production in vascular smooth muscle cells via mitochondrial ROS-mediated activation of the Akt/NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1487–1492. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.022.
- Lee, W.-S., Ham, W., and Kim, J. (2021). Roles of NAD(P)H:quinone Oxidoreductase 1 in Diverse Diseases. *Life (Basel)*, 11, 1301. doi: 10.3390/life11121301.
- Li, C., Zhang, W.-J., and Frei, B. (2016). Quercetin inhibits LPS-induced adhesion molecule expression and oxidant production in human aortic endothelial cells by p38-mediated Nrf2 activation and antioxidant enzyme induction. *Redox Biol.* 9, 104–113. doi: 10.1016/j.redox.2016.06.006.
- Li, L., Luo, W., Qian, Y., Zhu, W., Qian, J., Li, J., *et al.* (2019). Luteolin protects against diabetic cardiomyopathy by inhibiting NF- $\kappa$ B-mediated inflammation and activating the Nrf2-mediated antioxidant responses. *Phytomedicine* 59, 152774. doi: 10.1016/j.phymed.2018.11.034.
- Liang, X., Yang, L.-X., Guo, R., Shi, Y., Hou, X., Yang, Z., *et al.* (2017). Atorvastatin attenuates plaque vulnerability by downregulation of EMMPRIN expression via COX-2/PGE2 pathway. *Exp. Ther. Med.* 13, 835–844. doi: 10.3892/etm.2017.4062.
- Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., *et al.* (2019). Atherosclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 5, 56. doi: 10.1038/s41572-019-0106-z.

- Lin, W., Wu, R. T., Wu, T., Khor, T.-O., Wang, H., and Kong, A.-N. (2008). Sulforaphane suppressed LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages through Nrf2 dependent pathway. *Biochem. Pharmacol.* 76, 967–973. doi: 10.1016/j.bcp.2008.07.036.
- Lin, Y. H., Lin, Y. J., Chang, T. H., Chang, Y. H., Lim, Y. P., Chung, J. G., & Hsieh, W. T. (2020). Pipoxolan suppresses the inflammatory factors of NF- $\kappa$ B, AP-1, and STATs, but activates the antioxidative factor Nrf2 in LPS-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells. *Environ. Toxicol.* 35(12), 1352–1363. doi.org/10.1002/tox.23000
- Lin, Y., Xie, Y., Hao, Z., Bi, H., Liu, Y., Yang, X., *et al.* (2021). Protective Effect of Uric Acid on ox-LDL-Induced HUVECs Injury via Keap1-Nrf2-ARE Pathway. *J. Immunol. Res.* 2021, 1–19. doi: 10.1155/2021/5151168.
- Liguori, T. T. A., Liguori, G. R., Moreira, L. F. P., and Harmsen, M. C. (2019). Adipose tissue-derived stromal cells' conditioned medium modulates endothelial-mesenchymal transition induced by IL-1 $\beta$ /TGF- $\beta$ 2 but does not restore endothelial function. *Cell. Prolif.* 52. doi: 10.1111/cpr.12629.
- Ling, Y. H., Krishnan, S. M., Chan, C. T., Diep, H., Ferens, D., Chin-Dusting, J., *et al.* (2017). Anakinra reduces blood pressure and renal fibrosis in one kidney/DOCA/salt-induced hypertension. *Pharmacol. Res.* 116, 77–86. doi: 10.1016/j.phrs.2016.12.015.
- Liu, L., Gu, H., Liu, H., Jiao, Y., Li, K., Zhao, Y., *et al.* (2014). Protective effect of resveratrol against IL-1 $\beta$ -induced inflammatory response on human osteoarthritic chondrocytes partly via the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling pathway: An “in vitro study.” *Int. J. Mol. Sci.* 15, 6925–6940. doi: 10.3390/ijms15046925.
- Liu, S., Pi, J., and Zhang, Q. (2022). Signal amplification in the KEAP1-NRF2-ARE antioxidant response pathway. *Redox Biol.* 54, 102389. doi: 10.1016/j.redox.2022.102389.
- Liu, T., Lv, Y.-F., Zhao, J.-L., You, Q.-D., and Jiang, Z.-Y. (2021). Regulation of Nrf2 by phosphorylation: Consequences for biological function and therapeutic implications. *Free Radic. Biol. Med.* 168, 129–141. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.034.
- Liu, X., Peyton, K., Ensenat, D., Wang, H., Hannink, M., Alam, J., *et al.* (2007). Nitric oxide stimulates heme oxygenase-1 gene transcription via the Nrf2/ARE complex to promote vascular smooth muscle cell survival. *Cardiovasc Res.* 75, 381–389. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.03.004.
- Liu, X., Zhang, X., Ding, Y., Zhou, W., Tao, L., Lu, P., *et al.* (2017). Nuclear Factor E2-Related Factor-2 Negatively Regulates NLRP3 Inflammasome Activity by Inhibiting Reactive Oxygen Species-Induced NLRP3 Priming. *Antiox. Redox Signal* 26, 28–43. doi: 10.1089/ars.2015.6615.
- Liu, Y., Sinha, S., McDonald, O. G., Shang, Y., Hoofnagle, M. H., and Owens, G. K. (2005). Kruppel-like Factor 4 Abrogates Myocardin-induced Activation of Smooth Muscle Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 280, 9719–9727. doi: 10.1074/jbc.M412862200.
- Liu, Z., Xu, S., Ji, Z., Xu, H., Zhao, W., Xia, Z., *et al.* (2020). Mechanistic study of mtROS-JNK-SOD2 signaling in bupivacaine-induced neuron oxidative stress. *Aging* 12, 13463–13476. doi: 10.18632/aging.103447.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Loh, Y., Tan, C., Ch'ng, Y., Yeap, Z., Ng, C., and Yam, M. (2018). Overview of the Microenvironment of Vasculature in Vascular Tone Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 120. doi: 10.3390/ijms19010120.

- Lopes, P. D. D., De Assis, N., De Araújo, N. F., Moreno, O. L. M., Jorge, K. T. D. O. S., E Castor, M. G. M., *et al.* (2022). COX/iNOS dependence for angiotensin-II-induced endothelial dysfunction. *Peptides* 157, 170863. doi: 10.1016/j.peptides.2022.170863.
- Lopes, R. A., Neves, K. B., Tostes, R. C., Montezano, A. C., and Touyz, R. M. (2015). Downregulation of Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor and Associated Antioxidant Genes Contributes to Redox-Sensitive Vascular Dysfunction in Hypertension. *Hypertension* 66, 1240–1250. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06163.
- Lopez-Castejon, G., and Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 189–195. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.10.001.
- Loppnow, H., Werdan, K., and Buerke, M. (2008). Invited review: Vascular cells contribute to atherosclerosis by cytokine- and innate-immunity-related inflammatory mechanisms. *Innate Immun.* 14, 63–87. doi: 10.1177/1753425908091246.
- Lu, M.-H., Chao, C. F., Tsai, S.-H., Chen, J. Y., and Chang, L. T. (2006). Autocrine Effects of Endothelin on In Vitro Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells from Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats. *Clin. Exp. Hypertens.* 28, 463–474. doi: 10.1080/10641960600798747.
- Lu, Q.-B., Wan, M.-Y., Wang, P. Y., Zhang, C. X., Xu, D. Y., Liao, X., *et al.* (2018). Chicoric acid prevents PDGF-BB-induced VSMC dedifferentiation, proliferation and migration by suppressing ROS/NF $\kappa$ B/mTOR/P70S6K signaling cascade. *Redox Biol.* 14, 656–668. doi: 10.1016/j.redox.2017.11.012.
- Lu, Y. C., Yeh, W. C., and Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145–151. doi: 10.1016/j.cyto.2008.01.006.
- Luo, J.-F., Shen, X.-Y., Lio, C. K., Dai, Y., Cheng, C.-S., Liu, J.-X., *et al.* (2018). Activation of Nrf2/HO-1 Pathway by Nardochinoid C Inhibits Inflammation and Oxidative Stress in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages. *Front. Pharmacol.* 9, 911. doi: 10.3389/fphar.2018.00911.
- Maheswaranathan, M., Gole, H. K. A., Fernandez, I., Lassègue, B., Griendling, K. K., and San Martín, A. (2011). Platelet-derived Growth Factor (PDGF) Regulates Slingshot Phosphatase Activity via Nox1-dependent Auto-dephosphorylation of Serine 834 in Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem* 286, 35430–35437. doi: 10.1074/jbc.M111.268284.
- Mahmoud, A. M., Wilkinson, F. L., Jones, A. M., Wilkinson, J. A., Romero, M., Duarte, J., *et al.* (2017). A novel role for small molecule glycomimetics in the protection against lipid-induced endothelial dysfunction: Involvement of Akt/eNOS and Nrf2/ARE signaling. *BBA - Gen Subj.* 1861, 3311–3322. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.08.013.
- Mai, W., and Liao, Y. (2020). Targeting IL-1 $\beta$  in the Treatment of Atherosclerosis. *Front. Immunol.* 11. doi: 10.3389/fimmu.2020.589654.
- Malekmohammad, K., Sewell, R. D. E., and Rafieian-Kopaei, M. (2019). Antioxidants and Atherosclerosis: Mechanistic Aspects. *Biomolecules* 9, 301. doi: 10.3390/biom9080301.
- Manea, A., Tanase, L. I., Raicu, M., and Simionescu, M. (2010). JAK/STAT Signaling Pathway Regulates Nox1 and Nox4-Based NADPH Oxidase in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 105–112. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.193896.
- Manning, A. M., and Davis, R. J. (2003). Targeting JNK for therapeutic benefit: from junk to gold? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 554–565. doi: 10.1038/nrd1132.

- Marchio, P., Guerra-Ojeda, S., Vila, J. M., Aldasoro, M., Victor, V. M., and Mauricio, M. D. (2019). Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019, 1–32. doi: 10.1155/2019/8563845.
- Martín, A., Pérez-Girón, J. V., Hernanz, R., Palacios, R., Briones, A. M., Fortuño, A., *et al.* (2012). Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activation reduces cyclooxygenase-2 expression in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress. *J. Hypertens.* 30, 315–326. doi: 10.1097/HJH.0b013e32834f043b.
- Martínez-Casales, M., Hernanz, R., and Alonso, M. J. (2021). Vascular and Macrophage Heme Oxygenase-1 in Hypertension: A Mini-Review. *Front. Physiol.* 12, 643435. doi: 10.3389/fphys.2021.643435.
- Martínez-Revelles, S., Avendaño, M. S., García-Redondo, A. B., Álvarez, Y., Aguado, A., Pérez-Girón, J. V., *et al.* (2013). Reciprocal Relationship Between Reactive Oxygen Species and Cyclooxygenase-2 and Vascular Dysfunction in Hypertension. *Antiox. Redox Signal.* 18, 51–65. doi: 10.1089/ars.2011.4335.
- Matsunaga, N., Tsuchimori, N., Matsumoto, T., and Ii, M. (2011). TAK-242 (Resatorvid), a Small-Molecule Inhibitor of Toll-Like Receptor (TLR) 4 Signaling, Binds Selectively to TLR4 and Interferes with Interactions between TLR4 and Its Adaptor Molecules. *Mol. Pharmacol.* 79, 34–41. doi: 10.1124/mol.110.068064.
- McCulloch, Christopher. A., Downey, G. P., and El-Gabalawy, H. (2006). Signalling platforms that modulate the inflammatory response: new targets for drug development. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 5, 864–876. doi: 10.1038/nrd2109.
- Medina, M. V., Sapochnik, D., Garcia Solá, M., and Coso, O. (2020). Regulation of the Expression of Heme Oxygenase-1: Signal Transduction, Gene Promoter Activation, and beyond. *Antiox. Redox Signal.* 32, 1033–1044. doi: 10.1089/ars.2019.7991.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428–435. doi: 10.1038/nature07201.
- Melton, E., and Qiu, H. (2021). Interleukin-1 $\beta$  in multifactorial hypertension: Inflammation, vascular smooth muscle cell and extracellular matrix remodeling, and non-coding rna regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 22. doi: 10.3390/ijms22168639.
- Meng, D., Lv, D.-D., and Fang, J. (2008). Insulin-like growth factor-I induces reactive oxygen species production and cell migration through Nox4 and Rac1 in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* 80, 299–308. doi: 10.1093/cvr/cvn173.
- Meng, Z., Yan, C., Deng, Q., Gao, D. F., & Niu, X. L. (2013). Curcumin inhibits LPS-induced inflammation in rat vascular smooth muscle cells in vitro via ROS-relative TLR4-MAPK/NF- $\kappa$ B pathways. *Acta. Pharmacol. Sin.* 34(7), 901–911. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.24>
- Mendes, A. F., Caramona, M. M., Carvalho, A. P., and Lopes, M. C. (2003). Hydrogen peroxide mediates interleukin-1 $\beta$ -induced AP-1 activation in articular chondrocytes: implications for the regulation of iNOS expression. *Cell Biol. Toxicol.* 19(4), 203–214. doi.org/10.1023/b:cbto.0000003730.21261.f
- Merhisoussi, F., Kwak, B., Magne, D., Chadjichristos, C., Berti, M., Pelli, G., *et al.* (2005). Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res.* 66, 583–593. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.01.008.
- Michelsen, K. S., Wong, M. H., Shah, P. K., Zhang, W., Yano, J., Doherty, T. M., *et al.* (2004). Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 10679–10684. doi: 10.1073/pnas.0403249101.

- Miller, F. J., Filali, M., Huss, G. J., Stanic, B., Chamseddine, A., Barna, T. J., *et al.* (2007). Cytokine Activation of Nuclear Factor  $\kappa$ B in Vascular Smooth Muscle Cells Requires Signaling Endosomes Containing Nox1 and CIC-3. *Circ. Res.* 101, 663–671. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.151076.
- Mills, E. L., Ryan, D. G., Prag, H. A., Dikovskaya, D., Menon, D., Zaslona, Z., *et al.* (2018). Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. *Nature* 556, 113–117. doi: 10.1038/nature25986.
- Mimura, J., and Itoh, K. (2015). Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis. *Free Radic. Biol. Med.* 88, 221–232. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.019.
- Mitchell, J. A., Kirkby, N. S., Ahmetaj-Shala, B., Armstrong, P. C., Crescente, M., Ferreira, P., *et al.* (2021). Cyclooxygenases and the cardiovascular system. *Pharmacol. Ther.* 217, 107624. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107624.
- Miura, H., Bosnjak, J. J., Ning, G., Saito, T., Miura, M., and Gutterman, D. D. (2003). Role for Hydrogen Peroxide in Flow-Induced Dilatation of Human Coronary Arterioles. *Circ. Res.* 92. doi: 10.1161/01.RES.0000054200.44505.AB.
- Miyabe, M., Nakamura, N., Saiki, T., Miyabe, S., Ito, M., Sasajima, S., *et al.* (2022). Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharides Promote Proliferation and Migration of Human Vascular Smooth Muscle Cells through the MAPK/TLR4 Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 125. doi: 10.3390/ijms24010125.
- Miyata, R., Hiraiwa, K., Cheng, J. C., Bai, N., Vincent, R., Francis, G. A., *et al.* (2013). Statins attenuate the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction induced by exposure to urban particulate matter (PM10). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 1–11. doi: 10.1016/j.taap.2013.05.033.
- Mohan, S., and Gupta, D. (2018). Crosstalk of toll-like receptors signaling and Nrf2 pathway for regulation of inflammation. *Biomed. Pharmacother.* 108, 1866–1878. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.019.
- Moloney, J. N., and Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Sem. Cell. Dev. Biol.* 80, 50–64. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.05.023.
- Montezano, A. C., Nguyen Dinh Cat, A., Rios, F. J., and Touyz, R. M. (2014). Angiotensin II and Vascular Injury. *Curr. Hypertens. Rep.* 16, 431. doi: 10.1007/s11906-014-0431-2.
- Montezano, A. C., and Touyz, R. M. (2012). Reactive Oxygen Species and Endothelial Function - Role of Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Nox Family Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases: endothelial NOXs and reactive oxygen species. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 110, 87–94. doi: 10.1111/j.1742-7843.2011.00785.x.
- Moreau, K., Luo, S., and Rubinsztein, D. C. (2010). Cytoprotective roles for autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 206–211. doi: 10.1016/j.ceb.2009.12.002.
- Morimoto, K., Shirata, N., Taketomi, Y., Tsuchiya, S., Segi-Nishida, E., Inazumi, T., *et al.* (2014). Prostaglandin E2–EP3 Signaling Induces Inflammatory Swelling by Mast Cell Activation. *J. Immunol.* 192, 1130–1137. doi: 10.4049/jimmunol.1300290.
- Mulvany, M. J., and Halpern, W. (1977). Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ. Res.* 41, 19–26. doi: 10.1161/01.RES.41.1.19.
- Muñoz, M., López-Oliva, M. E., Rodríguez, C., Martínez, M. P., Sáenz-Medina, J., Sánchez, A., *et al.* (2020). Differential contribution of Nox1, Nox2 and Nox4 to kidney vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in obesity. *Redox Biol.* 28, 101330. doi: 10.1016/j.redox.2019.101330.

- Muñoz, M., Sánchez, A., Pilar Martínez, M., Benedito, S., López-Oliva, M.-E., García-Sacristán, A., *et al.* (2015). COX-2 is involved in vascular oxidative stress and endothelial dysfunction of renal interlobar arteries from obese Zucker rats. *Free Radic. Biol. Med.* 84, 77–90. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.024.
- Muraki, C., Ohga, N., Hida, Y., Nishihara, H., Kato, Y., Tsuchiya, K., *et al.* (2012). Cyclooxygenase-2 inhibition causes antiangiogenic effects on tumor endothelial and vascular progenitor cells. *Int. J. Cancer* 130, 59–70. doi: 10.1002/ijc.25976.
- Murdoch, C. E., Alom-Ruiz, S. P., Wang, M., Zhang, M., Walker, S., Yu, B., *et al.* (2011). Role of endothelial Nox2 NADPH oxidase in angiotensin II-induced hypertension and vasomotor dysfunction. *Basic. Res. Cardiol.* 106, 527–538. doi: 10.1007/s00395-011-0179-7.
- Nagayama, K., Kyotani, Y., Zhao, J., Ito, S., Ozawa, K., Bolstad, F. A., *et al.* (2015). Exendin-4 Prevents Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Migration by Angiotensin II via the Inhibition of ERK1/2 and JNK Signaling Pathways. *PLoS ONE* 10, e0137960. doi: 10.1371/journal.pone.0137960.
- Naidu, S., Muramatsu, A., Saito, R., Asami, S., Honda, T., Hosoya, T., *et al.* (2018). C151 in KEAP1 is the main cysteine sensor for the cyanoenone class of NRF2 activators, irrespective of molecular size or shape. *Sci. Rep.* 8, 8037. doi: 10.1038/s41598-018-26269-9.
- Nakashima, T., Umemoto, S., Yoshimura, K., Matsuda, S., Itoh, S., Murata, T., *et al.* (2015). TLR4 is a critical regulator of angiotensin II-induced vascular remodeling: the roles of extracellular SOD and NADPH oxidase. *Hypertens. Res.* 38, 649–655. doi: 10.1038/hr.2015.55.
- Nazarewicz, R. R., Dikalova, A. E., Bikineyeva, A., and Dikalov, S. I. (2013). Nox2 as a potential target of mitochondrial superoxide and its role in endothelial oxidative stress. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 305, H1131–H1140. doi: 10.1152/ajpheart.00063.2013.
- Nguyen, T., Sherratt, P. J., Huang, H.-C., Yang, C. S., and Pickett, C. B. (2003). Increased Protein Stability as a Mechanism That Enhances Nrf2-mediated Transcriptional Activation of the Antioxidant Response Element. *J. Biol. Chem.* 278, 4536–4541. doi: 10.1074/jbc.M207293200.
- Nishino, T., Okamoto, K., Eger, B. T., Pai, E. F., and Nishino, T. (2008). Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase: Mammalian xanthine oxidoreductase. *FEBS J.* 275, 3278–3289. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06489.x.
- Nickenig, G., Baudler, S., Müller, C., Werner, C., Werner, N., Welzel, H., *et al.* (2002). Redox-sensitive vascular smooth muscle cell proliferation is mediated by GKLf and Id3 in vitro and in vivo. *FASEB J.* 16, 1077–1086. doi: 10.1096/fj.01-0570com.
- Nørrelund, H., Christensen, K. L., Samani, N. J., Kimber, P., Mulvany, M. J., and Korsgaard, N. (1994). Early narrowed afferent arteriole is a contributor to the development of hypertension. *Hypertension* 24, 301–308. doi:10.1161/01.HYP.24.3.301.
- Norlander, A. E., Madhur, M. S., and Harrison, D. G. (2018). The immunology of hypertension. *J. Exp. Med.* 215, 21–33. doi: 10.1084/jem.20171773.
- Nosalski, R., and Guzik, T. J. (2017). Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease: PVAT inflammation in vascular disease. *Br. J. Pharmacol.* 174, 3496–3513. doi: 10.1111/bph.13705.
- Nunes, K. P., de Oliveira, A. A., Mowry, F. E., and Biancardi, V. C. (2019). Targeting toll-like receptor 4 signalling pathways: can therapeutics pay the toll for hypertension? *Br. J. Pharmacol.* 176, 1864–1879. doi: 10.1111/bph.14438.
- Ochoa, C. D., Wu, R. F., and Terada, L. S. (2018). ROS signaling and ER stress in cardiovascular disease. *Mol. Aspects Med.* 63, 18–29. doi: 10.1016/j.mam.2018.03.002.

- Ohnaka, K., Numaguchi, K., Yamakawa, T., and Inagami, T. (2000). Induction of Cyclooxygenase-2 by Angiotensin II in Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Hypertension* 35, 68–75. doi: 10.1161/01.HYP.35.1.68.
- Ono, Y., Maejima, Y., Saito, M., Sakamoto, K., Horita, S., Shimomura, K., *et al.* (2020). TAK-242, a specific inhibitor of Toll-like receptor 4 signalling, prevents endotoxemia-induced skeletal muscle wasting in mice. *Sci. Rep.* 10, 694. doi: 10.1038/s41598-020-57714-3.
- Orozco, L. D., Kapturczak, M. H., Barajas, B., Wang, X., Weinstein, M. M., Wong, J., *et al.* (2007). Heme Oxygenase-1 Expression in Macrophages Plays a Beneficial Role in Atherosclerosis. *Circ. Res.* 100, 1703–1711. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.151720.
- Owens, G. K. (1995). Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* 75, 487–517. doi: 10.1152/physrev.1995.75.3.487.
- Padmavathi, G., and Ramkumar, K. M. (2021). MicroRNA mediated regulation of the major redox homeostasis switch, Nrf2, and its impact on oxidative stress-induced ischemic/reperfusion injury. *Arch. Biochem. Biophys.* 698, 108725. doi: 10.1016/j.abb.2020.108725.
- Pajares, M., Jiménez-Moreno, N., García-Yagüe, Á. J., Escoll, M., De Ceballos, M. L., Van Leuven, F., *et al.* (2016). Transcription factor NFE2L2/NRF2 is a regulator of macroautophagy genes. *Autophagy* 12, 1902–1916. doi: 10.1080/15548627.2016.1208889.
- Palacios-Ramírez, R., Hernanz, R., Martín, A., Pérez-Girón, J. V., Barrús, M. T., González-Carnicero, Z., *et al.* (2019). Pioglitazone Modulates the Vascular Contractility in Hypertension by Interference with ET-1 Pathway. *Sci. Rep.* 9, 1–18. doi: 10.1038/s41598-019-52839-6.
- Palombo, C., and Kozakova, M. (2016). Arterial stiffness, atherosclerosis and cardiovascular risk: Pathophysiologic mechanisms and emerging clinical indications. *Vascul. Pharmacol.* 77, 1–7. doi: 10.1016/j.vph.2015.11.083.
- Paravicini, T. M., Miller, A. A., Drummond, G. R., and Sobey, C. G. (2006). Flow-Induced Cerebral Vasodilatation *in Vivo* Involves Activation of Phosphatidylinositol-3 Kinase, NADPH-Oxidase, and Nitric Oxide Synthase. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* 26, 836–845. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600235.
- Paravicini, T. M., and Touyz, R. M. (2006). Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res.* 71, 247–258. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.05.001.
- Park, C., Cha, H. J., Lee, H., Kim, G. Y., and Choi, Y. H. (2021). The regulation of the TLR4/NF- $\kappa$ B and Nrf2/HO-1 signaling pathways is involved in the inhibition of lipopolysaccharide-induced inflammation and oxidative reactions by morroniside in RAW 264.7 macrophages. *Arch. Biochem. Biophys.* 706, 108926. doi: 10.1016/j.abb.2021.108926.
- Park, H., Chun, J., Jung, H., Choi, C., and Bae, Y. (2006). Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 72, 447–455. doi: 10.1016/j.cardiores.2006.09.012.
- Park, J. S., and Kim, H. S. (2014). Regulation of hemeoxygenase-1 gene expression by Nrf2 and c-Jun in tertiary butylhydroquinone-stimulated rat primary astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 447, 672–677. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.073.
- Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T. B., Xu, B.-E., Karandikar, M., Berman, K., *et al.* (2001). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. 22. *Endocr. Rev.* 22(2), 153–183. doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428

- Peng, T., Lu, X., and Feng, Q. (2005). NADH oxidase signaling induces cyclooxygenase-2 expression during lipopolysaccharide stimulation in cardiomyocytes. *FASEB J.* 19, 1–25. doi: 10.1096/fj.04-2289fje.
- Percie Du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., *et al.* (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 18, e3000410. doi: 10.1371/journal.pbio.3000410.
- Pereira, A., Fernandes, R., Crisóstomo, J., Seica, R. M., and Sena, C. M. (2017). The Sulforaphane and pyridoxamine supplementation normalize endothelial dysfunction associated with type 2 diabetes. *Sci. Rep.* 7, 14357. doi: 10.1038/s41598-017-14733-x.
- Pérez-Girón, J. V., Palacios, R., Martín, A., Hernanz, R., Aguado, A., Martínez-Revelles, S., *et al.* (2014). Pioglitazone reduces angiotensin II-induced COX-2 expression through inhibition of ROS production and ET-1 transcription in vascular cells from spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 306, H1582–H1593. doi: 10.1152/ajpheart.00924.2013.
- Pescatore, L. A., Bonatto, D., Forti, F. L., Sadok, A., Kovacic, H., and Laurindo, F. R. M. (2012). Protein Disulfide Isomerase Is Required for Platelet-derived Growth Factor-induced Vascular Smooth Muscle Cell Migration, Nox1 NADPH Oxidase Expression, and RhoGTPase Activation. *J. Biol. Chem.* 287, 29290–29300. doi: 10.1074/jbc.M112.394551.
- Pfeiler, S., Winkels, H., Kelm, M., and Gerdes, N. (2019). IL-1 family cytokines in cardiovascular disease. *Cytokine* 122. doi: 10.1016/j.cyto.2017.11.009.
- Pi, Y., Zhang, L., Li, B., Guo, L., Cao, X., Gao, C., *et al.* (2013). Inhibition of reactive oxygen species generation attenuates TLR4-mediated proinflammatory and proliferative phenotype of vascular smooth muscle cells. *Lab. Invest.* 93, 880–887. doi: 10.1038/labinvest.2013.79.
- Piccini, A. M., and Midwood, K. S. (2010). DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. *Mediators of Inflamm.* 2010, 1–21. doi: 10.1155/2010/672395.
- Piccoli, P., and Rubartelli, A. (2013). The secretion of IL-1 $\beta$  and options for release. *Semin. Immunol.* 25, 425–429. doi: 10.1016/j.smim.2013.10.007.
- Porto, A., Palumbo, R., Pieroni, M., Aprigliano, G., Chiesa, R., Sanvito, F., *et al.* (2006). Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques secrete and proliferate in response to high mobility group box 1 protein. *FASEB J.* 20, 2565–2566. doi: 10.1096/fj.06-5867fje.
- Pugsley, M. K., and Tabrizchi, R. (2000). The vascular system. An overview of structure and function. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 44(2), 333–340. doi.org/10.1016/s1056-8719(00)00125-8.
- Qi, H. M., Cao, Q., and Liu, Q. (2021). TLR4 regulates vascular smooth muscle cell proliferation in hypertension via modulation of the NLRP3 inflammasome. *Am. J. Transl. Res.* 13, 314–325.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., and Flower, R. J. (2020). Rang y Dale. Farmacología. 9th ed. Elsevier.
- Ren, D., Villeneuve, N. F., Jiang, T., Wu, T., Lau, A., Toppin, H. A., *et al.* (2011). Brusatol enhances the efficacy of chemotherapy by inhibiting the Nrf2-mediated defense mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 1433–1438. doi: 10.1073/pnas.1014275108.
- Ren, J., Bi, Y., Sowers, J. R., Hetz, C., and Zhang, Y. (2021). Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cardiovascular diseases. *Nat. Rev. Cardiol.* 18, 499–521. doi: 10.1038/s41569-021-00511-w.
- Renna, N. F., De Las Heras, N., and Miatello, R. M. (2013a). Pathophysiology of Vascular Remodeling in Hypertension. *Int. J. Hypertens.* 2013, 1–7. doi: 10.1155/2013/808353.



- Renna, N. F., Diez, E. R., Lembo, C., and Miatello, R. M. (2013b). Role of Cox-2 in Vascular Inflammation: An Experimental Model of Metabolic Syndrome. *Mediators Inflamm.* 2013, 1–10. doi: 10.1155/2013/513251.
- Richardson, B. G., Jain, A. D., Speltz, T. E., and Moore, T. W. (2015). Non-electrophilic modulators of the canonical Keap1/Nrf2 pathway. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 2261–2268. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.04.019.
- Rizzoni, D., and Agabiti-Rosei, E. (2012). Structural abnormalities of small resistance arteries in essential hypertension. *Intern. Emerg. Med.* 7, 205–212. doi: 10.1007/s11739-011-0548-0.
- Robledinos-Antón, N., Fernández-Ginés, R., Manda, G., and Cuadrado, A. (2019). Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019, 9372182. doi: 10.1155/2019/9372182.
- Rojo, A. I., Innamorato, N. G., Martín-Moreno, A. M., De Ceballos, M. L., Yamamoto, M., and Cuadrado, A. (2010). Nrf2 regulates microglial dynamics and neuroinflammation in experimental Parkinson's disease: Nrf2 Regulates Microglial Dynamics. *Glia* 58, 588–598. doi: 10.1002/glia.20947.
- Romacho, T., Valencia, I., Ramos-González, M., Vallejo, S., López-Esteban, M., Lorenzo, O., *et al.* (2020). Visfatin/eNamt induces endothelial dysfunction in vivo: a role for Toll-Like Receptor 4 and NLRP3 inflammasome. *Sci. Rep.* 10, 5386. doi: 10.1038/s41598-020-62190-w.
- Rong, S., Yang, C., Wang, F., Wu, Y., Sun, K., Sun, T., *et al.* (2022). Amentoflavone Exerts Anti-Neuroinflammatory Effects by Inhibiting TLR4/MyD88/NF-κB and Activating Nrf2/HO-1 Pathway in Lipopolysaccharide-Induced BV2 Microglia. *Mediators Inflamm.* 2022, 1–12. doi: 10.1155/2022/5184721.
- Roshan, M. H. K., Tambo, A., and Pace, N. P. (2016). The Role of TLR2, TLR4, and TLR9 in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Int. J. Inflamm.* 2016, 1–11. doi.org/10.1155/2016/1532832
- Rushworth, S. A., Chen, X. L., Mackman, N., Ogborne, R. M., and O'Connell, M. A. (2005). Lipopolysaccharide-Induced Heme Oxygenase-1 Expression in Human Monocytic Cells Is Mediated via Nrf2 and Protein Kinase C. *J. Immunol.* 175, 4408–4415. doi: 10.4049/jimmunol.175.7.4408.
- Rushworth, S. A., MacEwan, D. J., and O'Connell, M. A. (2008). Lipopolysaccharide-Induced Expression of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 and Heme Oxygenase-1 Protects against Excessive Inflammatory Responses in Human Monocytes. *J. Immunol.* 181, 6730–6737. doi: 10.4049/jimmunol.181.10.6730.
- Ryter, S. W. (2022). Heme Oxygenase-1: An Anti-Inflammatory Effector in Cardiovascular, Lung, and Related Metabolic Disorders. *Antioxidants* 11, 555. doi: 10.3390/antiox11030555.
- San José, G., Fortuño, A., Moreno, M. U., Robador, P. A., Bidegain, J., Varo, N., *et al.* (2009). The angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism is associated with phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide generation: potential implication in hypertension. *Clin. Sci.* 116, 233–240. doi: 10.1042/CS20080057.
- Sánchez-Duffhues, G., García de Vinuesa, A., van de Pol, V., Geerts, M. E., de Vries, M. R., Janson, S. G. T., *et al.* (2019). Inflammation induces endothelial-to-mesenchymal transition and promotes vascular calcification through downregulation of BMP2. *J. Pathol.* 247, 333–346. doi: 10.1002/path.5193.
- Satta, S., Mahmoud, A. M., Wilkinson, F. L., Yvonne Alexander, M., and White, S. J. (2017). The Role of Nrf2 in Cardiovascular Function and Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. doi: 10.1155/2017/9237263.

- Sato, M., Yokoyama, U., Fujita, T., Okumura, S., and Ishikawa, Y. (2011). The Roles of Cytochrome P450 in Ischemic Heart Disease. *Curr. Drug Metab.* 12, 526–532. doi:10.2174/138920011795713715.
- Savoia, C., and Volpe, M. (2011). Angiotensin receptor modulation and cardiovascular remodeling. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 12, 381–384. doi: 10.1177/1470320311417750.
- Sawano, H., Haneda, M., Sugimoto, T., Inoki, K., Koya, D., and Kikkawa, R. (2002). 15-Deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 inhibits IL-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase-2 expression in mesangial cells. *Kidney Int.* 61, 1957–1967. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00351.x.
- Schiffrin, E. L. (2004). Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am. J. Hypertens.* 17, 1192–1200. doi: 10.1016/j.amjhyper.2004.05.023.
- Schiffrin, E. L. (2012). Vascular Remodeling in Hypertension: Mechanisms and Treatment. *Hypertension* 59, 367–374. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.187021
- Schönbeck, U., Sukhova, G. K., Graber, P., Coulter, S., and Libby, P. (1999). Augmented Expression of Cyclooxygenase-2 in Human Atherosclerotic Lesions. *Am. J. Pathol.* 155, 1281–1291. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65230-3
- Schröder, K., Zhang, M., Benkhoff, S., Mieth, A., Pliquett, R., Kosowski, J., *et al.* (2012). Nox4 Is a Protective Reactive Oxygen Species Generating Vascular NADPH Oxidase. *Circ. Res.* 110, 1217–1225. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.267054.
- Schuchardt, M., Herrmann, J., Tolle, M., & van der Giet, M. (2017). Xanthine Oxidase and its Role as Target in Cardiovascular Disease: Cardiovascular Protection by Enzyme Inhibition?. *Cur. Pharm. Des.* 23(23), 3391–3404. doi.org/10.2174/1381612823666170417130115
- Senoner, T., and Dichtl, W. (2019). Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients* 11. doi: 10.3390/nu11092090.
- Shaito, A., Aramouni, K., Assaf, R., Parenti, A., Orekhov, A., Yazbi, A. E., *et al.* (2022). Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. *Front. Biosci. (Landmark Ed)* 27, 0105. doi: 10.31083/j.fbl2703105.
- Shankman, L. S., Gomez, D., Cherepanova, O. A., Salmon, M., Alencar, G. F., Haskins, R. M., *et al.* (2015). KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat. Med.* 21, 628–637. doi: 10.1038/nm.3866.
- Sharma, A., Rizky, L., Stefanovic, N., Tate, M., Ritchie, R. H., Ward, K. W., *et al.* (2017). The nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) activator dh404 protects against diabetes-induced endothelial dysfunction. *Cardiovasc. Diabetol.* 16, 33. doi: 10.1186/s12933-017-0513-y.
- Sharma, V., Mishra, M., Ghosh, S., Tewari, R., Basu, A., Seth, P., *et al.* (2007). Modulation of interleukin-1 $\beta$  mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: Implications in neuroprotection. *Brain Res. Bull.* 73, 55–63. doi: 10.1016/j.brainresbull.2007.01.016.
- Shaw, P., and Chattopadhyay, A. (2020). Nrf2–ARE signaling in cellular protection: Mechanism of action and the regulatory mechanisms. *J. Cell. Physiol.* 235, 3119–3130. doi: 10.1002/jcp.29219.
- Shawky, N. M., Pichavaram, P., Shehatou, G. S., Suddek, G. M., Gameil, N. M., *et al.* (2016). Sulforaphane Improves dysregulated metabolic profile and inhibits leptin-induced VSMC proliferation: Implications toward suppression of neointima formation after arterial injury in western diet-fed obese mice. *J. Nutr. Biochem.* 32, 73–84. doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.01.009

- Shen, W. C., Liang, C. J., Huang, T. M., Liu, C. W., Wang, S. H., Young, G. H., *et al.* (2016). Indoxyl sulfate enhances IL-1 $\beta$ -induced E-selectin expression in endothelial cells in acute kidney injury by the ROS/MAPKs/NF $\kappa$ B/AP-1 pathway. *Arch. Toxicol.* 90, 2779–2792. doi: 10.1007/s00204-015-1652-0.
- Sheehan, A. L., Carrell, S., Johnson, B., Stanic, B., Banfi, B., and Miller, F. J. (2011). Role for Nox1 NADPH oxidase in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 216, 321–326. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.028.
- Shi, J., Yang, Y., Cheng, A., Xu, G., and He, F. (2020). Metabolism of vascular smooth muscle cells in vascular diseases. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 319, H613–H631. doi: 10.1152/ajpheart.00220.2020.
- Shi, X., Li, Y., Hu, J., and Yu, B. (2016). Tert-butylhydroquinone attenuates the ethanol-induced apoptosis of and activates the Nrf2 antioxidant defense pathway in H9c2 cardiomyocytes. *Int. J. Mol. Med.* 38, 123–130. doi: 10.3892/ijmm.2016.2605.
- Shi, Y., and Vanhoutte, P. M. (2017). Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J. Diabetes.* 9, 434–449. doi: 10.1111/1753-0407.12521.
- Shin, S., Wakabayashi, J., Yates, M. S., Wakabayashi, N., Dolan, P. M., Aja, S., *et al.* (2009). Role of Nrf2 in prevention of high-fat diet-induced obesity by synthetic triterpenoid CDDO-Imidazolide. *Eur. J. Pharmacol.* 620, 138–144. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.08.022.
- Silva-Islas, C. A., and Maldonado, P. D. (2018). Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. *Pharmacol. Res.* 134, 92–99. doi: 10.1016/j.phrs.2018.06.013.
- Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., and Kukreti, S. (2019). Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules* 24, 1583. doi: 10.3390/molecules24081583.
- Stanic, B., Katsuyama, M., and Jr, F. J. M. (2011). An Oxidized Extracellular Redox State Increases Nox1 Expression and Proliferation in Vascular Smooth Muscle Cells via EGFR Activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30(11), 2234–2241. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207639
- Stenmark, K. R., Yeager, M. E., El Kasmi, K. C., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E. V., Li, M., *et al.* (2013). The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function. *Annu. Rev. Physiol.* 75, 23–47. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183802.
- Stroes, E., Kastelein, J., Cosentino, F., Erkelens, W., Wever, R., Koomans, H., *et al.* (1997). Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J. Clin. Invest.* 99, 41–46. doi: 10.1172/JCI119131.
- Subedi, L., Lee, J., Yumnam, S., Ji, E., and Kim, S. (2019). Anti-Inflammatory Effect of Sulforaphane on LPS-Activated Microglia Potentially through JNK/AP-1/NF- $\kappa$ B Inhibition and Nrf2/HO-1 Activation. *Cells* 8, 194. doi: 10.3390/cells8020194.
- Sun, H. J., Ren, X.-S., Xiong, X. Q., Chen, Y. Z., Zhao, M. X., Wang, J. J., *et al.* (2017). NLRP3 inflammasome activation contributes to VSMC phenotypic transformation and proliferation in hypertension. *Cell. Death. Dis.* 8, e3074–e3074. doi: 10.1038/cddis.2017.470.
- Sun, H.-J., Zhao, M.-X., Ren, X.-S., Liu, T.-Y., Chen, Q., Li, Y.-H., *et al.* (2016). Salusin- $\beta$  Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Intimal Hyperplasia After Vascular Injury via ROS/NF $\kappa$ B/MMP-9 Pathway. *Antiox. Redox Signal.* 24, 1045–1057. doi: 10.1089/ars.2015.6475.
- Sun, K., Luo, J., Jing, X., Xiang, W., Guo, J., Yao, X., *et al.* (2021). Hyperoside ameliorates the progression of osteoarthritis: An in vitro and in vivo study. *Phytomedicine* 80, 153387. doi: 10.1016/j.phymed.2020.153387.

- Swanson, K. V., Deng, M., and Ting, J. P.-Y. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* 19, 477–489. doi: 10.1038/s41577-019-0165-0.
- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
- Tan, S. M., Sharma, A., Stefanovic, N., Yuen, D. Y. C., Karagiannis, T. C., Meyer, C., *et al.* (2014). Derivative of Bardoxolone Methyl, dh404, in an Inverse Dose-Dependent Manner Lessens Diabetes-Associated Atherosclerosis and Improves Diabetic Kidney Disease. *Diabetes* 63, 3091–3103. doi: 10.2337/db13-1743.
- Tanabe, T., and Tohnai, N. (2002). Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 68–69, 95–114. doi: 10.1016/S0090-6980(02)00024-2.
- Tanaka, Y., Aleksunes, L. M., Yeager, R. L., Gyamfi, M. A., Esterly, N., Guo, G. L., *et al.* (2008). NF-E2-Related Factor 2 Inhibits Lipid Accumulation and Oxidative Stress in Mice Fed a High-Fat Diet. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 325, 655–664. doi: 10.1124/jpet.107.135822.
- Tanase, D. M., Apostol, A. G., Costea, C. F., Tarniceriu, C. C., Tudorancea, I., Maranduca, M. A., *et al.* (2022). Oxidative Stress in Arterial Hypertension (HTN): The Nuclear Factor Erythroid Factor 2-Related Factor 2 (Nrf2) Pathway, Implications and Future Perspectives. *Pharmaceutics* 14. doi: 10.3390/pharmaceutics14030534.
- Tang, R., Zheng, X.L., Callis, T. E., Stansfield, W. E., He, J., Baldwin, A. S., *et al.* (2008). Myocardin inhibits cellular proliferation by inhibiting NF- $\kappa$ B(p65)-dependent cell cycle progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 3362–3367. doi: 10.1073/pnas.0705842105.
- Tang, W. (2014a). Role of Nrf2 in chronic liver disease. *World J. Gastroenterol.* 20, 13079. doi: 10.3748/wjg.v20.i36.13079.
- Tang, X., Luo, Y.X., Chen, H.-Z., and Liu, D.P. (2014b). Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. *Front. Physiol.* 5. doi: 10.3389/fphys.2014.00175.
- Tang, X., Wang, H., Fan, L., Wu, X., Xin, A., Ren, H., *et al.* (2011). Luteolin inhibits Nrf2 leading to negative regulation of the Nrf2/ARE pathway and sensitization of human lung carcinoma A549 cells to therapeutic drugs. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 1599–1609. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.03.008.
- Tarumoto, T., Nagai, T., Ohmine, K., Miyoshi, T., Nakamura, M., Kondo, T., *et al.* (2004). Ascorbic acid restores sensitivity to imatinib via suppression of Nrf2-dependent gene expression in the imatinib-resistant cell line. *Exp. Hematol.* 32, 375–381. doi: 10.1016/j.exphem.2004.01.007.
- Tasoulas, J., Tsourouflis, G., and Theocharis, S. (2018). Neovascularization: an attractive but tricky target in thyroid cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* 22, 799–810. doi: 10.1080/14728222.2018.1513494.
- Tejero, J., Shiva, S., and Gladwin, M. T. (2019). Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation. *Physiol. Rev.* 99, 311–379. doi: 10.1152/physrev.00036.2017.
- Telliez, A., Furman, C., Pommery, N., and Henichart, J.-P. (2006). Mechanisms Leading to COX-2 Expression and COX-2 Induced Tumorigenesis: Topical Therapeutic Strategies Targeting COX-2 Expression and Activity. *Anticancer Agents Med. Chem.* 6, 187–208. doi: 10.2174/187152006776930891.
- Teng, X., Zhang, H., Snead, C., & Catravas, J. D. (2002). Molecular mechanisms of iNOS induction by IL-1 beta and IFN-gamma in rat aortic smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282(1), C144–C152. doi.org/10.1152/ajpcell.2002.282.1.C144
- Tesoriere, L., Attanzio, A., Allegra, M., Gentile, C., and Livrea, M. A. (2014). Indicaxanthin inhibits NADPH oxidase (NOX)-1 activation and NF- $\kappa$ B-dependent release of inflammatory mediators and prevents

- the increase of epithelial permeability in IL-1 $\beta$ -exposed Caco-2 cells. *Br. J. Nutr.* 111, 415–423. doi: 10.1017/S0007114513002663.
- Thimmulappa, R. K. (2006). Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J. Clin. Invest.* 116, 984–995. doi: 10.1172/JCI25790.
- Tonelli, C., Chio, I. I. C., and Tuveson, D. A. (2018). Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antiox. Redox Signal.* 29, 1727–1745. doi: 10.1089/ars.2017.7342.
- Tong, K. I., Katoh, Y., Kusunoki, H., Itoh, K., Tanaka, T., and Yamamoto, M. (2006). Keap1 Recruits Neh2 through Binding to ETGE and DLG Motifs: Characterization of the Two-Site Molecular Recognition Model. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2887–2900. doi: 10.1128/MCB.26.8.2887-2900.2006.
- Toniolo, A., Buccellati, C., Trenti, A., Trevisi, L., Carnevali, S., Sala, A., *et al.* (2015). Antiinflammatory and antioxidant effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated by natural sources in IL1 $\beta$ -treated human endothelial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 121, 190–198. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2015.09.004.
- Topal, G., Brunet, A., Walch, L., Boucher, J.-L., and David-Duflho, M. (2006). Mitochondrial Arginase II Modulates Nitric-Oxide Synthesis through Nonfreely Exchangeable L-Arginine Pools in Human Endothelial Cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 318, 1368–1374. doi: 10.1124/jpet.106.103747.
- Tousoulis, D., Kampoli, A.-M., Tentolouris Nikolaos Papageorgiou, C., and Stefanadis, C. (2012). The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 10, 4–18. doi: 10.2174/157016112798829760.
- Touyz, R. M., Alves-Lopes, R., Rios, F. J., Camargo, L. L., Anagnostopoulou, A., Arner, A., *et al.* (2018). Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovasc Res.* 114, 529–539. doi: 10.1093/cvr/cvy023.
- Touyz, R. M., and Montezano, A. C. (2015). “Hypertensive Vasculopathy,” *PanVascular Medicine*, ed. P. Lanzer (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 1595–1618. doi: 10.1007/978-3-642-37078-6\_51.
- Touyz, R. M., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Neves, K. B., Camargo, L. L., and Montezano, A. C. (2020). Oxidative Stress: A Unifying Paradigm in Hypertension. *Can. J. Cardiol.* 36, 659–670. doi: 10.1016/j.cjca.2020.02.081.
- Ulasov, A. V., Rosenkranz, A. A., Georgiev, G. P., and Sobolev, A. S. (2022). Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation. *Life Sci.* 291, 120111. doi: 10.1016/j.lfs.2021.120111.
- Vallejo, S., Palacios, E., Romacho, T., Villalobos, L., Peiró, C., and Sánchez-Ferrer, C. F. (2014). The interleukin-1 receptor antagonist anakinra improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc. Diabetol.* 13, 158. doi: 10.1186/s12933-014-0158-z.
- Vari, R., D’Archivio, M., Filesi, C., Carotenuto, S., Scaccocchio, B., Santangelo, C., *et al.* (2011). Protocatechuic acid induces antioxidant/detoxifying enzyme expression through JNK-mediated Nrf2 activation in murine macrophages. *J. Nutr. Biochem.* 22, 409–417. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.03.008.
- Vatner, S. F., Zhang, J., Vyzas, C., Mishra, K., Graham, R. M., and Vatner, D. E. (2021). Vascular Stiffness in Aging and Disease. *Front. Physiol.* 12, 762437. doi: 10.3389/fphys.2021.762437.
- Vaure, C., and Liu, Y. (2014). A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front. Immunol.* 5. doi: 10.3389/fimmu.2014.00316.

- Vera, T., Kelsen, S., and Stec, D. E. (2008). Kidney-Specific Induction of Heme Oxygenase-1 Prevents Angiotensin II Hypertension. *Hypertension* 52, 660–665. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.114884.
- Verma, K., Pant, M., Paliwal, S., Dwivedi, J., and Sharma, S. (2021). An Insight on Multicentric Signaling of Angiotensin II in Cardiovascular system: A Recent Update. *Front. Pharmacol.* 12, 734917. doi: 10.3389/fphar.2021.734917.
- Vijayan, V., Baumgart-Vogt, E., Naidu, S., Qian, G., and Immenschuh, S. (2011). Bruton's Tyrosine Kinase Is Required for TLR-Dependent Heme Oxygenase-1 Gene Activation via Nrf2 in Macrophages. *J. Immunol.* 187, 817–827. doi: 10.4049/jimmunol.1003631.
- Vila, E., and Salaices, M. (2005). Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 288, H1016–H1021. doi: 10.1152/ajpheart.00779.2004.
- Viridis, A. (2016). Impact of apocynin on vascular disease in hypertension. *Vascul. Pharmacol.* 87, 1–5. graydoi.org/10.1016/j.vph.2016.08.006
- Viridis, A., Bacca, A., Colucci, R., Duranti, E., Fornai, M., Materazzi, G., et al. (2013). Endothelial Dysfunction in Small Arteries of Essential Hypertensive Patients: Role of Cyclooxygenase-2 in Oxidative Stress Generation. *Hypertension* 62, 337–344. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00995.
- Visintin, A., Halmen, K. A., Khan, N., Monks, B. G., Golenbock, D. T., and Lien, E. (2006). MD-2 expression is not required for cell surface targeting of Toll-like receptor 4 (TLR4). *J. Leukoc. Biol.* 80, 1584–1592. doi: 10.1189/jlb.0606388.
- Wagenseil, J. E., and Mecham, R. P. (2009). Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiol. Rev.* 89, 957–989. doi: 10.1152/physrev.00041.2008.
- Wang, C., Luo, Z., Carter, G., Wellstein, A., Jose, P. A., Tomlinson, J., et al. (2018). Nrf2 prevents hypertension, increased ADMA, microvascular oxidative stress, and dysfunction in mice with two weeks of ANG II infusion. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 314, R399–R406. doi: 10.1152/ajpregu.00122.2017.
- Wang, G., Liang, R., Liu, T., Wang, L., Zou, J., Liu, N., et al. (2019). Opposing effects of IL-1 $\beta$ /COX-2/PGE2 pathway loop on islets in type 2 diabetes mellitus. *Endocr. J.* 66, 691–699. doi: 10.1507/endocrj.EJ19-0015.
- Wang, H., Yang, G., Tian, Y., Li, J., Meng, L., Jiang, X., et al. (2022). Sulforaphane inhibits angiotensin II-induced cardiomyocyte apoptosis by acetylation modification of Nrf2. *Aging* 14, 6740–6755. doi: 10.18632/aging.204247.
- Wang, K., Li, W., Yu, Q., Guo, B., Yang, B., Zhang, C., et al. (2017). High Mobility Group Box 1 Mediates Interferon- $\gamma$ -Induced Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Cell. Biochem.* 118, 518–529. doi: 10.1002/jcb.25682.
- Wang, R., Liang, L., Matsumoto, M., Iwata, K., Umemura, A., and He, F. (2023). Reactive Oxygen Species and NRF2 Signaling, Friends or Foes in Cancer? *Biomolecules* 13, 353. doi: 10.3390/biom13020353.
- Wang, X., Feuerstein, G. Z., Gu, J. L., Lysko, P. G., & Yue, T. L. (1995). Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 115(1), 89–98. doi.org/10.1016/0021-9150(94)05503-b
- Wang, X. J., Hayes, J. D., Higgins, L. G., Wolf, C. R., and Dinkova-Kostova, A. T. (2010). Activation of the NRF2 Signaling Pathway by Copper-Mediated Redox Cycling of Para- and Ortho-Hydroquinones. *Chem. Biol.* 17, 75–85. doi: 10.1016/j.chembiol.2009.12.013.

- Wang, X., and Khalil, R. A. (2018). Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease, in *Adv. Pharmacol.* 241–330. doi: 10.1016/bs.apha.2017.08.002.
- Wang, W. C., Xia, Y. M., Yang, B., Su, X. N., Chen, J. K., Li, W., & Jiang, T. (2017). Protective Effects of Tyrosol against LPS-Induced Acute Lung Injury via Inhibiting NF- $\kappa$ B and AP-1 Activation and Activating the HO-1/Nrf2 Pathways. *Biol. Pharma. Bull.* 40(5), 583–593. doi.org/10.1248/bpb.b16-00756
- Wang, Z., Kong, L., Kang, J., Vaughn, D. M., Bush, G. D., Walding, A. L., *et al.* (2011). Interleukin-1 $\beta$  induces migration of rat arterial smooth muscle cells through a mechanism involving increased matrix metalloproteinase-2 activity. *J. Surg. Res.* 169, 328–336. doi: 10.1016/j.jss.2009.12.010.
- Weber, A., Wasiliew, P., and Kracht, M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) pathway. *Sci. Signal.*, 3 (105), cm1. doi.org/10.1126/scisignal.3105cm1
- Wei, R., Enaka, M., and Muragaki, Y. (2019). Activation of KEAP1/NRF2/P62 signaling alleviates high phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells by suppressing reactive oxygen species production. *Sci. Rep.* 9, 1–13. doi: 10.1038/s41598-019-46824-2.
- Whitmarsh, A. J., and Davis, R. J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways: *J. Mol. Med.* 74, 589–607. doi: 10.1007/s001090050063.
- Widlansky, M. E., Price, D. T., Gokce, N., Eberhardt, R. T., Duffy, S. J., Holbrook, M., *et al.* (2003). Short- and Long-Term COX-2 Inhibition Reverses Endothelial Dysfunction in Patients With Hypertension. *Hypertension* 42, 310–315. doi: 10.1161/01.HYP.0000084603.93510.28.
- Wind, S., Beuerlein, K., Armitage, M. E., Taye, A., Kumar, A. H. S., Janowitz, D., *et al.* (2010). Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Aortas of Aged Spontaneously Hypertensive Rats by NOX1/2 Is Reversed by NADPH Oxidase Inhibition. *Hypertension* 56, 490–497. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.149187.
- Wingler, K., Wünsch, S., Kreutz, R., Rothermund, L., Paul, M., and Schmidt, H. H. (2001). Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1456–1464. doi: 10.1016/S0891-5849(01)00727-4.
- Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(6):1430-1442. doi:10.1161/01.atv.20.6.1430
- Wu, D., Jin, S., Lin, Z., Chen, R., Pan, T., Kang, X., *et al.* (2018). Sauchinone inhibits IL-1 $\beta$  induced catabolism and hypertrophy in mouse chondrocytes to attenuate osteoarthritis via Nrf2/HO-1 and NF- $\kappa$ B pathways. *Int. Immunopharmacol.* 62, 181–190. doi: 10.1016/j.intimp.2018.06.041.
- Wu, R., Duchemin, S., Laplante, M. A., Champlain, J. D., and Girouard, H. (2011). Cyclo-Oxygenase-2 Knockout Genotype in Mice Is Associated With Blunted Angiotensin II-Induced Oxidative Stress and Hypertension. *Am. J. Hypertens.* 24, 1239–1244. doi: 10.1038/ajh.2011.137.
- Wu, Y., Ding, Y., Ramprasath, T., & Zou, M. H. (2021). Oxidative Stress, GTPCH1, and Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling in Hypertension. *Antiox. Redox Signal.* 34(9), 750–764. doi.org/10.1089/ars.2020.8112
- Xia, Y., Zhang, X., An, P., Luo, J., and Luo, Y. (2023). Mitochondrial Homeostasis in VSMCs as a Central Hub in Vascular Remodeling. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 3483. doi: 10.3390/ijms24043483.
- Xiao, L., and Harrison, D. G. (2020). Inflammation in Hypertension. *Can. J. Cardiol.* 36, 635–647. doi: 10.1016/j.cjca.2020.01.013.

- Xu, M., Li, X. X., Wang, L., Wang, M., Zhang, Y., and Li, P. L. (2015). Contribution of Nrf2 to Atherogenic Phenotype Switching of Coronary Arterial Smooth Muscle Cells Lacking CD38 Gene. *Cell. Physiol. Biochem.* 37, 432–444. doi: 10.1159/000430366.
- Xu, S., Ilyas, I., Little, P. J., Li, H., Kamato, D., Zheng, X., *et al.* (2021). Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies. *Pharmacol. Rev.* 73, 924–967. doi: 10.1124/pharmrev.120.000096.
- Xu, X., Liu, X., Yang, Y., He, J., Jiang, M., Huang, Y., *et al.* (2020). Resveratrol exerts anti-osteoarthritic effect by inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway via the TLR4/Akt/FoxO1 axis in IL-1 $\beta$ -stimulated SW1353 cells. *Drug Des. Devel. Ther.* 14, 2079–2090. doi: 10.2147/DDDT.S244059.
- Xue, Y., Zhang, Y., Chen, L., Wang, Y., Lv, Z., Yang, L.-Q., *et al.* (2022). Citrulline protects against LPS-induced acute lung injury by inhibiting ROS/NLRP3-dependent pyroptosis and apoptosis via the Nrf2 signaling pathway. *Exp Ther Med* 24, 632. doi: 10.3892/etm.2022.11569.
- Yagishita, Y., Gatbonton-Schwager, T. N., McCallum, M. L., and Kensler, T. W. (2020). Current Landscape of NRF2 Biomarkers in Clinical Trials. *Antioxidants* 9, 716. doi: 10.3390/antiox9080716.
- Yamamoto, M., Kensler, T. W., & Motohashi, H. (2018). The KEAP1-NRF2 system: A thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis. *Physiol. Rev.* 98, 1169–1203. doi: 10.1152/physrev.00023.2017.
- Yamamoto, T., Suzuki, T., Kobayashi, A., Wakabayashi, J., Maher, J., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2008). Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Mol. Cell. Biol.* 28(8), 2758–2770. <https://doi.org/10.1128/MCB.01704-07>
- Yang G, Zhou X, Chen T, Deng Y, Yu D, Pan S, Song Y. (2015a). Hydroxysafflor yellow A inhibits lipopolysaccharide-induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor-4 pathway. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8(4):5295-302.
- Yang, H., Wang, H., Chavan, S. S., and Andersson, U. (2015b). High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1): The Prototypical Endogenous Danger Molecule. *Mol. Med.* 21, S6–S12. doi: 10.2119/molmed.2015.00087.
- Yang, H. L., Huang, P.-J., Liu, Y. R., Kumar, K. J. S., Hsu, L. S., Lu, T. L., *et al.* (2014a). *Toona sinensis* Inhibits LPS-Induced Inflammation and Migration in Vascular Smooth Muscle Cells via Suppression of Reactive Oxygen Species and NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 1–16. doi: 10.1155/2014/901315.
- Yang, J., Chen, L., Yang, J., Ding, J., Rong, H., Dong, W., and Li, X. (2012). High mobility group box-1 induces migration of vascular smooth muscle cells via TLR4-dependent PI3K/Akt pathway activation. *Mol. Biol. Rep.* 39(3), 3361–3367. doi.org/10.1007/s11033-011-1106-6
- Yang, K., Zhang, X. J., Cao, L. J., Liu, X. H., Liu, Z. H., Wang, X. Q., *et al.* (2014b). Toll-like receptor 4 mediates inflammatory cytokine secretion in smooth muscle cells induced by oxidized low-density lipoprotein. *PLoS ONE* 9. doi: 10.1371/journal.pone.0095935.
- Yang, M., Chen, Q., Mei, L., Wen, G., An, W., Zhou, X., *et al.* (2021). Neutrophil elastase promotes neointimal hyperplasia by targeting toll-like receptor 4 (TLR4)–NF- $\kappa$ B signalling. *Br. J. Pharmacol.* 178, 4048–4068. doi: 10.1111/bph.15583.
- Yang, W., Wang, Y., Zhang, C., Huang, Y., Yu, J., Shi, L., *et al.* (2022). Maresin1 Protect Against Ferroptosis-Induced Liver Injury Through ROS Inhibition and Nrf2/HO-1/GPX4 Activation. *Front. Pharmacol.* 13, 865689. doi: 10.3389/fphar.2022.865689.



- Yao, L., Hao, Y., Wen, G., Xiao, Q., Wu, P., Wang, J., *et al.* (2022). Induction of Heme Oxygenase-1 Modifies the Systemic Immunity and Reduces Atherosclerotic Lesion Development in ApoE Deficient Mice. *Front. Pharmacol.* 13, 809469. doi: 10.3389/fphar.2022.809469.
- Yerra, V., Negi, G., Sharma, S. S., and Kumar, A. (2013). Potential therapeutic effects of the simultaneous targeting of the Nrf2 and NF- $\kappa$ B pathways in diabetic neuropathy. *Redox Biol.* 394–397. doi: 10.1016/j.redox.2013.07.005.
- Yet, S. F., Layne, M. D., Liu, X., Chen, Y. H., Ith, B., Sibinga, N. E. S., *et al.* (2003). Absence of heme oxygenase-1 exacerbates atherosclerotic lesion formation and vascular remodeling. *FASEB J.* 17, 1759–1761. doi: 10.1096/fj.03-0187fje.
- Yin, Q., Jiang, D., Li, L., Yang, Y., Wu, P., Luo, Y., *et al.* (2017). LPS Promotes Vascular Smooth Muscle Cells Proliferation Through the TLR4/Rac1/Akt Signalling Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* 44, 2189–2200. doi: 10.1159/000486024.
- Yin, S., and Cao, W. (2015). Toll-Like Receptor Signaling Induces Nrf2 Pathway Activation through p62-Triggered Keap1 Degradation. *Mol. Cell. Biol.* 35, 2673–2683. doi: 10.1128/MCB.00105-15.
- Yoon, H. S., and Park, C. (2021). Chrysoeriol ameliorates COX-2 expression through NF- $\kappa$ B, AP-1 and MAPK regulation via the TLR4/MyD88 signaling pathway in LPS-stimulated murine macrophages. *Exp. Ther. Med.* 22, 718. doi: 10.3892/etm.2021.10150.
- Yoon, S. J., Yoon, Y. W., Lee, B. K., Kwon, H. M., Hwang, K. C., Kim, M., *et al.* (2009). Potential role of HMG CoA reductase inhibitor on oxidative stress induced by advanced glycation endproducts in vascular smooth muscle cells of diabetic vasculopathy. *Exp. Mol. Med.* 41, 802. doi: 10.3858/emm.2009.41.11.086.
- Youn, J. Y., Zhou, J., and Cai, H. (2015). Bone Morphogenic Protein 4 Mediates NOX1-Dependent eNOS Uncoupling, Endothelial Dysfunction, and COX2 Induction in Type 2 Diabetes Mellitus. *Mol. Endocrinol.* 29, 1123–1133. doi: 10.1210/ME.2014-1313.
- Zabini, D., Crnkovic, S., Xu, H., Tscherner, M., Ghanim, B., Klepetko, W., *et al.* (2015). High-mobility group box-1 induces vascular remodelling processes via c-Jun activation. *J. Cell. Mol. Med.* 19, 1151–1161. doi: 10.1111/jcmm.12519.
- Zakkar, M., Van Der Heiden, K., Luong, L. A., Chaudhury, H., Cuhlmann, S., Hamdulay, S. S., *et al.* (2009). Activation of Nrf2 in Endothelial Cells Protects Arteries From Exhibiting a Proinflammatory State. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1851–1857. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.193375.
- Zeng, C., Zhong, P., Zhao, Y., Kanchana, K., Zhang, Y., Khan, Z. A., *et al.* (2015). Curcumin protects hearts from FFA-induced injury by activating Nrf2 and inactivating NF- $\kappa$ B both in vitro and in vivo. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 79, 1–12. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.10.002.
- Zhang, D. D., and Hannink, M. (2003). Distinct Cysteine Residues in Keap1 Are Required for Keap1-Dependent Ubiquitination of Nrf2 and for Stabilization of Nrf2 by Chemopreventive Agents and Oxidative Stress. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8137–8151. doi: 10.1128/MCB.23.22.8137-8151.2003.
- Zhang, D. D., Lo, S.-C., Sun, Z., Habib, G. M., Lieberman, M. W., and Hannink, M. (2005). Ubiquitination of Keap1, a BTB-Kelch Substrate Adaptor Protein for Cul3, Targets Keap1 for Degradation by a Proteasome-independent Pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 30091–30099. doi: 10.1074/jbc.M501279200.
- Zhang, H., Zheng, F., Zhao, J., Guo, D., and Chen, X. (2013a). Genistein Inhibits ox-LDL-induced VCAM-1, ICAM-1 and MCP-1 Expression of HUVECs Through Heme Oxygenase-1. *Arch. Med. Res.* 44, 13–20. doi: 10.1016/j.arcmed.2012.12.001.

- Zhang, H. W., Zhang, T., Shen, B.-Z., Liu, M., and Liu, J.-R. (2012a). Toxicological Insight from AP-1 Silencing Study on Proliferation, Migration, and Dedifferentiation of Rat Vascular Smooth Muscle Cell. *Cardiovasc. Toxicol.* 12, 25–38. doi: 10.1007/s12012-011-9135-x.
- Zhang, J., Zou, F., Tang, J., Zhang, Q., Gong, Y., Wang, Q., *et al.* (2013b). Cyclooxygenase-2–Derived Prostaglandin E<sub>2</sub> Promotes Injury-Induced Vascular Neointimal Hyperplasia Through the E-prostanoid 3 Receptor. *Circ. Res.* 113, 104–114. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301033.
- Zhang, L. L., Gao, C. Y., Fang, C. Q., Wang, Y. J., Gao, D., Yao, G.-E., *et al.* (2011). PPAR attenuates intimal hyperplasia by inhibiting TLR4-mediated inflammation in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 92, 484–493. doi: 10.1093/cvr/cvr238.
- Zhang, Q., Feng, A., Zeng, M., Zhang, B., Shi, J., Lv, Y., *et al.* (2021). Chrysofenicol D protects mice against LPS-induced acute lung injury by inhibiting oxidative stress, inflammation, and apoptosis via TLR4-MAPKs/NF- $\kappa$ B signaling pathways. *Innate Immun.* 27, 514–524. doi: 10.1177/17534259211051069.
- Zhang, W. X., Tai, G.-J., Li, X. X., and Xu, M. (2019). Inhibition of neointima hyperplasia by the combined therapy of linagliptin and metformin via AMPK/Nox4 signaling in diabetic rats. *Free Radic. Biol. Med.* 143, 153–163. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.07.030.
- Zhang, Y., Murugesan, P., Huang, K., and Cai, H. (2020). NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets. *Nat. Rev. Cardiol.* 17, 170–194. doi: 10.1038/s41569-019-0260-8.
- Zhang, Z., Wang, M., Xue, S.-J., Liu, D.-H., and Tang, Y.-B. (2012b). Simvastatin Ameliorates Angiotensin II-Induced Endothelial Dysfunction Through Restoration of Rho-BH4-eNOS-NO Pathway. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 26, 31–40. doi: 10.1007/s10557-011-6351-3.
- Zhao, J., Niu, X., Yu, J., Xiao, X., Li, W., Zang, L., *et al.* (2020a). Poria cocos polysaccharides attenuated ox-LDL-induced inflammation and oxidative stress via ERK activated Nrf2/HO-1 signaling pathway and inhibited foam cell formation in VSMCs. *Int. Immunopharmacol.* 80, 106173. doi: 10.1016/j.intimp.2019.106173.
- Zhao, Q., Zhang, J., and Wang, H. (2015a). PGC-1 $\alpha$  limits angiotensin II-induced rat vascular smooth muscle cells proliferation via attenuating NOX1-mediated generation of reactive oxygen species. *Biosci. Rep.* 35, e00252. doi: 10.1042/BSR20150112.
- Zhao, S., Cheng, C. K., Zhang, C.-L., and Huang, Y. (2021). Interplay Between Oxidative Stress, Cyclooxygenases, and Prostanoids in Cardiovascular Diseases. *Antiox. Redox Signal* 34, 784–799. doi: 10.1089/ars.2020.8105.
- Zhao, X. D., Zhou, Y.-T., and Lu, X. J. (2013). Sulforaphane enhances the activity of the Nrf2–ARE pathway and attenuates inflammation in OxyHb-induced rat vascular smooth muscle cells. *Inflamm. Res.* 62, 857–863. doi: 10.1007/s00011-013-0641-0.
- Zhao, Y., Vanhoutte, P. M., and Leung, S. W. S. (2015b). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J. Pharmacol. Sci.* 129, 83–94. doi: 10.1016/j.jphs.2015.09.002.
- Zhao, Y. L., Zhao, W., Liu, M., Liu, L., and Wang, Y. (2020b). TBHQ-Overview of Multiple Mechanisms against Oxidative Stress for Attenuating Methamphetamine-Induced Neurotoxicity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020, 1–10. doi: 10.1155/2020/8874304.
- Zhong, Y., Yu, W., Feng, J., Fan, Z., and Li, J. (2014). Curcumin suppresses tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced matrix metalloproteinase-2 expression and activity in rat vascular smooth muscle cells via the NF- $\kappa$ B pathway. *Exp. Ther. Med.* 7, 1653–1658. doi: 10.3892/etm.2014.1647.

- Zhong, Y., Zhang, F., Sun, Z., Zhou, W., Li, Z., You, Q., *et al.* (2013). Drug resistance associates with activation of Nrf2 in MCF -7/ DOX cells, and wogonin reverses it by down-regulating Nrf2-mediated cellular defense response. *Mol. Carcinog.* 52, 824–834. doi: 10.1002/mc.21921.
- Zhou, N., Lee, J.-J., Stoll, S., Ma, B., Wiener, R., Wang, C., *et al.* (2017). Inhibition of SRF/myocardin reduces aortic stiffness by targeting vascular smooth muscle cell stiffening in hypertension. *Cardiovasc. Res.* 113, 171–182. doi: 10.1093/cvr/cvw222.
- Zhou, Y., Zhang, M.-J., Li, B.-H., Chen, L., Pi, Y., Yin, Y.-W., *et al.* (2016). PPAR $\gamma$  Inhibits VSMC Proliferation and Migration via Attenuating Oxidative Stress through Upregulating UCP2. *PLoS ONE* 11, e0154720. doi: 10.1371/journal.pone.0154720.
- Zhu, H., Jia, Z., Mahaney, J. E., Ross, D., Misra, H. P., Trush, M. A., and Li, Y. (2007). The highly expressed and inducible endogenous NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 in cardiovascular cells acts as a potential superoxide scavenger. *Cardiovasc. Toxicol.* 7(3), 202–211. doi.org/10.1007/s12012-007-9001-z
- Zhu, L., Zhang, Y., Guo, Z., and Wang, M. (2020a). Cardiovascular Biology of Prostanoids and Drug Discovery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 40, 1454–1463. doi: 10.1161/ATVBAHA.119.313234.
- Zhu, Y., Xian, X., Wang, Z., Bi, Y., Chen, Q., Han, X., *et al.* (2018). Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation. *Biomolecules* 8, 80. doi: 10.3390/biom8030080.
- Zhu, Z., Peng, X., Li, X., Tu, T., Yang, H., Teng, S., *et al.* (2020b). HMGB1 impairs endothelium-dependent relaxation in diabetes through TLR4/eNOS pathway. *FASEB J.* 34, 8641–8652. doi: 10.1096/fj.202000242R.
- Zhu, Z., Zheng, X., Li, D., Wang, T., Xu, R., Piao, H., *et al.* (2017). Prx1 promotes the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in a TLR4-dependent manner. *Mol. Med. Rep.* 15, 345–351. doi: 10.3892/mmr.2016.5987.
- Zhuge, Y., Zhang, J., Qian, F., Wen, Z., Niu, C., Xu, K., *et al.* (2020). Role of smooth muscle cells in cardiovascular disease. *Int. J. Biol. Sci.* 16, 2741–2751. doi: 10.7150/ijbs.49871.
- Zieman, S. J., Melenovsky, V., and Kass, D. A. (2005). Mechanisms, Pathophysiology, and Therapy of Arterial Stiffness. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 932–943. doi: 10.1161/01.ATV.0000160548.78317.29.



**ANEXO**





## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Alfonso Rubio-Navarro,  
University of Granada, Spain

## REVIEWED BY

Fernanda Priviero,  
University of South Carolina,  
United States  
Matthew Dodson,  
University of Arizona, United States

## \*CORRESPONDENCE

Ángela Martín,  
✉ [angela.martin@urjc.es](mailto:angela.martin@urjc.es)  
María Jesús Alonso,  
✉ [mariajesus.alonso@urjc.es](mailto:mariajesus.alonso@urjc.es)

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Cardiovascular and Smooth  
Muscle Pharmacology,  
a section of the journal  
Frontiers in Pharmacology

RECEIVED 03 October 2022

ACCEPTED 20 February 2023

PUBLISHED 02 March 2023

## CITATION

González-Carnicero Z, Hernanz R,  
Martínez-Casales M, Barrús MT, Martín Á  
and Alonso MJ (2023), Regulation by  
Nrf2 of IL-1 $\beta$ -induced inflammatory and  
oxidative response in VSMC and its  
relationship with TLR4.  
*Front. Pharmacol.* 14:1058488.  
doi: 10.3389/fphar.2023.1058488

## COPYRIGHT

© 2023 González-Carnicero, Hernanz,  
Martínez-Casales, Barrús, Martín and  
Alonso. This is an open-access article  
distributed under the terms of the  
[Creative Commons Attribution License  
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or  
reproduction in other forums is  
permitted, provided the original author(s)  
and the copyright owner(s) are credited  
and that the original publication in this  
journal is cited, in accordance with  
accepted academic practice. No use,  
distribution or reproduction is permitted  
which does not comply with these terms.

# Regulation by Nrf2 of IL-1 $\beta$ -induced inflammatory and oxidative response in VSMC and its relationship with TLR4

Zoe González-Carnicero<sup>1</sup>, Raquel Hernanz<sup>1,2</sup>,  
Marta Martínez-Casales<sup>1</sup>, María Teresa Barrús<sup>1</sup>, Ángela Martín<sup>1,2\*</sup>  
and María Jesús Alonso<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón, Spain, <sup>2</sup>CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, Madrid, Spain

**Introduction:** Vascular oxidative stress and inflammation play an important role in the pathogenesis of cardiovascular diseases (CVDs). The proinflammatory cytokine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) participates in the vascular inflammatory and oxidative responses and influences vascular smooth muscle cells (VSMC) phenotype and function, as well as vascular remodelling in cardiovascular diseases. The Toll-like receptor 4 (TLR4) is also involved in the inflammatory response in cardiovascular diseases. A relationship between Interleukin-1 $\beta$  and Toll-like receptor 4 pathway has been described, although the exact mechanism of this interaction remains still unknown. Moreover, the oxidative stress sensitive transcription factor nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) promotes the transcription of several antioxidant and anti-inflammatory genes. Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 activators have shown to possess beneficial effects in cardiovascular diseases in which oxidative stress and inflammation are involved, such as hypertension and atherosclerosis; however, the molecular mechanisms are not fully understood. Here, we analysed the role of Toll-like receptor 4 in the oxidative and inflammatory effects of Interleukin-1 $\beta$  as well as whether nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 activation contributes to vascular alterations by modulating these effects.

**Materials:** For this purpose, vascular smooth muscle cells and mice aortic segments stimulated with Interleukin-1 $\beta$  were used.

**Results:** Interleukin-1 $\beta$  induces MyD88 expression while the Toll-like receptor 4 inhibitor CLI-095 reduces the Interleukin-1 $\beta$ -elicited COX-2 protein expression, reactive oxygen species (ROS) production, vascular smooth muscle cells migration and endothelial dysfunction. Additionally, Interleukin-1 $\beta$  increases nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 nuclear translocation and expression of its downstream proteins heme oxygenase-1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 and superoxide dismutase-2, by an oxidative stress-dependent mechanism; moreover, Interleukin-1 $\beta$  reduces the expression of the nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 inhibitor Keap1. The nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 activator tert-butylhydroquinone (tBHQ) reduces the effects of Interleukin-1 $\beta$  on the increased reactive oxygen species production and the expression of the proinflammatory markers (p-p38, p-JNK, p-c-Jun, COX-2), the increased cell proliferation and migration and prevents the Interleukin-1 $\beta$ -induced endothelial dysfunction in mice aortas. Additionally, tert-

butylhydroquinone also reduces the increased MyD88 expression, NADPHoxidase activity and cell migration induced by lipopolysaccharide.

**Conclusions:** In summary, this study reveals that Toll-like receptor 4 pathway contributes to the prooxidant and proinflammatory Interleukin-1 $\beta$ -induced effects. Moreover, activation of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 prevents the deleterious effects of Interleukin-1 $\beta$ , likely by reducing Toll-like receptor 4-dependent pathway. Although further research is needed, the results are promising as they suggest that nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 activators might protect against the oxidative stress and inflammation characteristic of cardiovascular diseases.

#### KEYWORDS

IL-1 $\beta$ , Nrf2, TLR4, oxidative stress, inflammation, vascular smooth muscle cells

## Introduction

Cardiovascular diseases (CVDs) are one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide (Şahin and İlgün, 2022). Vascular oxidative stress and inflammation play a significant role in the pathogenesis of CVDs, including hypertension and atherosclerosis (Senoner and Dichtl, 2019; Abbate et al., 2020; Griendling et al., 2021; Melton and Qiu, 2021). Among others, endothelial dysfunction and vascular smooth muscle cell (VSMC) alterations, such as abnormal migration and proliferation, play pivotal roles in the development of these pathologies (Wang et al., 2012; Eun et al., 2015; Badran et al., 2020; Griendling et al., 2021; Melton and Qiu, 2021).

Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) is a prototypical proinflammatory cytokine belonging to the IL-1 family (Abbate et al., 2020). IL-1 $\beta$  binds to its corresponding receptor and mostly signals through the myeloid differentiation factor 88 (MyD88) to facilitate downstream upregulation of inflammatory genes (Abbate et al., 2020; Melton and Qiu, 2021). Several reports suggest that IL-1 $\beta$  levels are increased in patients with CVDs such as hypertension and atherosclerosis, where this cytokine participates in the vascular proinflammatory and oxidative responses (Krishnan et al., 2014; Pfeiler et al., 2019; Mai and Liao, 2020; Melton and Qiu, 2021; Silveira Rossi et al., 2022). IL-1 $\beta$  also influences the phenotype and functions of VSMC, and induces cell migration and proliferation, participating in vascular remodelling in CVDs (Eun et al., 2015; Melton and Qiu, 2021).

On the other hand, the Toll-like receptor 4 (TLR4), a member of the family of pattern recognition receptors, participates in the inflammatory response in vascular diseases. TLR4 is expressed on the surface of several cell types, including VSMC (Nunes et al., 2019). Its activation occurs in response to both exogenous pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and endogenous molecules released by cells following tissue damage, called damage-associated molecular patterns (DAMPs) (Nunes et al., 2019). Although the classic TLR4 signalling pathway involves both MyD88-dependent and independent mechanisms (Liu et al., 2014), the TLR4-induced inflammatory response occurs mainly through activation of MyD88-dependent pathways (Liu et al., 2014; Biancardi et al., 2017). Signalling through TLR4 contributes to vascular inflammatory pathologies such as atherosclerosis and hypertension (De Batista et al., 2014; Yang et al., 2014; Hernanz et al., 2015). Furthermore, a relationship between IL-1 $\beta$  and TLR4 has recently been described, since treatment with this cytokine increases the activity of the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway (Liu et al.,

2014; Xu et al., 2020); however, the exact mechanism by which IL-1 $\beta$  interacts with this receptor is still unknown.

Reactive oxygen species (ROS) have been recognized as mediators of cellular signalling. At moderate levels, ROS are involved in physiological processes, but an excessive ROS production leads to disruption of redox signalling and to molecular damage (Xia et al., 2017; Griendling et al., 2021). To prevent ROS-induced alterations there are several antioxidant systems, among others, the nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). Nrf2 is a redox transcription factor (Yamamoto et al., 2018; Robledinos-Antón et al., 2019) which, under basal conditions, is restricted to the cytoplasm where it interacts with Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), leading to its ubiquitination (Yamamoto et al., 2018; Robledinos-Antón et al., 2019). Under stress conditions (ROS, electrophiles), Keap1 cysteines are oxidized, allowing Nrf2 to be released from its repressor Keap1 and translocate into the nucleus, wherein it heterodimerizes with small Maf proteins (sMAF) and binds to antioxidant response elements (AREs) on DNA, leading to transcription of ARE-driven genes. This set of genes regulates the expression of phase II detoxifying enzymes, including NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) or glutathione peroxidase (GPx), and antioxidant proteins such as heme oxygenase-1 (HO-1) (Yamamoto et al., 2018; Robledinos-Antón et al., 2019). Nrf2 has been related to different CVDs such as hypertension and atherosclerosis (Alonso-Piñeiro et al., 2021; Tanase et al., 2022). Thus, Nrf2 downregulation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) contributes to the increased oxidative stress and vascular dysfunction observed in this model (Lopes et al., 2015); however, patients who suffer from atherosclerosis have higher levels of Nrf2/HO-1 than healthy subjects (Fiorelli et al., 2019), suggesting that Nrf2 activation is an adaptive mechanism against oxidative stress characteristic of this CVDs.

Tert-butylhydroquinone (tBHQ) is a Nrf2 activator with antioxidant properties that enhances Nrf2-mediated transcription by promoting dissociation of Nrf2-Keap1 (Zhang and Hannink, 2003). Activators of Nrf2 have shown to have a beneficial effect in pathologies involving oxidative stress and inflammation (Xia et al., 2017; Robledinos-Antón et al., 2019). Thus, sulforaphane reduces ROS production both in vessels and VSMC from SHRSP (Lopes et al., 2015), and resveratrol, which also activates Nrf2, reduces ROS generation and lipid peroxidation, thus contributing to prevent from atherosclerosis (Parsamanesh et al., 2021). On the other hand, it has been described that tBHQ prevents microvascular endothelial



dysfunction and remodelling and reduces blood pressure in angiotensin II-induced hypertension (Wang et al., 2018). Based on the mentioned data, Nrf2 signalling pathway is currently considered an important defence mechanism against several CVDs; however, the mechanisms underlying the preventive effects of Nrf2 are barely known.

The aim of this study was to analyse whether TLR4 pathway contributes to the proinflammatory and prooxidant IL-1 $\beta$ -induced effects; in addition, the result of Nrf2 activation by tBHQ on these IL-1 $\beta$ -mediated effects and the possible mechanisms involved were also evaluated.

## Materials and methods

### Ethic statements

All experimental procedures were approved by the Ethical Committee of Research of the Universidad Autónoma de Madrid and Dirección General de Medio Ambiente, Comunidad de Madrid, Spain (PROEX 183.2/20). Animal care and experimental procedures conformed to the current Spanish laws (RD 53/2013) and are also conformed to the Directive 2010/63/EU of the European Parliament for animal experiments. The studies also comply with the ARRIVE guidelines for reporting experiments involving animals. C57BL/6 mice were obtained from colonies maintained at the Animal Quarters of the Facultad de Medicina of the Universidad Autónoma de Madrid. During treatment, mice were housed with constant room temperature, humidity and light cycle (12-h light/dark) and they had free access to tap water and were fed with standard mice chow *ad libitum*.

### Cell culture

Experiments were performed using the mouse aortic VSMC line MOVAS (ATCC<sup>®</sup> CRL-2797<sup>™</sup>, Manassas, VA, United States). Cells were maintained in High Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium [High Glucose-DMEM (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, United States)] supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and 0.2 mg/mL of the G-418 solution (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). VSMC were incubated at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells from passages 3–12 were used for the experiments. Cells were starved in High Glucose-DMEM, 0% FBS and 0.2 mg/mL of the G-418 solution. Afterwards, cells were stimulated with 10 ng/mL IL-1 $\beta$  for 1 h with or without pretreatment for 24 h with the Nrf2 activator tBHQ (20  $\mu$ M) or for 1 h with apocynin (30  $\mu$ M), catalase (1,000 U/mL) or the general intracellular TLR4 inhibitor CLI-095 (1  $\mu$ M). In other set of experiments, cells were stimulated with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M, 1 h) or lipopolysaccharide (LPS, 10  $\mu$ g/mL, 3 h) in the absence or the presence of tBHQ (20  $\mu$ M, 24 h).

### Western blot for protein expression analysis

Protein expression was determined by Western blot in whole-cell lysates (15–30  $\mu$ g) or nuclear and cytosolic fractions (15–20  $\mu$ g)

from VSMC. Nuclear and cytosolic extracts were obtained as previously described (Martín et al., 2012). Proteins were separated by 7.5% or 12% SDS-PAGE and transferred to polyvinyl difluoride membranes that were incubated with antibodies for Nrf2, HO-1, NQO1, SOD1, SOD2, Keap1, TLR4, MyD88, COX-2, p-JNK, p-p38 and p-c-Jun (Table 1). After washing, membranes were then incubated with secondary anti-rabbit (1:2,000; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, United States) or anti-mouse antibodies (1:4,000; Bio-Rad Laboratories) conjugated to horseradish peroxidase. Proteins were detected using a horseradish peroxidase-luminol/enhancer chemiluminescence system (Bio-Rad Laboratories). The same membrane was used to determine the expression of  $\alpha$ -tubulin, p38 and JNK in total extracts or GAPDH and TBP in cytosolic and nuclear extracts, respectively, as loading control by using mouse monoclonal or rabbit polyclonal antibodies (Table 1). Immunoblot signals were quantified using the Image Lab Software version 6.0 (Bio-Rad Laboratories). For protein expression, the ratio between signals on the immunoblot corresponding to the protein studied and that of tubulin, p-38, JNK or TBP was calculated. The protein expression in control cells was assigned the value of 1 to compare with treated cells.

### Detection of ROS production: Fluorescence microscopy—Flow cytometry

The oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE) and the colorant 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) were used to evaluate superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, respectively. Hydroethidine is able of freely cross cell membranes and oxidize in the presence of O<sub>2</sub><sup>-</sup> to ethidium bromide, which is trapped inside the cell due to its ability to intercalate into DNA. Ethidium bromide is excited at a wavelength of 546 nm and has an emission spectrum at 600–700 nm. DCFH-DA is a permeable dye able of diffusing through the cell membrane. DCFH-DA is degraded by intracellular esterases to 2'-7' dichlorofluorescein (DCF), which binds to intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and emits fluorescence at a wavelength of 535 nm when excited at a wavelength of 485 nm.

### Fluorescence microscopy

Briefly, VSMC were plated onto glass coverslips placed in 12-well plates and cultured as described above. Cells at a confluence of 40%–60% were stimulated with 10 ng/mL IL-1 $\beta$  or 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 h in the absence or the presence of 20  $\mu$ M tBHQ for 24 h. After that, cells were then incubated with 10  $\mu$ M DHE in cell culture medium for 30 min at 37°C. The images were then acquired using a fluorescence microscope (Zeiss Axioplan 2, Carl Zeiss Microscopy, LLC, Thornwood, NY, United States) and a cool fluorescence colour camera (Leica DFC7000T). The fluorescence intensity values of 10–12 nuclei per experiment were measured using ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Data were expressed as an increase in the fluorescence intensity related to the control value.

### Flow cytometry

Briefly, VSMC were plated in 12-well plates, cultured as described above, and stimulated with 10 ng/mL IL-1 $\beta$  or 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 h in the absence or the presence of 20  $\mu$ M tBHQ for 24 h or 1  $\mu$ M CLI-095 for 1 h. Cells were then incubated with 10  $\mu$ M DHE

TABLE 1 Summary of antibodies.

Antibody	Dilution	Source	Selling company	Catalog number
Nrf2	1:1,000	Rabbit monoclonal	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, United States)	12721
HO-1	1:1,000	Rabbit polyclonal	ENZO Life Sciences (Lausen, Switzerland)	ADI-SPA-895
NQO1	1:500	Mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, United States)	sc-32793
SOD1	0.05 µg/mL	Rabbit polyclonal	ENZO Life Sciences	ADI-SOD-101
SOD2	0.005 µg/mL	Rabbit polyclonal	ENZO Life Sciences	ADI-SOD-111
Keap1	1:1,000	Rabbit monoclonal	Cell Signaling Technology	8047
TLR4	1:500	Mouse monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-293072
MyD88	1:1,000	Rabbit polyclonal	Abcam (Cambridge, United Kingdom)	ab2064
COX-2	1:150	Rabbit polyclonal	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, United States)	160126
p-JNK	1:500	Rabbit polyclonal	Cell Signaling Technology	9251
JNK	1:1,000	Rabbit monoclonal	Cell Signaling Technology	9258
p-p38	1:1,000	Mouse monoclonal	Cell Signaling Technology	9216
p38	1:2,000	Mouse monoclonal	Cell Signaling Technology	9217
p-c-Jun	1:500	Rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-16312
Tubulin	1:20,000	Mouse monoclonal	Sigma Chemical Co.	T5168
TBP	1:1,000	Rabbit polyclonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-204
GAPDH	1:1,000	Mouse monoclonal	Calbiochem (Temecula, CA, United States)	CB1001

or 20 µM DCFH-DA in cell culture medium for 30 min at 37°C. Next, cells were trypsinized and collected in tubes for centrifugation. After two washes with PBS, cells in the pellet were resuspended in 500 µl PBS and analysed by flow cytometry using a Beckman Coulter Cytomics FC500 MPL cytometer (Beckman Coulter, Miami, FL, United States). Data were expressed as an increase in the fluorescence intensity related to the control value.

## Lucigenin assay

The superoxide anion generated by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase activity was determined using a chemiluminescence assay using lucigenin and NADPH. For this, VSMC were treated with 10 ng/mL IL-1β or 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 1 h, or 10 µg/mL LPS for 3 h, with or without pretreatment with tBHQ 20 µM for 24 h, and then they were homogenized in a lysis buffer (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM ethylene glycol tetra acetic acid—EGTA, 150 mM sucrose, pH = 7.4). The resulting homogenate was then transferred to a 96 wells plate together with the lysis buffer and lucigenin (5 µM). The assay was performed by duplicate. Basal luminescence was measured every 1.8 s during 3 min in a plate luminometer (GloMax®-Multi Detection System: Promega, Madison, WI, United States). The reaction was initiated by adding NADPH (100 µM) to the samples in a final volume of 300 µl. Luminescence was determined every 1.8 s for 3 min. Baseline activity in the absence of NADPH was subtracted. Activity was expressed as relative light units per µg of protein. Protein concentration was determined by

using the Micro BCA™ protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, United States). Data were expressed as an increase in the luminescence related to the control cells.

## In vitro wound healing assay

To evaluate the effect of tBHQ and CLI-095 on IL-1β- and LPS-induced migration, wound healing assay was used. For this, cells were seeded and cultured in 12-well plates. Once the cells reached a confluence of 90%, the medium was removed, a wound was made with a P10 pipette tip, and a line was drawn through the centre of the wells, perpendicular to the wound. After two washes with PBS (to wash away any cell debris remaining in the wound area), serum-free medium was added. A picture was taken at time zero at the site of intersection of the line and the wound. Then, VSMC were stimulated with 10 ng/mL IL-1β or 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h in the absence or presence of 20 µM tBHQ or 1 µM CLI-095. After 24 h, we took a picture in the same location. ImageJ software was used to determine the area of wound closure compared to time 0 for the stimulus and with respect to the control situation.

## Cell proliferation assay

3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was used to evaluate VSMC proliferation. For this, cells were seeded in 12-well plates. Once the cells reached a confluence of 50%–60%, VSMC were starved in serum-free medium and

stimulated with 10 ng/mL IL-1 $\beta$  or 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h in the absence or presence of 20  $\mu$ M tBHQ or 1  $\mu$ M CLI-095. Then, the medium was removed and MTT solution was added for 3 h. MTT is transformed into formazan crystals (insoluble in water) by the action of mitochondrial dehydrogenases in living cells. The blue formazan crystals are solubilized with DMSO, resulting in a colorimetric reaction leading to the appearance of a purple coloration. The absorbance was measured at 570 nm using a FLUOstar omega spectrophotometer (BMG Labtech, Germany).

## Vascular function

Some experiments were performed in aortic segments from 3-month C57BL/6 male mice. Thoracic aorta was divided into four segments 2 mm in length, each one incubated for 24 h without or with 10 ng/mL IL-1 $\beta$ , 20  $\mu$ M tBHQ and IL-1 $\beta$ +tBHQ or IL-1 $\beta$ , 1  $\mu$ M CLI-095 and IL-1 $\beta$ +CLI-095 in incubation medium (DMEM low glucose supplemented with 1% (v/v) FBS, 1% Penicillin-Streptomycin and 1% Glutamine). Afterwards, segments were transferred to a wire myograph to measure vascular reactivity. After a 30-min equilibration period in oxygenated Krebs-Henseleit solution (KHS, in mM: 115 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 4.7 KCl, 1.2 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11.1 glucose, and 0.01 Na<sub>2</sub>EDTA) bubbled with a 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> mixture (pH = 7.4), arterial segments were stretched to their optimal lumen diameter for active tension development. Segment's contractility was tested by an initial exposure to a high K<sup>+</sup> solution (120 mM K<sup>+</sup>-KHS, which was identical to KHS except that NaCl was replaced by KCl on an equimolar basis). Then, endothelium-dependent vasodilation was analysed by performing a single cumulative concentration-response curve to ACh (1 nM–10  $\mu$ M) in arteries precontracted with phenylephrine (Phe) at a concentration that produce approximately 50% of the contraction induced by K<sup>+</sup>-KHS.

## Statistical analysis

All values are expressed as mean  $\pm$  standard error (S.E.M.); *n* denotes the number of animals or the number of different cultures (each one obtained from one different passage) used in each experiment. For cell culture experiments, data are expressed as *n*-fold increase relative to the average value of controls in each plate or each blot. For vascular reactivity experiments, vasodilator responses induced by ACh were expressed as the % of the previous tone in each case.

Results were analysed by using paired Student's *t*-test, one-way or two-way ANOVA followed by Bonferroni post-test by using GraphPad Prism Software (San Diego, CA, United States). Values were considered to be significant when *p*-value is less than 0.05.

## Drugs/chemicals and antibodies

FBS, Penicillin-Streptomycin, Glutamine, IL-1 $\beta$ , tBHQ, LPS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apocynin, catalase, DHE, DCFH-DA, MTT, Phe, ACh, Lucigenin and NADPH were obtained from Sigma Chemical Co.

CLI-095 was obtained from InvivoGen (San Diego, CA, United States). All drugs were dissolved in distilled water except for tBHQ, CLI-095, DHE, DCFH-DA, which were dissolved in DMSO, and Lucigenin, which was dissolved in acetic acid. Neither DMSO nor acetic acid have any effect on VSMC.

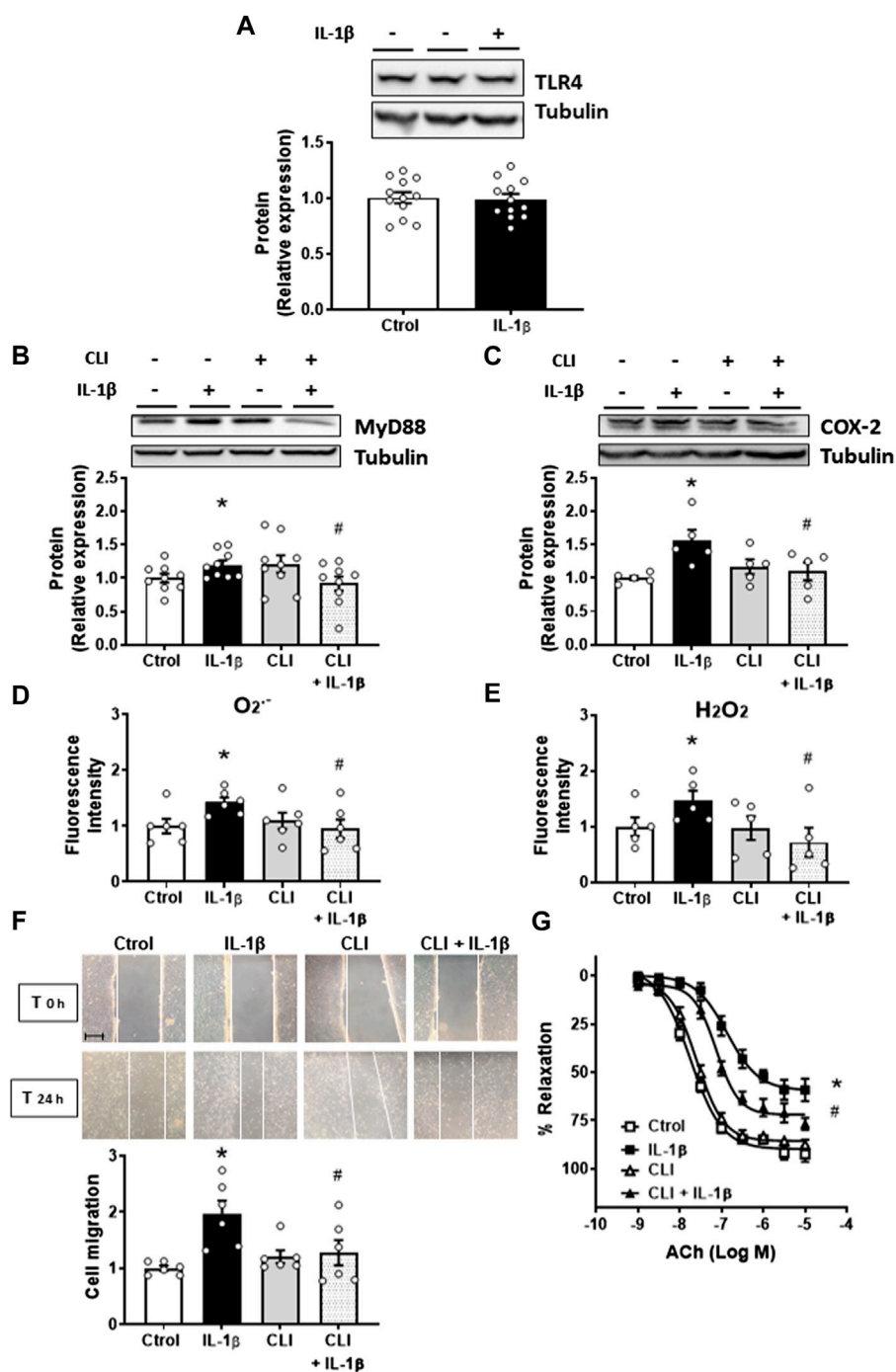
## Results

### TLR4 pathway is involved in Interleukin-1 $\beta$ effects

As mentioned, IL-1 $\beta$  is associated to increased ROS production; the primary enzymatic sources of cardiovascular ROS are NADPH oxidases. Accordingly, IL-1 $\beta$  (10 ng/mL, 1 h) increased the NADPH oxidase activity (Supplementary Figure S1A) and the subsequent production of hydrogen peroxide and superoxide anion in VSMC (Supplementary Figures S1B–D). In addition, treatment of VSMC with IL-1 $\beta$  induced the nuclear translocation of the AP-1 subunit phospho-c-Jun and the COX-2 protein expression (Supplementary Figure S2). In this study we also prove that oxidative stress is involved in the proinflammatory effects mediated by this cytokine. Thus, IL-1 $\beta$ -elicited nuclear translocation of p-c-Jun was reduced by the antioxidant apocynin (30  $\mu$ M) and the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenger catalase (1,000 U/mL) (Supplementary Figures S2A, B). Similarly, both drugs reduced the IL-1 $\beta$ -induced COX-2 expression (Supplementary Figures S2C, D). Neither apocynin nor catalase modified the nuclear p-p-Jun or COX-2 expressions (Supplementary Figure S2). These results confirm that ROS participate in IL-1 $\beta$ -induced activation of AP-1 and COX-2 in VSMC.

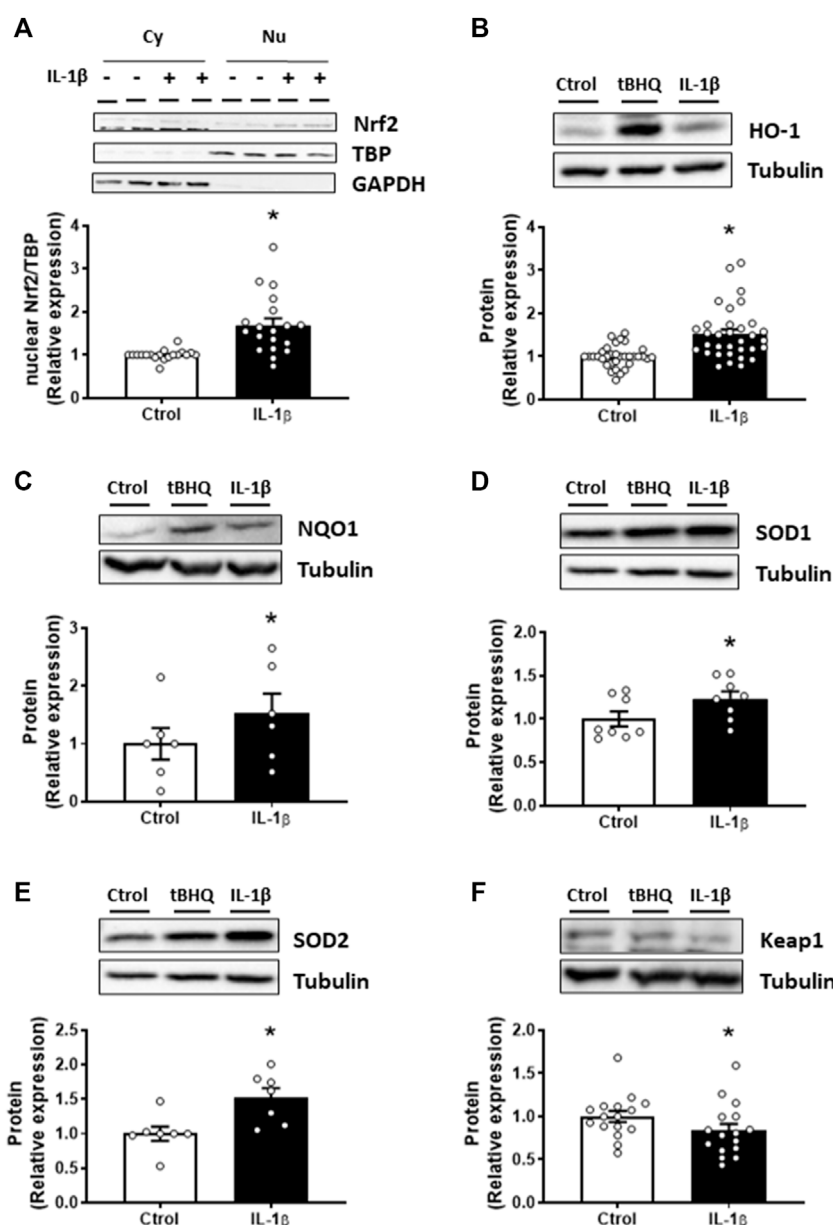
Next, we analysed the effect of IL-1 $\beta$  on the TLR4 signalling pathway. Treatment of mouse aortic VSMC with IL-1 $\beta$  did not modify TLR4 expression (Figure 1A); however, it increased the expression of its adapter protein MyD88 (Figure 1B). The effect of IL-1 $\beta$  on MyD88 protein expression was prevented by using the general intracellular TLR4 inhibitor CLI-095 (1  $\mu$ M) (Figure 1B), suggesting that the TLR4/MyD88-dependent signalling pathway was activated, at least in part, by IL-1 $\beta$  in VSMC. Next, we analysed the contribution of TLR4 to the observed effects of IL-1 $\beta$ . The inhibition of TLR4 by CLI-095 reduced the increase in COX-2 expression induced by IL-1 $\beta$  (Figure 1C). Besides, CLI-095 also reduced the IL-1 $\beta$ -increased O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production (Figures 1D, E). CLI-095 alone did affect neither COX-2 and MyD88 expressions nor O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production (Figures 1B, C). Moreover, we found that IL-1 $\beta$  (10 ng/mL, 24 h) increased VSMC migration, and this effect was reduced by blocking the TLR4 pathway; CLI-095 did not affect cell migration (Figure 1F). The IL-1 $\beta$ -induced VSMC proliferation was also prevented by CLI-095 (results not shown).

Thereafter, whether TLR4 inhibition interferes with the IL-1 $\beta$  effect on vasodilator responses were also analysed. Incubation of mouse aortas with IL-1 $\beta$  (10 ng/mL, 24 h) induced endothelial dysfunction, while cotreatment with the TLR4 antagonist improved ACh-induced endothelium-dependent vasodilatation (Figure 1G); however, IL-1 $\beta$  did not affect the response to K-KHS, regardless of the presence or absence of CLI-095 (data not shown). Furthermore, CLI-095 alone did not modify ACh-induced relaxation (Figure 1G). Taken together, all these results



**FIGURE 1**

Role of TLR4 pathway on the IL-1β-induced effects. Effect of Interleukin-1β (IL-1β, 10 ng/mL) on TLR4 expression (A). Effect of CLI-095 (1 μM), IL-1β and CLI-095 + IL-1β on myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and cyclooxygenase-2 (COX-2) protein expression (B,C). Effect of CLI-095 on IL-1β-induced superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production evaluated by flow cytometry (D,E) and cell migration (F) in vascular smooth muscle cells. Representative blots are shown in upper panels. Images of cell migration by wound healing assay are included; bar scale represents 50 μm. \**p* < 0.05 vs. control; #*p* < 0.05 vs. IL-1β by Student's *t*-test (*n* = 5–12). Effect of CLI-095, IL-1β and CLI-095 + IL-1β on acetylcholine (ACh)-induced relaxation in mice aortic segments precontracted with phenylephrine (G). \**p* < 0.05 vs. control; #*p* < 0.05 vs. IL-1β by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post test (*n* = 5). See methods for the incubation times.



**FIGURE 2**

Effect of IL-1 $\beta$  on the Nrf2 pathway. Effect of Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , 10 ng/mL, 1 h) on the nuclear Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) protein expression (A) in vascular smooth muscle cells; a representative blot of the cytosolic (Cy) and nuclear (Nu) expression is also shown; nuclear TATA-binding protein (TBP) and cytosolic GAPDH expressions are also shown to guarantee the successful cellular fractioning. Effect of IL-1 $\beta$  on heme oxygenase-1 [HO-1, (B)], NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 [NQO1, (C)], superoxide dismutase 1 [SOD1, (D)], superoxide dismutase 2 [SOD2, (E)] and Keap1 (F) protein expression. Representative blots are shown in upper panels; the same loading control for SOD1 and SOD2 protein expression was used. Tert-butylhydroquinone (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) was used as positive control. \* $p$  < 0.05 vs. control by Student's  $t$ -test ( $n$  = 6–30).

indicate that the TLR4 pathway contributes to the IL-1 $\beta$ -mediated effects.

### Interleukin-1 $\beta$ -induced Nrf2 activation is dependent on reactive oxygen species production

Later, we analysed the effect of IL-1 $\beta$  on the Nrf2 pathway. Treatment of VSMC with IL-1 $\beta$  (10 ng/mL, 1 h) increased the

Nrf2 nuclear translocation (Figure 2A); in addition, IL-1 $\beta$  also enhanced the expression of its downstream proteins, HO-1, NQO1, SOD1, and SOD2 (Figures 2B–E). Importantly, IL-1 $\beta$  reduced the expression of the Nrf2 inhibitory protein Keap1 (Figure 2F).

As described above, IL-1 $\beta$  increased the NADPH oxidase activity and the subsequent ROS production in VSMC. Therefore, the involvement of oxidative stress in the effects of IL-1 $\beta$  on Nrf2 pathway was studied. IL-1 $\beta$ -induced Nrf2 nuclear translocation was reduced by apocynin (30  $\mu$ M) and catalase

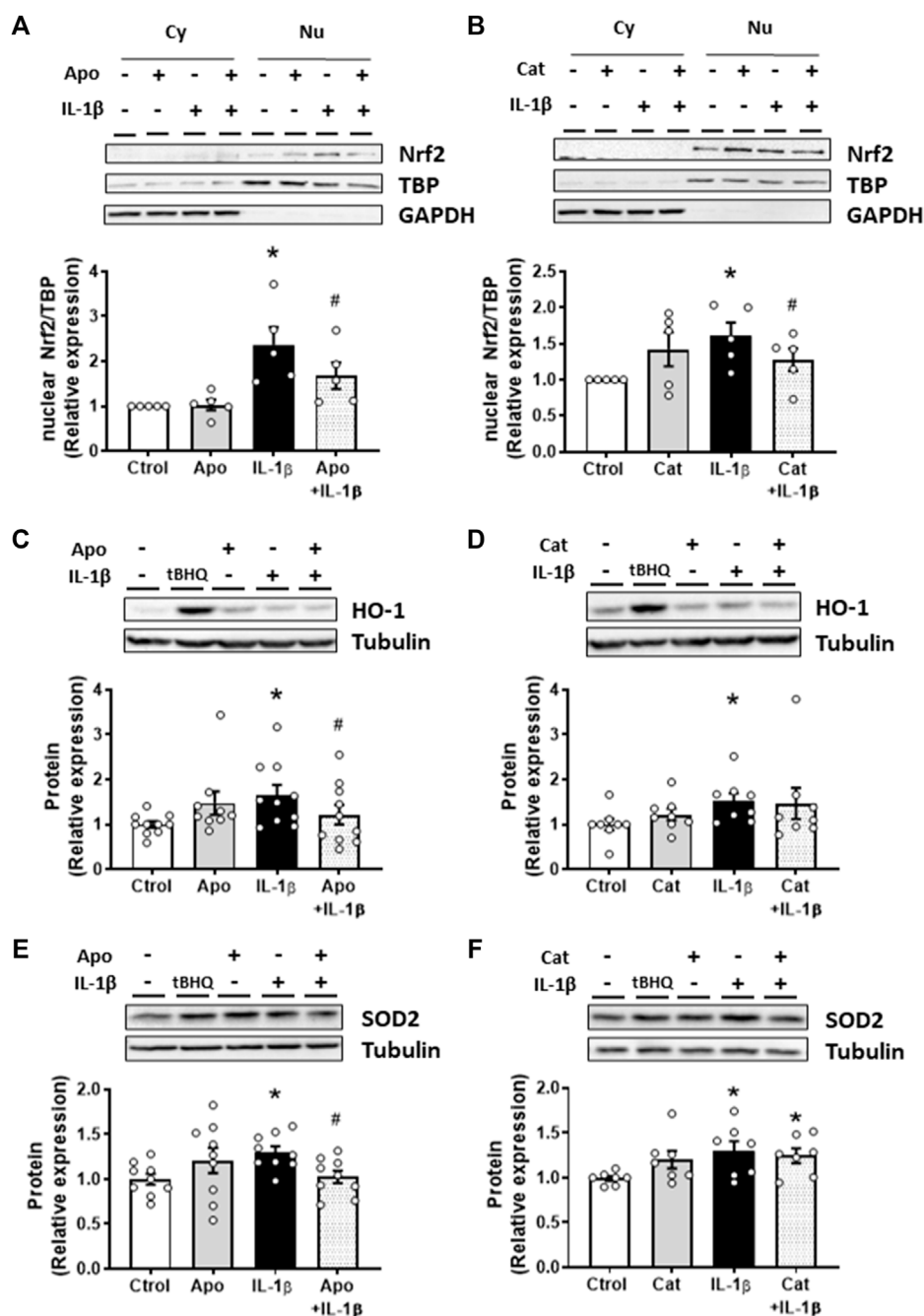


FIGURE 3

Role of oxidative stress in the IL-1 $\beta$ -induced effects on the Nrf2 pathway. Effect of apocynin (Apo, 30  $\mu$ M, 2 h) and catalase (Cat, 1,000 U/mL, 2 h) on the nuclear Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) protein expression (A,B) induced by Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , 10 ng/mL, 1 h) in vascular smooth muscle cells; a representative blot of the cytosolic (Cy) and nuclear (Nu) expression is also shown; nuclear TATA-binding protein (TBP) and cytosolic GAPDH expressions are also shown to guarantee the successful cellular fractioning. Effect of Apo and Cat on heme oxygenase-1 [HO-1, (C,D)] and superoxide dismutase 2 [SOD2, (E,F)] protein expressions induced by IL-1 $\beta$ . Representative blots are shown in upper panels. Tert-butylhydroquinone (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h) was used as positive control. \* $p$  < 0.05 vs. control; # $p$  < 0.05 vs. IL-1 $\beta$  by Student's  $t$ -test ( $n$  = 6–10).

(1,000 U/mL) (Figures 3A, B); similarly, apocynin reduced the effect of IL-1 $\beta$  on HO-1 and SOD2 protein expression (Figures 3C, E). However, catalase did reduce the IL-1 $\beta$ -induced expression neither of HO-1 nor of SOD2 (Figures 3D, F). Neither apocynin nor catalase modified the proteins studied (Figure 3). In addition, treatment of

VSMC with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M, 1 h) increased the Nrf2 nuclear translocation (Supplementary Figure S3A) as well as the protein expression of HO-1 and NQO1 (Supplementary Figures S3B, C). All together, these results show that ROS participate in Nrf2 activation by IL-1 $\beta$ .

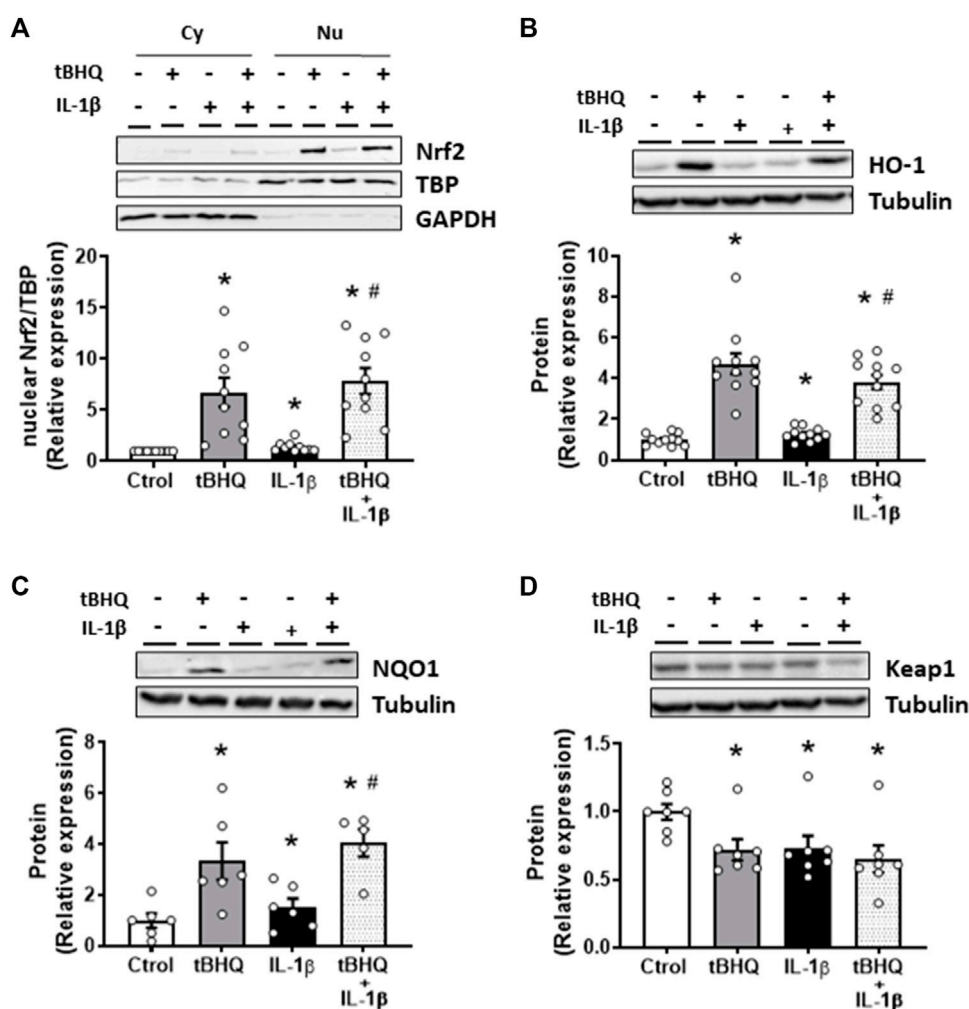


FIGURE 4

Modulation by Nrf2 activation of the IL-1 $\beta$ -induced effects on the Nrf2 pathway. Effect of tert-butylhydroquinone (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , 10 ng/mL, 1 h) and tBHQ + IL-1 $\beta$  on the nuclear Nrf2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2) protein expression (A) in vascular smooth muscle cells; a representative blot of the cytosolic (Cy) and nuclear (Nu) expression is also shown; nuclear TATA-binding protein (TBP) and cytosolic GAPDH expressions are also shown to guarantee the successful cellular fractioning. Effect of tBHQ, IL-1 $\beta$  and tBHQ + IL-1 $\beta$  on heme oxygenase-1 [HO-1, (B)], NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 [NQO1, (C)] and Keap1 (D) protein expressions. Representative blots are shown in upper panels. \* $p$  < 0.05 vs. control; # $p$  < 0.05 vs. IL-1 $\beta$  by Student's  $t$ -test ( $n$  = 6–10).

## Nrf2 activation downregulates Interleukin-1 $\beta$ prooxidant and proinflammatory effects

We next analysed the effect of Nrf2 activation on IL-1 $\beta$ -induced effects. For this, the Nrf2 activator tBHQ was used. As expected, tBHQ (20  $\mu$ M) increased the nuclear translocation of Nrf2 as well as the protein levels of HO-1 and NQO1, while it reduced the expression of Keap1 (Figure 4). Furthermore, pretreatment of VSMC for 24 h with the Nrf2 activator tBHQ increased the IL-1 $\beta$ -induced Nrf2 nuclear translocation as well as the HO-1 and NQO1 protein expression, although the levels reached were similar to those of tBHQ alone (Figures 4A–C). Additionally, tBHQ plus IL-1 $\beta$  reduced Keap1 protein expression, being this effect similar to that induced by either IL-1 $\beta$  or tBHQ alone (Figure 4D).

Next, we investigated the effect of Nrf2 activation on the IL-1 $\beta$ -elicited prooxidant effects. tBHQ did modify neither the basal

NADPH oxidase activity nor the production of both hydrogen peroxide and superoxide anion (Figure 5); however, it reduced the increased IL-1 $\beta$ -induced NADPH oxidase activity (Figure 5A) as well as the IL-1 $\beta$ -elicited increase of both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> production (Figures 5B–D). In addition, we evaluated whether Nrf2 activation affects the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-elicited effects. Pretreatment of VSMC for 24 h with 20  $\mu$ M tBHQ increased the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Nrf2 nuclear translocation (Supplementary Figure S4A) and the HO-1 and NQO1 protein expression (Supplementary Figures S4B, C), although these effects were similar to those caused by tBHQ alone. Furthermore, tBHQ reduced the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-elicited NADPH oxidase activity and O<sub>2</sub><sup>-</sup> production (Supplementary Figures S4D–F).

Thereafter, we explored the effect of Nrf2 activation on IL-1 $\beta$ -elicited proinflammatory effects. Pretreatment of VSMC for 24 h with the Nrf2 activator tBHQ did not modify the protein

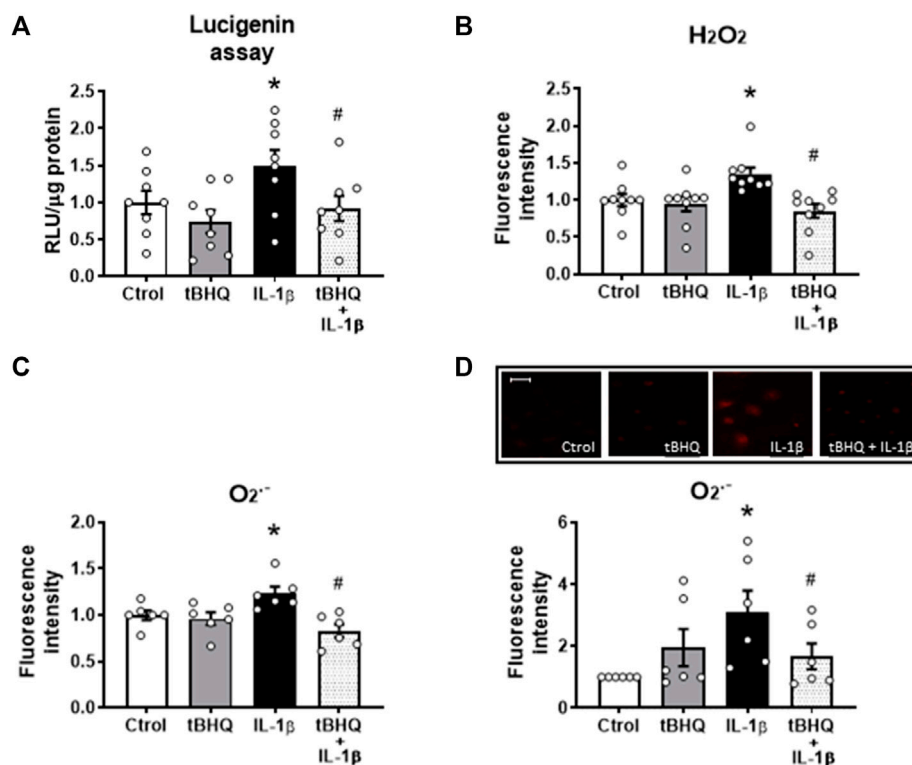


FIGURE 5

Modulation by Nrf2 activation of the IL-1 $\beta$ -induced effects on oxidative stress. Effect of tert-butylhydroquinone (tBHQ, 20  $\mu$ M, 24 h), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ , 10 ng/mL, 1 h) and tBHQ + IL-1 $\beta$  on NADPH oxidase activity (A), hydrogen peroxide [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (B)] and superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) production evaluated by flow cytometry (C) and by fluorescence microscopy (D) in vascular smooth muscle cells; representative fluorescent photomicrographs are also shown; images were captured with a fluorescence microscope; bar scale represents 100  $\mu$ m. \**p* < 0.05 vs. control; #*p* < 0.05 vs. IL-1 $\beta$  by Student's *t*-test (*n* = 6–10).

expression of MyD88, p-p38, p-JNK2, nuclear p-c-Jun or COX-2, but it reduced the IL-1 $\beta$ -induced increase of these proteins, as shown in Figure 6. On the other hand, we found that bacterial LPS, the main TLR4 ligand, increased MyD88 protein expression, and this increase was reduced by tBHQ (Supplementary Figure S5A); in addition, tBHQ reduced the LPS-elicited increase of NADPH oxidase activity and cell migration (Supplementary Figures S5B, C). Our results, therefore, suggest that Nrf2 activation protects against the detrimental prooxidant and proinflammatory effects of IL-1 $\beta$ , probably through TLR4 pathway modulation.

### Nrf2 activation protects against Interleukin-1 $\beta$ induced VSMC migration and proliferation, and endothelial dysfunction

The activator of Nrf2 alone did modify neither cell migration nor proliferation; however, it reduced the VSMC migration and proliferation induced by incubation for 24 h with 10 ng/mL IL-1 $\beta$  (Figures 7A, B). In addition, tBHQ (20  $\mu$ M) also reduced the cell migration elicited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100  $\mu$ M, 24 h), as shown in Figure 7C. In contrast, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduced cell proliferation, which was further decreased by the Nrf2 activator tBHQ (Figure 7D).

Finally, the effect of Nrf2 activation on IL-1 $\beta$ -induced endothelial dysfunction was also analysed. As shown in Figure 7E, tBHQ did not modify the vasodilator response induced by ACh, but it partially prevented the IL-1 $\beta$ -induced endothelial dysfunction. Neither tBHQ alone nor its combination with IL-1 $\beta$  did modify the contraction of K-KHS (results not shown).

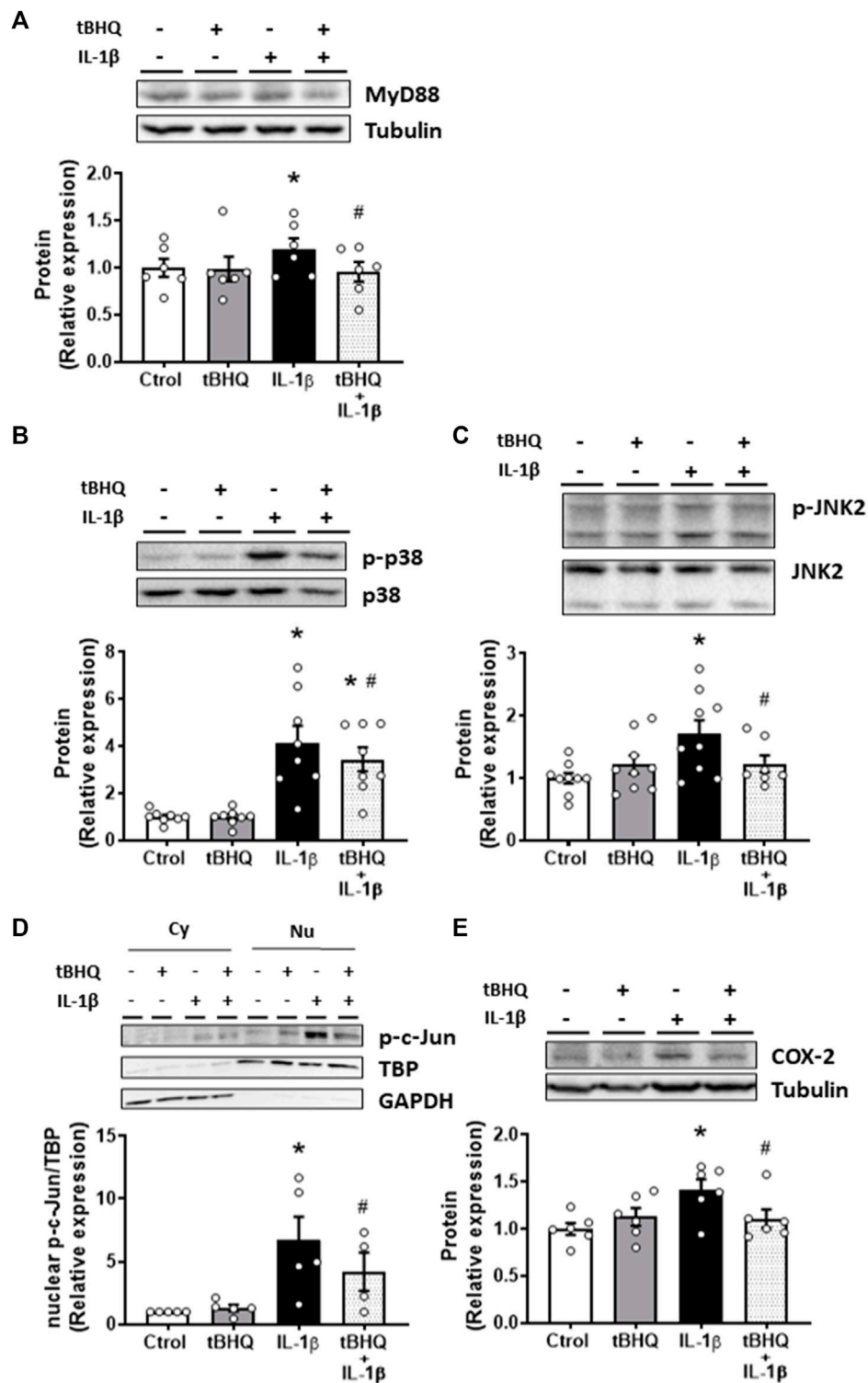
In summary, these results indicate a beneficial role for Nrf2 activation on vascular alterations such as VSMC migration and proliferation and the endothelial dysfunction induced by IL-1 $\beta$ .

## Discussion

In the present study we found that TLR4 pathway contributes to the prooxidant and proinflammatory effects induced by IL-1 $\beta$  in VSMC, being these effects reduced by activation of the redox-sensitive transcription factor Nrf2. Thus, Nrf2 activation prevents the detrimental effects of this cytokine on VSMC migration, proliferation and vascular endothelial dysfunction, likely by interfering with the IL-1 $\beta$ -induced TLR4 pathway.

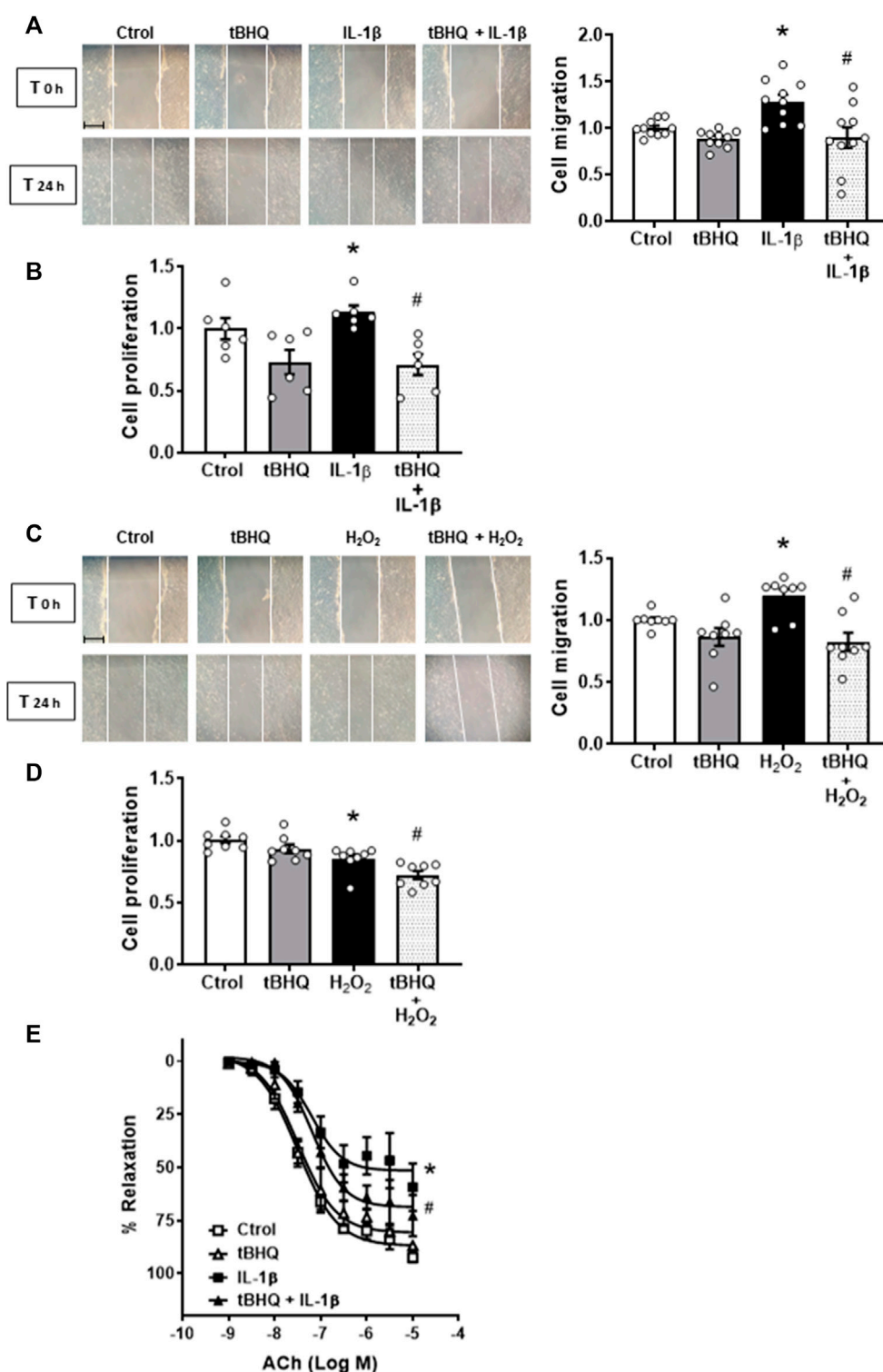
IL-1 $\beta$  is one of the most relevant proinflammatory cytokines belonging to the IL-1 family (Abbate et al., 2020). The binding of IL-1 $\beta$  to its receptor, mainly through MyD88, activates signalling





**FIGURE 6**

Modulation by Nrf2 activation of IL-1β-induced-effects on proinflammatory markers. Effect of tert-butylhydroquinone (tBHQ, 20 μM, 24 h), Interleukin-1β (IL-1β, 10 ng/mL, 1 h) and tBHQ + IL-1β on myeloid differentiation factor 88 [MyD88, (A)], p-p38 (B), p-JNK2 (C), nuclear p-c-Jun (D) and cyclooxygenase-2 [COX-2, (E)] protein expression in vascular smooth muscle cells. Representative blots are shown in upper panels. A representative blot of the cytosolic (Cy) and nuclear (Nu) expression of p-c-Jun is also shown (D); nuclear TATA-binding protein (TBP) and cytosolic GAPDH expressions are also shown to guarantee the successful cellular fractioning \**p* < 0.05 vs. control; #*p* < 0.05 vs. IL-1β by Student's *t*-test (*n* = 5–12).



**FIGURE 7**

Modulation by Nrf2 activation of the IL-1β- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced effects on cell migration and proliferation as well as on IL-1β-induced endothelial dysfunction. Effect of tert-butylhydroquinone (tBHQ, 20 μM, 24 h), Interleukin-1β (IL-1β, 10 ng/mL, 1 h) and tBHQ + IL-1β (A,B) and tBHQ, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 μM, 1 h) and tBHQ + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (C,D) on cell migration and proliferation in vascular smooth muscle cells. Images of cell migration by wound healing assay are included; bar scale represents 50 μm. \**p* < 0.05 vs. control; #*p* < 0.05 vs. IL-1β by Student's *t*-test (*n* = 6–10). Effect of tBHQ, IL-1β (10 ng/mL, 24 h) and tBHQ + IL-1β on acetylcholine (ACh)-induced relaxation in mice aortic segments precontracted with phenylephrine (E). \**p* < 0.05 vs. control; #*p* < 0.05 vs. IL-1β by two-way ANOVA followed by Bonferroni's post test (*n* = 4).

pathways involving MAPKs as well as transcription factors such as NF- $\kappa$ B and AP-1 (Krishnan et al., 2014). IL-1 $\beta$  levels are increased in several pathologies that involve oxidative stress and inflammation, including some CVDs such as atherosclerosis and hypertension (Krishnan et al., 2014; Mai and Liao, 2020; Melton and Qiu, 2021). For instance, it has been described that IL-1 $\beta$  contributes to atherogenesis by initiation, formation, and growth of the atheroma plaques (Abbate et al., 2020). Accordingly, Bhaskar et al. (2011) have shown that blocking IL-1 $\beta$ -mediated activity reduces plaque formation and subsequent atherosclerosis progression. Additionally, IL-1 $\beta$  also participates in the pathogenesis of hypertension (Melton and Qiu, 2021). Thus, inhibition of IL-1 $\beta$  activity reduces blood pressure in models of DOCA/salt- (Ling et al., 2017) and angiotensin II-induced hypertension in mice (Akita et al., 2021). It is widely known that IL-1 $\beta$  increases ROS production, thus contributing to the progression of vascular damage related to those CVDs (Shen et al., 2016). In agreement with previous studies (Martín et al., 2012), we observed that IL-1 $\beta$  increased the NADPH oxidase activity and the subsequent production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in VSMC. Furthermore, IL-1 $\beta$  contributes to the development of CVDs not only by inducing oxidative stress, but also due to its proinflammatory effects by promoting the expression of a variety of inflammatory mediators. Thus, IL-1 $\beta$  induces the activation of the vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), which recruits inflammatory cells to the VSMC at the atherosclerotic lesion (Wang et al., 1995) and promotes vascular calcification (Sánchez-Duffhues et al., 2019). In a previous report, we have shown that IL-1 $\beta$  also increases COX-2 expression in VSMC from SHR (Martín et al., 2012). COX-2 is the inducible isoform of COX enzyme that catalyses the formation of prostaglandins, whose expression and activation is induced by oxidative stress and inflammatory stimuli (Zhao et al., 2021). COX-2 acts as an inflammatory mediator by releasing vasoconstrictors which may induce cardiovascular dysfunction (Féltou et al., 2011; Bomfim et al., 2012; Zhao et al., 2021), playing a critical role in the endothelium-dependent contraction related to CVDs progression (Zhao et al., 2021). It has been described that AP-1, which can be activated by IL-1 $\beta$  (Shen et al., 2016), contributes to COX-2 expression in VSMC (Palacios-Ramírez et al., 2019). In our study, we found that IL-1 $\beta$  induces the nuclear translocation of the AP-1 subunit phospho-c-Jun as well as COX-2 protein expression in VSMC. Additionally, our results using the antioxidant apocynin and the hydrogen peroxide scavenger catalase confirm the role of oxidative stress in the IL-1 $\beta$ -induced proinflammatory effects.

TLR4 contribution to the vascular damage by activating inflammatory signalling pathways involving oxidative stress mechanisms, and its closely association with the pathogenesis of CVDs such as atherosclerosis and hypertension, have been described (De Batista et al., 2014; Yang et al., 2014; Hernanz et al., 2015; Qi et al., 2021). In addition, a possible connection between IL-1 $\beta$  and TLR4 has been suggested; thus, treatment with this cytokine activates the TLR4/NF- $\kappa$ B signalling *via* MyD88-dependent and -independent pathways (Liu et al., 2014; Gu et al., 2017), and this effect was abolished after TLR4 inhibition (Xu et al., 2020). We found that treatment of VSMC with IL-1 $\beta$  did not modify TLR4 expression, in agreement to that found by Chen et al. (2013). However, IL-1 $\beta$  increased the expression of its adapter protein MyD88. This effect of IL-1 $\beta$  on MyD88 protein expression was prevented by using the specific intracellular TLR4 inhibitor CLI-095, which disrupts the interactions of

TLR4 with its adaptors (Matsunaga et al., 2011), suggesting that the TLR4/MyD88-dependent signalling pathway was activated by this cytokine in VSMC. As mentioned above, IL-1 $\beta$  increases COX-2 expression in VSMC. Activation of the TLR4 pathway mediates the transcription of COX-2, a well-known TLR4 target protein in VSMC (Bomfim et al., 2012; Biancardi et al., 2017). Accordingly, we found that the increase in COX-2 expression induced by IL-1 $\beta$  was reduced by CLI-095. In addition, the IL-1 $\beta$ -elicited increase of both O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was also reduced by the TLR4 inhibitor.

Under normal conditions, VSMC, the major component of the vascular wall, have a characteristic contractile phenotype; however, under oxidative stress conditions and excessive inflammation these cells turn to a dedifferentiated phenotype which makes them more prone to migrate and proliferate (Badran et al., 2020; Qi et al., 2021). Several studies have reported that inflammatory mediators such as IL-1 $\beta$  induces VSMC migration and proliferation (Martín et al., 2012; Wang et al., 2012; Eun et al., 2015), then promoting vascular damage development (Badran et al., 2020). Downregulation or inhibition of TLR4 has been shown to reduce angiotensin II-induced VSMC migration and proliferation (De Batista et al., 2014; Qi et al., 2021), and this would contribute to explain the beneficial effects of TLR4 blockade in vascular remodelling and mechanical alterations observed in hypertension (Hernanz et al., 2015). Here, we found that inhibition of TLR4 reduces IL-1 $\beta$ -induced VSMC migration and proliferation. Cytokines also induce cardiovascular damage by impairment of endothelial-dependent relaxations (Briones et al., 2005; Jimenez-Altayó et al., 2006), and its inhibition in many cases ameliorates vascular endothelial dysfunction, as described by Vallejo et al. (2014) for IL-1 $\beta$ . Here, we confirm that IL-1 $\beta$  impairs endothelial-dependent relaxation. More importantly, the general TLR4 inhibitor CLI-095 prevented the deleterious effect of IL-1 $\beta$  on endothelial function. The beneficial effect of inhibiting TLR4 on endothelium-dependent vasodilation has been described by our group and others in several models of hypertension (De Batista et al., 2014; Hernanz et al., 2015) and atherosclerosis (Chen et al., 2020). Although we have not analysed the mechanisms by which TLR4 blockade improves the IL-1 $\beta$ -induced endothelial dysfunction, the reduction of oxidative stress might contribute to this effect, as has been reported in the hypertension-associated endothelial dysfunction (Hernanz et al., 2015). All these results reveal an interaction between IL-1 $\beta$  and TLR4, although the exact mechanism for this needs further investigation.

As mentioned above, IL-1 $\beta$  increases ROS production. An excessive ROS production leads to a disruption of redox homeostasis and molecular damage (Xia et al., 2017; Griendling et al., 2021). To counteract high ROS levels, cells may activate antioxidant mechanisms, being the redox-sensitive transcription factor Nrf2 one of these mechanisms. Nrf2 protects against oxidative stress by inducing the expression of antioxidant proteins and phase II detoxification enzymes, including HO-1, NQO1 and SOD, in response to changes in the intracellular redox balance (Yamamoto et al., 2018). HO-1 overexpression in atherosclerotic lesions is considered to be protective (Kishimoto et al., 2019), whereas inhibition of this enzyme resulted in the progression of atherosclerosis (Ishikawa et al., 2012). Furthermore, Nrf2 activation may have a protective role in hypertension (Lopes et al., 2015; Guzik and Touyz, 2017; Xia

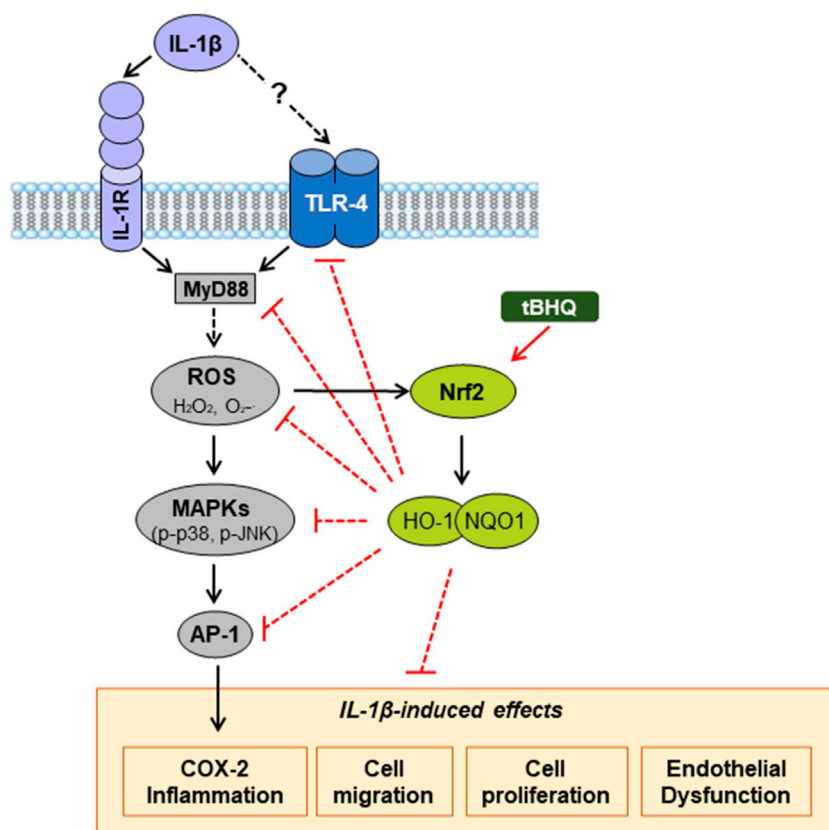


FIGURE 8

Proposed mechanism by which Nrf2 activation protects against vascular IL-1 $\beta$  effects. IL-1 $\beta$  increases oxidative stress and induces inflammation, cell migration and proliferation, as well as endothelial dysfunction, partially by a mechanism involving its interaction with TLR4 pathway. Nrf2 activation by tBHQ protects against these IL-1 $\beta$  vascular deleterious effects. The dashed lines indicate additional mechanisms unexplored in our study. IL-1 $\beta$ , Interleukin-1 $\beta$ ; TLR4, toll-like receptor 4; MyD88, myeloid differentiation factor 88; ROS, reactive oxygen species; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, superoxide anion; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; tBHQ, tert-butylhydroquinone; Nrf2, nuclear factor-erythroid 2-related factor 2; HO-1, heme oxygenase-1; NQO1, NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1; MAPK, mitogen-activated protein kinase; AP-1, activator protein-1; COX-2, cyclooxygenase-2.

et al., 2017; Wang et al., 2018). Therefore, activation of Nrf2 is a potential target against CVDs. In our study, we found that treatment of VSMC with IL-1 $\beta$  increased Nrf2 nuclear translocation and enhanced the expression of its downstream proteins, simultaneously reducing the expression of the Nrf2 repressor protein Keap1. This Nrf2 activation could be explained as a compensatory mechanism of the cell against the deleterious effect of this cytokine. Of note, the use of apocynin suggests that oxidative stress is involved in Nrf2 activation by IL-1 $\beta$ . Consistent with this, exogenous hydrogen peroxide also increased the nuclear translocation of Nrf2 as well as the protein expression of HO-1 and NQO1. It is known that oxidative modification of Keap1 cysteines results in a conformational change that leads to the detachment of Nrf2 from Keap1 and the inhibition of its ubiquitination; however, oxidative stress, by increasing the downstream Nrf2-driven gene p62/SQSTM1, activates specific autophagy of Keap1, and thus can modify its expression (Katsuragi et al., 2016).

tBHQ is a synthetic phenolic antioxidant widely used as selective Nrf2 activator. tBHQ acts modifying thiol groups of cysteines on the Keap1 protein, which induces a conformational change in Keap1; this leads to the release of Nrf2 from its

repressor, therefore allowing induction of antioxidant and anti-inflammatory responses by this transcription factor (Zhang and Hannink, 2003). As expected, after VSMC incubation with tBHQ, increased nuclear Nrf2 translocation was found; in addition, tBHQ enhanced the protein expression of HO-1 and NQO1 while reduced Nrf2 inhibitor Keap1 expression. Pretreatment of IL-1 $\beta$ -stimulated VSMC with tBHQ induced similar effects on Nrf2 pathway to that induced by tBHQ alone; in addition, the effects of coinubation of VSMC with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and tBHQ on Nrf2 translocation and the expression of its downstream antioxidant enzymes HO-1 and NQO1 were also similar to incubation with tBHQ alone, indicating that the observed effects are those induced by the Nrf2 activator. On the other hand, we found reduced IL-1 $\beta$ -induced NADPH oxidase activity as well as IL-1 $\beta$ -mediated O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in cells pretreated with tBHQ, which denotes a protective role of Nrf2 activation against the prooxidant effects of IL-1 $\beta$ . It is known that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates NADPH oxidase leading to further O<sub>2</sub><sup>-</sup> production (Li et al., 2001; Hernanz et al., 2015). Herein we confirm these results and, consistent with the antioxidant effect of tBHQ, we observed that this activator also reduces the increased NADPH oxidase activity and the

subsequent  $O_2^-$  production induced by the exogenous addition of  $H_2O_2$  in VSMC.

In addition to the protective effect against oxidative stress, Nrf2 also has anti-inflammatory properties (Alonso-Piñeiro et al., 2021). Thus, activators of Nrf2 inhibit the transcription of proinflammatory cytokines and they are used as anti-inflammatory drugs (Muri et al., 2020). Therefore, the result of Nrf2 activation on the observed IL-1 $\beta$ -induced proinflammatory effects was analysed. Although tBHQ alone did not affect the expression of the proinflammatory proteins, it reduced the IL-1 $\beta$ -induced MyD88 expression as well as the increased phosphorylation of MAPKs (p-p38 and p-JNK1/2), which likely reduced p-c-Jun and COX-2 expression. This is consistent with a previous report showing that activation of HO-1 reduced AP-1/COX-2 expression (Subedi et al., 2019). Our results indicate that Nrf2 activation keeps against the detrimental proinflammatory effects of IL-1 $\beta$ . Previously we have shown that oxidative stress plays a role in the proinflammatory effects induced by IL-1 $\beta$  in VSMC; therefore, the antioxidant properties of tBHQ would contribute to explain the beneficial effect of Nrf2 activation on the proinflammatory pathways induced by the cytokine.

On the other hand, we found that Nrf2 activation by tBHQ reduces VSMC migration and proliferation induced by IL-1 $\beta$ , suggesting a protective role of this transcription factor on the cytokine-induced vascular remodelling. The fact that tBHQ also reduces the  $H_2O_2$ -induced cell migration allows us to propose that the antioxidant properties derived from Nrf2 activation would contribute to this effect. By contrast,  $H_2O_2$  reduces VSMC proliferation, in agreement to that found by Nickenig et al. (2002), and this effect was further reduced by Nrf2 activation. Differences in the source of ROS, either endogenous or exogenous, as well as in the concentration might explain the different effects of ROS in cell proliferation.

Besides the previously mentioned action on the detrimental prooxidant and proinflammatory effects of IL-1 $\beta$ , tBHQ partially prevents the IL-1 $\beta$ -induced endothelial dysfunction. This is consistent with a previous study by Wang et al. (2018), which describes that tBHQ prevented angiotensin II-induced endothelial dysfunction by a Nrf2 dependent mechanism. Similarly, Lopes et al. (2015) found that sulforaphane corrected the impaired endothelial function in SHRSP.

Finally, we found that activation of Nrf2 with tBHQ reduces the effects of the TLR4 ligand LPS on MyD88 expression, NADPH oxidase activity and cell migration. These results, together with the previously mentioned reduction of IL-1 $\beta$  MyD88 expression by tBHQ, allow us to propose that protection of Nrf2 activation against the detrimental prooxidant and proinflammatory effects of IL-1 $\beta$ , are due, at least in part, to the interference with the TLR4 pathway activated by the cytokine, although further experiments are needed to confirm whether the signalling pathway involves MyD88-dependent or -independent mechanisms.

In summary, the present study demonstrates that IL-1 $\beta$  elicits oxidative stress, inflammation, cell migration and proliferation, as well as endothelial dysfunction, by mechanisms involving its relationship with TLR4 pathway, although the exact mechanism by which IL-1 $\beta$  interacts with this receptor needs further

investigation; however, we cannot rule out that some observed effects of IL-1 $\beta$  might also be produced by acting on its canonical IL-1R receptor (Figure 8). Moreover, our results reveal that activation of the redox-sensitive transcription factor Nrf2 induces vascular protection against IL-1 $\beta$  deleterious effects, at least in part, through interference with TLR4 pathway. Thus, by reducing TLR4 signalling pathway, Nrf2 activation reduces IL-1 $\beta$ -induced ROS generation and the increased expression of proinflammatory markers, in which oxidative stress participates. Furthermore, the activation of this transcription factor also prevents IL-1 $\beta$ -induced VSMC migration and proliferation, as well as the IL-1 $\beta$ -induced endothelial dysfunction (Figure 8). Therefore, our observations allow us to propose that activation of antioxidant and anti-inflammatory mechanisms such as Nrf2 might be an important therapeutic target in pathological conditions with oxidative and inflammatory components. However, the clinical application of Nrf2 activators for treatment of CVDs should be deeply analysed.

## Data availability statement

The raw data supporting the conclusion of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by Ethical Committee of Research of the Universidad Autónoma de Madrid.

## Author contributions

AM, RH, MA designed the research study; ZG-C, AM, RH, MM-C, MB performed the experimental work; ZG-C, AM, RH, MA wrote the paper; all authors approved the MS.

## Funding

This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (SAF 2015-69294-R), Instituto de Salud Carlos III (CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, CB16.11.00286), Universidad Rey Juan Carlos (Programa Propio de Fomento y Desarrollo de la Investigación. Convocatoria de financiación de Proyectos Puente de Investigación, 2020 and Convocatoria de Proyectos de Impulso a la investigación para jóvenes doctores, 2022), and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a way to build Europe.

## Acknowledgments

We thank the Animal Care Facility of the Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid (UAM); in addition, we also thank the contribution of Ana M. Pacheco and Paula Sancho for their technical assistance.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated

organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2023.1058488/full#supplementary-material>

## References

- Abbate, A., Toldo, S., Marchetti, C., Kron, J., Van Tassell, B. W., and Dinarello, C. A. (2020). Interleukin-1 and the inflammasome as therapeutic targets in cardiovascular disease. *Circ. Res.* 126 (9), 1260–1280. doi:10.1161/CIRCRESAHA.120.315937
- Akita, K., Isoda, K., Ohtomo, F., Isobe, S., Niida, T., Sato-Okabayashi, Y., et al. (2021). Blocking of interleukin-1 suppresses angiotensin II-induced renal injury. *Clin. Sci. (Lond)* 135 (17), 2035–2048. doi:10.1042/CS20201406
- Alonso-Piñero, J. A., Gonzalez-Rovira, A., Sánchez-Gomar, I., Moreno, J. A., and Durán-Ruiz, M. C. (2021). Nrf2 and heme oxygenase-1 involvement in atherosclerosis related oxidative stress. *Antioxidants* 10 (9), 1463. doi:10.3390/antiox10091463
- Badran, A., Nasser, S. A., Mesmar, J., El-Yazbi, A. F., Bitto, A., Fardoun, M. M., et al. (2020). Reactive oxygen species: Modulators of phenotypic switch of vascular smooth muscle cells. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (22), 8764. doi:10.3390/ijms21228764
- Bhaskar, V., Yin, J., Mirza, A. M., Phan, D., Vanegas, S., Issafras, H., et al. (2011). Monoclonal antibodies targeting IL-1 beta reduce biomarkers of atherosclerosis *in vitro* and inhibit atherosclerotic plaque formation in Apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 216 (2), 313–320. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.02.026
- Biancardi, V. C., Bomfim, G. F., Reis, W. L., Al-Gassimi, S., and Nunes, K. P. (2017). The interplay between Angiotensin II, TLR4 and hypertension. *Pharmacol. Res.* 120, 88–96. doi:10.1016/j.phrs.2017.03.017
- Bomfim, G. F., Dos Santos, R. A., Oliveira, M. A., Giachini, F. R., Akamine, E. H., Tostes, R. C., et al. (2012). Toll-like receptor 4 contributes to blood pressure regulation and vascular contraction in spontaneously hypertensive rats. *Clin. Sci. (Lond)* 122 (11), 535–543. doi:10.1042/CS20110523
- Briones, A. M., Salaices, M., and Vila, E. (2005). Ageing alters the production of nitric oxide and prostanoids after IL-1beta exposure in mesenteric resistance arteries. *Mech. Ageing Dev.* 126 (6–7), 710–721. doi:10.1016/j.mad.2005.01.006
- Chen, G., Chen, X. L., Xu, C. B., Lin, J., Luo, H. L., Xie, X., et al. (2020). Toll-like receptor protein 4 monoclonal antibody inhibits mmLDL-induced endothelium-dependent vasodilation dysfunction of mouse mesenteric arteries. *Microvasc. Res.* 127, 103923. doi:10.1016/j.mvr.2019.103923
- Chen, T. M., Li, J., Liu, L., Fan, L., Li, X. Y., Wang, Y. T., et al. (2013). Effects of heme oxygenase-1 upregulation on blood pressure and cardiac function in an animal model of hypertensive myocardial infarction. *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2), 2684–2706. doi:10.3390/ijms14022684
- De Batista, P. R., Palacios, R., Martín, A., Hernanz, R., Médici, C. T., Silva, M. A. S. C., et al. (2014). Toll-like receptor 4 upregulation by angiotensin II contributes to hypertension and vascular dysfunction through reactive oxygen species production. *PLoS ONE* 9 (8), e104020. doi:10.1371/journal.pone.0104020
- Eun, S. Y., Ko, Y. S., Park, S. W., Chang, K. C., and Kim, H. J. (2015). IL-1β enhances vascular smooth muscle cell proliferation and migration via P2Y2 receptor-mediated RAGE expression and HMGB1 release. *Vasc. Pharmacol.* 72, 108–117. doi:10.1016/j.vph.2015.04.013
- Féletou, M., Huang, Y., and Vanhoutte, P. M. (2011). Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br. J. Pharmacol.* 164 (3), 894–912. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01276.x
- Fiorelli, S., Porro, B., Cosentino, N., Di Minno, A., Manega, C. M., Fabbicchi, F., et al. (2019). Activation of Nrf2/HO-1 pathway and human atherosclerotic plaque vulnerability: An *in vitro* and *in vivo* study. *Cells* 8 (4), 356. doi:10.3390/cells8040356
- Griendling, K. K., Camargo, L. L., Rios, F. J., Alves-Lopes, R., Montezano, A. C., and Touyz, R. M. (2021). Oxidative stress and hypertension. *Circ. Res.* 128 (7), 993–1020. doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.318063
- Gu, H., Jiao, Y., Yu, X., Li, X., Wang, W., Ding, L., et al. (2017). Resveratrol inhibits the IL-1β-induced expression of MMP-13 and IL-6 in human articular chondrocytes via TLR4/MyD88-dependent and-independent signaling cascades. *Int. J. Mol. Med.* 39 (3), 734–740. doi:10.3892/ijmm.2017.2885
- Guzik, T. J., and Touyz, R. M. (2017). Oxidative stress, inflammation, and vascular aging in hypertension. *Hypertension* 70 (4), 660–667. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.117.07802
- Hernanz, R., Martínez-Revelles, S., Palacios, R., Martín, A., Cachofeiro, V., Aguado, A., et al. (2015). Toll-like receptor 4 contributes to vascular remodelling and endothelial dysfunction in angiotensin II-induced hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 172 (12), 3159–3176. doi:10.1111/bph.13117
- Ishikawa, K., Navab, M., and Lusis, A. J. (2012). Vasculitis, atherosclerosis, and altered HDL composition in heme-oxygenase-1-knockout mice. *Int. J. Hypertens.* 2012, 948203. doi:10.1155/2012/948203
- Jiménez-Altayó, F., Briones, A. M., Giraldo, J., Planas, A. M., Salaices, M., and Vila, E. (2006). Increased superoxide anion production by interleukin-1beta impairs nitric oxide-mediated relaxation in resistance arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316 (1), 42–52. doi:10.1124/jpet.105.088435
- Katsuragi, Y., Ichimura, Y., and Komatsu, M. (2016). Regulation of the Keap1-Nrf2 pathway by p62/SQSTM1. *Curr. Opin. Toxicol.* 1, 54–61. doi:10.1016/j.cotox.2016.09.005
- Kishimoto, Y., Kondo, K., and Momiyama, Y. (2019). The protective role of heme oxygenase-1 in atherosclerotic diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (15), 3628. doi:10.3390/ijms20153628
- Krishnan, S. M., Sobey, C. G., Latz, E., Mansell, A., and Drummond, G. R. (2014). IL-1β and IL-18: Inflammatory markers or mediators of hypertension? *Br. J. Pharmacol.* 171 (24), 5589–5602. doi:10.1111/bph.12876
- Li, W. G., Miller, F. J., Jr, Zhang, H. J., Spitz, D. R., Oberley, L. W., and Weintraub, N. L. (2001). H(2)O(2)-induced O(2) production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. *J. Biol. Chem.* 276 (31), 29251–29256. doi:10.1074/jbc.M102124200
- Ling, Y. H., Krishnan, S. M., Chan, C. T., Diep, H., Ferens, D., Chin-Dusting, J., et al. (2017). Anakinra reduces blood pressure and renal fibrosis in one kidney/DOCA/salt-induced hypertension. *Pharmacol. Res.* 116, 77–86. doi:10.1016/j.phrs.2016.12.015
- Liu, L., Gu, H., Liu, H., Jiao, Y., Li, K., Zhao, Y., et al. (2014). Protective effect of resveratrol against IL-1β-induced inflammatory response on human osteoarthritic chondrocytes partly via the TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway: An “*in vitro* study”. *Int. J. Mol. Sci.* 15 (4), 6925–6940. doi:10.3390/ijms15046925
- Lopes, R. A., Neves, K. B., Tostes, R. C., Montezano, A. C., and Touyz, R. M. (2015). Downregulation of nuclear factor erythroid 2-related factor and associated antioxidant genes contributes to redox-sensitive vascular dysfunction in hypertension. *Hypertension* 66 (6), 1240–1250. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06163
- Mai, W., and Liao, Y. (2020). Targeting IL-1β in the treatment of atherosclerosis. *Front. Immunol.* 11, 589–654. doi:10.3389/fimmu.2020.589654
- Martín, A., Pérez-Girón, J. V., Hernanz, R., Palacios, R., Briones, A. M., Fortuño, A., et al. (2012). Peroxisome proliferator-activated receptor-γ activation reduces cyclooxygenase-2 expression in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress. *J. Hypertens.* 30 (2), 315–326. doi:10.1097/HJH.0b013e32834f043b
- Matsunaga, N., Tsuchimori, N., Matsumoto, T., and Li, M. (2011). TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Mol. Pharmacol.* 79, 34–41. doi:10.1124/mol.110.068064
- Melton, E., and Qiu, H. (2021). Interleukin-1β in multifactorial hypertension: Inflammation, vascular smooth muscle cell and extracellular matrix remodeling, and non-coding RNA regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (16), 8639. doi:10.3390/ijms22168639
- Muri, J., Wolleb, H., Broz, P., Carreira, E. M., and Kopf, M. (2020). Electrophilic Nrf2 activators and itaconate inhibit inflammation at low dose and promote IL-1β

- production and inflammatory apoptosis at high dose. *Redox Biol.* 36, 101647. doi:10.1016/j.redox.2020.101647
- Nickenig, G., Baudler, S., Müller, C., Werner, C., Werner, N., Welzel, H., et al. (2002). Redox-sensitive vascular smooth muscle cell proliferation is mediated by GSKF and Id3 *in vitro* and *in vivo*. *FASEB J.* 16 (9), 1077–1086. doi:10.1096/fj.01-0570com
- Nunes, K. P., de Oliveira, A. A., Mowry, F. E., and Biancardi, V. C. (2019). Targeting toll-like receptor 4 signalling pathways: Can therapeutics pay the toll for hypertension? *Br. J. Pharmacol.* 176 (12), 1864–1879. doi:10.1111/bph.14438
- Palacios-Ramírez, R., Hernanz, R., Martín, A., Pérez-Girón, J. V., Barrús, M. T., González-Carnicero, Z., et al. (2019). Pioglitazone modulates the vascular contractility in hypertension by interference with ET-1 pathway. *Sci. Rep.* 9 (1), 16461. doi:10.1038/s41598-019-52839-6
- Parsamanesh, N., Asghari, A., Sardari, S., Tasbandi, A., Jamialahmadi, T., Xu, S., et al. (2021). Resveratrol and endothelial function: A literature review. *Pharmacol. Res.* 170, 105725. doi:10.1016/j.phrs.2021.105725
- Pfeiler, S., Winkels, H., Kelm, M., and Gerdes, N. (2019). IL-1 family cytokines in cardiovascular disease. *Cytokine* 122, 154215. doi:10.1016/j.cyto.2017.11.009
- Qi, H. M., Cao, Q., and Liu, Q. (2021). TLR4 regulates vascular smooth muscle cell proliferation in hypertension via modulation of the NLRP3 inflammasome. *Am. J. Transl. Res.* 13 (1), 314–325. 1943-8141/AJTR0116445.
- Robledinos-Antón, N., Fernández-Ginés, R., Manda, G., and Cuadrado, A. (2019). Activators and inhibitors of NRF2: A review of their potential for clinical development. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2019, 9372182. doi:10.1155/2019/9372182
- Şahin, B., and İlğün, G. (2022). Risk factors of deaths related to cardiovascular diseases in World Health Organization (WHO) member countries. *Health Soc. Care Community* 30 (1), 73–80. doi:10.1111/hsc.13156
- Sánchez-Duffhues, G., García de Vinuesa, A., van de Pol, V., Geerts, M. E., de Vries, M. R., Janson, S. G. T., et al. (2019). Inflammation induces endothelial-to-mesenchymal transition and promotes vascular calcification through downregulation of BMPR2. *J. Pathol.* 247 (3), 333–346. doi:10.1002/path.5193
- Senoner, T., and Dichtl, W. (2019). Oxidative stress in cardiovascular diseases: Still a therapeutic target? *Nutrients* 11 (9), 2090. doi:10.3390/nu11092090
- Shen, W. C., Liang, C. J., Huang, T. M., Liu, C. W., Wang, S. H., Young, G. H., et al. (2016). Indoxyl sulfate enhances IL-1 $\beta$ -induced E-selectin expression in endothelial cells in acute kidney injury by the ROS/MAPKs/NF $\kappa$ B/AP-1 pathway. *Arch. Toxicol.* 90 (11), 2779–2792. doi:10.1007/s00204-015-1652-0
- Silveira Rossi, J. L., Barbalho, S. M., Reverete de Araujo, R., Bechara, M. D., Sloan, K. P., and Sloan, L. A. (2022). Metabolic syndrome and cardiovascular diseases: Going beyond traditional risk factors. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 38 (3), e3502. doi:10.1002/dmrr.3502
- Subedi, L., Lee, J., Yumnam, S., Ji, E., and Kim, S. (2019). Anti-inflammatory effect of sulforaphane on LPS-activated microglia potentially through JNK/AP-1/NF- $\kappa$ B inhibition and Nrf2/HO-1 activation. *Cells* 8 (2), 194. doi:10.3390/cells8020194
- Tanase, D. M., Apostol, A. G., Costea, C. F., Tarniceriu, C. C., Tudorancea, I., Maranduca, M. A., et al. (2022). Oxidative stress in arterial hypertension (HTN): The nuclear factor erythroid factor 2-related factor 2 (Nrf2) pathway, implications and future perspectives. *Pharmaceutics* 14 (3), 534. doi:10.3390/pharmaceutics14030534
- Vallejo, S., Palacios, E., Romacho, T., Villalobos, L., Peiró, C., and Sánchez-Ferrer, C. F. (2014). The interleukin-1 receptor antagonist anakinra improves endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol.* 13, 158. doi:10.1186/s12933-014-0158-z
- Wang, C., Luo, Z., Carter, G., Wellstein, A., Jose, P. A., Tomlinson, J., et al. (2018). NRF2 prevents hypertension, increased ADMA, microvascular oxidative stress, and dysfunction in mice with two weeks of ANG II infusion. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 314 (3), R399–R406. doi:10.1152/ajpregu.00122.2017
- Wang, L., Zhang, J., Fu, W., Guo, D., Jiang, J., and Wang, Y. (2012). Association of smooth muscle cell phenotypes with extracellular matrix disorders in thoracic aortic dissection. *J. Vasc. Surg.* 56 (6), 1698–1709. doi:10.1016/j.jvs.2012.05.084
- Wang, X., Feuerstein, G. Z., Gu, J.-L., Lysko, P. G., and Yue, T. L. (1995). Interleukin-1 $\beta$  induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 115 (1), 89–98. doi:10.1016/0021-9150(94)05503-b
- Xia, N., Li, H., Daiber, A., and Förstermann, U. (2017). Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *Br. J. Pharmacol.* 174 (12), 1633–1646. doi:10.1111/bph.13492
- Xu, X., Liu, X., Yang, Y., He, J., Jiang, M., Huang, Y., et al. (2020). Resveratrol exerts anti-osteoarthritic effect by inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway via the TLR4/Akt/FoxO1 axis in IL-1 $\beta$ -stimulated SW1353 cells. *Drug Des. Devel Ther.* 14, 2079–2090. doi:10.2147/DDDT.S244059
- Yamamoto, M., Kensler, T. W., and Motohashi, H. (2018). The KEAP1-NRF2 system: A thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis. *Physiol. Rev.* 98(3), 1169–1203. doi:10.1152/physrev.00023.2017
- Yang, K., Zhang, X. J., Cao, L. J., Liu, X. H., Liu, Z. H., Wang, X. Q., et al. (2014). Toll-like receptor 4 mediates inflammatory cytokine secretion in smooth muscle cells induced by oxidized low-density lipoprotein. *PLoS ONE* 9 (4), e95935. doi:10.1371/journal.pone.0095935
- Zhang, D. D., and Hannink, M. (2003). Distinct cysteine residues in Keap1 are required for Keap1-dependent ubiquitination of Nrf2 and for stabilization of Nrf2 by chemopreventive agents and oxidative stress. *Mol. Cell Biol.* 23 (22), 8137–8151. doi:10.1128/MCB.23.22.8137-8151.2003
- Zhao, S., Cheng, C. K., Zhang, C. L., and Huang, Y. (2021). Interplay between oxidative stress, cyclooxygenases, and prostanoids in cardiovascular diseases. *Antioxid. Redox Signal* 34 (10), 784–799. doi:10.1089/ars.2020.8105

## Glossary

The following abbreviations are used in this document:

<b>ACh</b> acetylcholine	<b>KHS</b> Krebs-Henseleit solution
<b>AP-1</b> activator protein-1	<b>LPS</b> lipopolysaccharide
<b>COX-2</b> cyclooxygenase-2	<b>MAPK</b> mitogen-activated protein kinase
<b>CVDs</b> cardiovascular diseases	<b>MTT</b> 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
<b>DCFH-DA</b> 2',7'-dichlorofluorescein diacetate	<b>MyD88</b> myeloid differentiation factor 88
<b>DHE</b> dihydroethidium	<b>NADPH oxidase</b> nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase
<b>DMSO</b> Dimethyl sulfoxide	<b>NQO1</b> NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1
<b>DOCA</b> deoxycorticosterone acetate	<b>Nrf2</b> nuclear factor-erythroid 2-related factor 2
<b>FBS</b> fetal bovine serum	<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b> superoxide anion
<b>GAPDH</b> Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<b>PBS</b> phosphate buffered saline
<b>High Glucose-DMEM</b> High Glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium	<b>Phe</b> phenylephrine
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> hydrogen peroxide	<b>ROS</b> reactive oxygen species
<b>HO-1</b> heme oxygenase-1	<b>SHR</b> spontaneously hypertensive rats
<b>IL-1β</b> Interleukin-1β	<b>SHRSP</b> stroke-prone spontaneously hypertensive rats
<b>JNK</b> c-Jun N-terminal kinase	<b>SOD</b> superoxide dismutase
<b>Keap1</b> kelch-like ECH-associated protein 1	<b>tBHQ</b> tert-butylhydroquinone
	<b>TBP</b> TATA-binding protein
	<b>TLR4</b> Toll-like receptor 4
	<b>VSMC</b> vascular smooth muscle cells.