

**Regulación por estradiol de la  
producción de angiotensina 1-7  
y papel de su receptor Mas en la  
producción de óxido nítrico  
en células endoteliales humanas.**

*Doctorando:*

*Macarena de Lázaro Franco*

*Directores:*

*Dr. Carlos Hermenegildo Caudevilla*

*Dra. Susana Novella del Campo*

VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA

Facultat de **M**edicina i **O**dontologia

Departament de **F**isiologia

Valencia 2017



UNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología  
Departamento de Fisiología

Tesis doctoral

**Regulación por estradiol de la producción de  
angiotensina 1-7 y papel de su receptor Mas en la  
producción de óxido nítrico en células endoteliales  
humanas.**

Doctorando:

**Macarena de Lázaro Franco**

Directores:

**Dr. Carlos Hermenegildo Caudevilla**

**Dra. Susana Novella del Campo**

Valencia, Junio de 2017





VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

**Facultad de Medicina y Odontología**

**Departamento de Fisiología**

Dr. Carlos Hermenegildo Caudevilla, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Universitat de València y la Dra. Susana Novella del Campo, Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Fisiología de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que Macarena de Lázaro Franco, Licenciada en Farmacia, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Regulación por estradiol de la producción de angiotensina 1-7 y papel de su receptor Mas en la producción de óxido nítrico en células endoteliales humanas” para alcanzar el Grado de Doctor por la Universitat de València.

Valencia, Mayo de 2017

Fdo:

Fdo:

Carlos Hermenegildo Caudevilla

Susana Novella del Campo



Este trabajo ha sido financiado por proyectos subvencionados por el Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Economía y Competitividad (Proyectos FIS PI13/00617 y PI16/00229).



## AGRADECIMIENTOS

Tanto tiempo ha pasado desde el inicio de esta tesis hasta su final, que voy a intentar agradecer a todos los que me han apoyado, sufrido y dirigido en esta etapa de mi vida de maduración, no solo profesional, sino también personal.

En primer lugar, quería agradecer a mis directores de tesis, Carlos Hermenegildo y Susana Novella, esos jefes LINCE que al principio temes y respetas, pero que pronto se convierten en nuestros amigos, *coaches*, directores de nuestros triunfos y fracasos científicos, pero, en definitiva, piezas fundamentales dentro de este camino a convertirnos en doctores. Siempre os estaré agradecida por todo el tiempo y la confianza depositada en mí. Ha sido un privilegio trabajar, aprender y crecer científicamente con vosotros. MUCHAS GRACIAS por todo, de corazón.

Como no, agradecer a mi grupo de laboratorio, los LINCES, Natalia Martínez, Daniel Pérez, Xavi Vidal, Ana Monpeón y Carlos Bueno, gracias por hacer amenas tantas horas de laboratorio y haber creado un grupo no solo de trabajo, sino de buenos amigos. Gracias por todo. En especial a Ana por toda tu ayuda. Y también a los que más me han soportado en el laboratorio, Carlos y Xavi, sois muy grandes.



También quería agradecer a mi familia, por su apoyo incondicional y su insistencia en que llevara a término esta tesis, ya que en estos años ha habido momentos duros, pero con el apoyo de mi hermano Borja he podido llevar todo adelante y llegar hasta aquí. Muchas gracias, porque sin tu ayuda no lo hubiera conseguido.

A mi madre por su insistencia y por estar siempre tan orgullosa de mi y en especial a mi padre, que le hubiera encantado estar aquí en este momento, y sé que estará feliz de que por fin sea doctora. Papá, esta tesis es también tuya.

No puedo dejar tampoco de agradecer a mis abuelos, esos grandes padres, que siempre nos dan buenos consejos y nos ofrecen ese incesante cariño y apoyo. Pero en especial, agradecer a mi abuela Elena, que sin ella no estaría aquí. Nunca podré agradecerte todo lo que has hecho por mí. Gracias.

También quería dedicar esta tesis a todos mis amig@s, y en especial a la familia Villasante, siempre una segunda familia para mí. Cuantas horas de sonrisas y lágrimas juntos. Muchas gracias Alba, solo tú sabes el gran apoyo que me has dado.

A María Sánchez, gracias por creer en mí y siempre tener tu mano tendida para cuando te he necesitado. Ha sido mis ojos cuando no podía ver y eso nunca lo olvidaré. GRACIAS.

A Laura, la persona que ha estado en los peores momentos siempre con una sonrisa, gracias por toda la fuerza que me has transmitido y por estar ahí siempre. Tienes un corazón que no te cabe en el pecho, no cambies nunca.

Y, por último, a mí jefa de ahora, Rocío Rivera, esa gran “Farma-auténtica”, persona y amiga, por todos los momentos que hemos compartido juntas y por los que nos quedan.

Me siento muy afortunada de tener en mi vida a toda la gente que he nombrado y mucha que me he dejado por nombrar. Esta tesis es también vuestra.

A todos, muchas gracias.



***“Aprende como si fueras a vivir toda la vida y vive como si fueras a morir mañana”***

*Charles Chaplin*



# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Sistema renina angiotensina .....	3
1.2. Enzimas convertidoras de angiotensinas (ECA-1 y ECA-2) .....	6
1.3. Angiotensina 1-7 .....	13
1.4. El receptor Mas de angiotensina 1-7 .....	18
1.5. Células endoteliales.....	22
1.6. Óxido Nítrico.....	24
1.7. Los estrógenos en el sistema cardiovascular .....	30
2. HIPÓTESIS .....	41
3. OBJETIVOS.....	45
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	49
4.1. Obtención y cultivo de células endoteliales de vena del cordón umbilical humano.....	51
4.2. Exposición de las HUVEC a los distintos tratamientos.....	56
4.3. Determinación de la expresión génica de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC.....	58
4.3.1. Extracción del RNA total. ....	58
4.3.2. Síntesis de cDNA a partir del RNA total.....	59
4.3.3. PCR cuantitativa a tiempo real. ....	59
4.4. Determinación de la expresión proteica de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC.....	61
4.4.1. Lisado y homogeneización de las células.....	61
4.4.2. Cuantificación de proteínas.....	61
4.4.3. Western blot.....	62
4.5. Medida de la actividad enzimática de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC.....	65
4.5.1. Extracción de proteínas.....	65
4.5.2. Medida de la actividad ECA-1.....	65
4.5.3. Medida de la actividad ECA-2.....	67
4.6. Medida de Ang II y Ang 1-7 por inmunofluorescencia.....	69
4.7. Medida de óxido nítrico en HUVEC por fluorescencia.....	71
4.8. Análisis estadístico.....	73
5. RESULTADOS .....	75
5.1. El E2 aumenta la expresión génica de ECA-1 y ECA-2 a través del RE $\alpha$ en HUVEC.....	77
5.2. E2 aumenta la expresión proteica de ECA-1 a través de RE $\alpha$ .....	81
5.3. E2 aumenta la actividad enzimática de ECA-1 y ECA-2 a través del RE $\alpha$ en HUVEC.....	84
5.4. E2 aumenta la producción de Ang 1-7 a través de RE $\alpha$ en HUVEC.....	88
5.4.1. Producción basal de Ang 1-7 y Ang II en HUVEC.....	89
5.4.2. Efecto del E2 en la producción de Ang 1-7 y Ang II.....	90
5.5. Determinación de la producción dosis-respuesta de NO por E2 en HUVEC por fluorescencia.....	96
5.6. El aumento en la producción de NO por E2 está mediado por RE $\alpha$ .....	101
5.7. E2 aumenta la producción de NO a través del receptor Mas.....	104

6.	DISCUSIÓN.....	109
7.	CONCLUSIONES.....	131
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	135
9.	ANEXO.....	165

## Índice Abreviaturas

- 17 $\beta$ -estradiol (E2)
- Ácido bicinconínico (BCA)
- Ácido ribonucleico mensajero (RNAm)
- Agonista específico de receptor de estrógenos  $\beta$  2,3-bis(4-hidroxifenil) propionitrilo (DPN)
- Agonista específico de receptores de estrógenos  $\alpha$  1,3,5- tris (4-hidroxifenil)-4-propil-1h-pirazol (PPT)
- Angiotensina 1-7 (Ang 1-7)
- Angiotensina 1-9 (Ang 1-9)
- Angiotensina I (Ang I)
- Angiotensina II (Ang II)
- Antagonista específico de RE $\alpha$  metil-piperidina-pirazol (MPP)
- Antagonista específico del receptor Mas de angiotensina 1-7, D-Ala-Ang 1-7 (A779)
- Antagonista inespecífico de receptores de estrógenos (ICI182780)
- Células del músculo liso vascular (CMLV)
- Células endoteliales de vena umbilical humano (HUVEC)
- Ciclooxygenasa (COX)
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Dinucleótido fosfato de nicotinamida adenina (NADPH)
- Endotelinas (ET)
- Enzima convertidora de angiotensina (ECA-1)
- Enzima convertidora de angiotensina 2 (ECA-2)
- Factor de Von Willebrand (vW)
- Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina-1 (Lisinopril)
- Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA)
- Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME)
- NOS endotelial (eNOS)
- NOS inducible (iNOS)



- NOS neuronal (nNOS)
- Óxido nítrico (NO)
- Óxido nítrico sintasa (NOS)
- Prolil endopeptidasa (PEP)
- Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>)
- Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)
- Receptor de estrógenos  $\alpha$  (RE $\alpha$ )
- Receptor de estrógenos  $\beta$  (RE $\beta$ )
- Receptores de angiotensina 1 y 2 (AT1 y AT2)
- Receptores de estrógenos (RE)
- Sistema renina angiotensina (SRA)
- Solución de tampón fosfato (PBS)
- Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)

## Índice figuras

Figura 1. Sistema renina angiotensina clásico o circulante y SRA tisular.....	4
Figura 2. ECA-2 transmembrana y ECA-2 soluble.....	9
Figura 3. Relación ECA-1/ECA-2.....	11
Figura 4. Vías de síntesis de la angiotensina 1-7.....	15
Figura 5. Relación entre la localización de la ECA-1 y los receptores AT1, AT2 de la Ang II, y el receptor Mas para la Ang 1-7 según el tipo celular .....	16
Figura 6. Ilustración del efecto del óxido nítrico liberado por la ruta de la Akt y la acción de la eNOS.....	27
Figura 7. Cascada de señalización de PI3P en células endoteliales.....	29
Figura 8. Hormonas esteroideas .....	31
Figura 9. Efecto del E2 en la eNOS. E2 se une a ER $\alpha$ y ER $\beta$ en 2 sitios receptores de membrana y citosólicos .....	38
Figura 10. Cordón umbilical humano.....	52
Figura 11. HUVEC positivas para el factor vW .....	54
Figura 12. El esquema de reacción para la detección de NO por DAF-FM ..	71
Figura 13. El E2 incrementa la expresión de RNAm de ECA-1 y ECA-2 ....	78
Figura 14. El E2 incrementa la expresión de RNAm de ECA-1 y ECA-2 a través del RE $\alpha$ .....	80
Figura 15. Expresión proteica de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC .....	82
Figura 16. El efecto de los agonistas de RE $\alpha$ y RE $\beta$ en la expresión proteica de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC.....	83
Figura 17. Efecto del E2 en la actividad enzimática de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC .....	85
Figura 18. Participación de los RE en la actividad enzimática de ECA-1 y ECA-2 en respuesta al E2 en HUVEC.....	86
Figura 19. Efecto de los agonistas de RE $\alpha$ y RE $\beta$ en la actividad enzimática de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC.....	87
Figura 20. Producción basal de Ang 1-7 y Ang II detectada por inmunofluorescencia.....	90
Figura 21. Niveles de Ang 1-7 en HUVEC .....	93
Figura 22. Niveles de Ang II en HUVEC.....	95
Figura 23. Cuantificación de producción de NO en HUVEC a diferentes concentraciones de E2 .....	97
Figura 24. Participación de la eNOS en la producción de NO en HUVEC ...	98
Figura 25. Cuantificación de producción de NO en HUVEC a diferentes tiempos de incubación con E2 .....	99
Figura 26. Papel de RE en la producción de NO en células endoteliales humanas expuestas a E2 .....	102
Figura 27. Papel del RE $\alpha$ en la producción de NO en células endoteliales humanas expuestas a E2 .....	103
Figura 28. Participación del receptor Mas en el aumento en la producción de NO mediado por A779 .....	105

Figura 29. Participación del receptor Mas en la producción de NO en HUVEC tratadas con E2.....	107
Figura 30. Esquema ilustrativo del efecto inducido por E2 en HUVEC .....	125
Figura 31. Esquema ilustrativo de la producción de NO en HUVEC tratadas con E2 .....	128

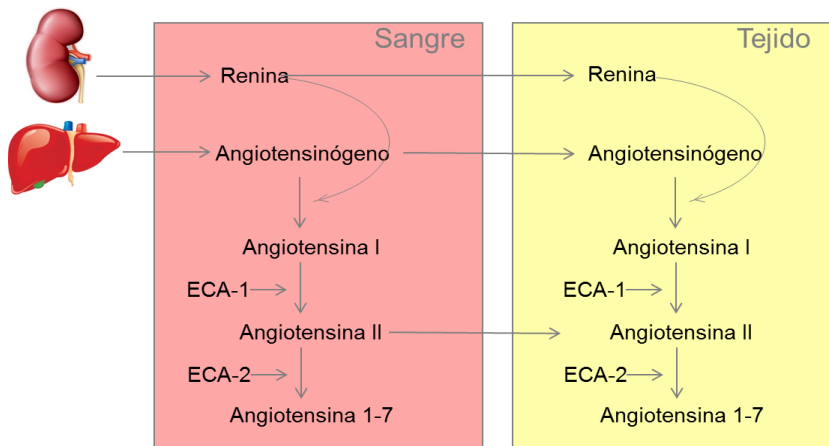
# **1. INTRODUCCIÓN**



## **1.1. Sistema renina angiotensina**

El estudio del sistema renina angiotensina (SRA) se inició en los años 30 del siglo pasado, donde el premio nobel, Bernardo Houssay (1887-1971) dirigió el estudio de la hipertensión arterial nefrogénica en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. Es uno de los descubrimientos más importantes dentro de la fisiología (Cherne and Young 2014). El SRA es una cascada enzimática y hormonal que regula la función cardiovascular, adrenal y renal, controlando el balance hidroelectrolítico y la presión arterial (Carey and Siragy 2003). En el SRA clásico, la renina es una enzima secretada por las células granulares del aparato yuxtglomerular y es fundamental para la detección de cambios en la presión arterial y electrolíticos (Ferrario, Chappell et al. 1997). Esta enzima cataliza la conversión del angiotensinógeno (péptido secretado en el hígado) en Angiotensina I (Ang I) que, por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA-1), secretada fundamentalmente por las células endoteliales de los capilares pulmones y de los riñones, se convierte en angiotensina II (Ang II). A su vez, la Ang II induce la liberación de aldosterona de la corteza adrenal en la glándula suprarrenal y media su acción biológica al unirse a los receptores de angiotensina 1 y 2 (AT1 y

AT2). Este SRA clásico o circulante interviene en la regulación vascular principalmente con los péptidos bioactivos Ang I y Ang II. La Ang II, a su vez, puede ser degradada por la enzima convertidora de la angiotensina 2 (ECA-2) al péptido vasodilatador biológicamente activo de la angiotensina 1-7 (Ang 1-7) (Chappel and Ferrario 2006) (Fig. 1).



**Figura 1. Sistema renina angiotensina clásico o circulante y SRA tisular.** El angiotensinógeno se transforma en Ang I por acción de la renina, la ECA-1 transforma la Ang I en Ang II y la ECA-2 transforma la Ang II en Ang 1-7.

Además del SRA circulante clásico, en la pared de los vasos sanguíneos se expresa un sistema paracrino de angiotensina que puede generar Ang II localmente (Mizuno, Niimura et al. 1991). Sus componentes también se sintetizan y actúan en múltiples órganos y tejidos, algunos de los cuales están directamente implicados en la regulación cardiovascular, como corazón y los vasos (Nguyen Dinh Cat and Touyz 2011) (Fig. 1).

El concepto actual de SRA tisular se estructura en dos ejes principales, que por lo general evocan efectos opuestos sobre las células vasculares: un eje con acción vasoconstrictora denominado ECA-1/ Ang II/ AT1 y un eje de acción vasodilatadora, el ECA-2/ Ang 1-7/ receptor de Ang 1-7.

En la pared vascular se expresan todos los componentes de SRA excepto la renina, que una vez secretada por las células yuxtglomerulares, pasa a circulación sanguínea (Te Riet, van Esch et al. 2015). Por lo tanto, el SRA de los tejidos puede funcionar de manera independiente del SRA circulante, lo que contribuye a un ajuste fino del tono vascular. Además, el SRA de los tejidos puede amplificar los efectos vasculares del SRA circulante en algunos estados patológicos tales como la hipertensión.

A pesar de numerosas publicaciones relacionadas con las acciones fisiológicas de Ang 1-7 y sus efectos beneficiosos en circunstancias fisiopatológicas, la señalización intracelular iniciada por este péptido no está suficientemente estudiada, si bien se ha demostrado que se une, entre otros, al que se considera su receptor principal, el receptor Mas (Santos, Simoes e Silva et al. 2003, Meinert, Gembardt et al. 2016).



## **1.2. Enzimas convertidoras de angiotensinas (ECA-1 y ECA-2)**

La ECA-1 fue aislada en 1956 (Skeggs, Kahn et al. 1956). Por ser la primera que se caracterizó fue denominada ECA, aunque actualmente es conocida como ECA-1. Se trata de una metaloproteasa de tipo dipeptidilcarboxipeptidasa, que contiene una equivalencia molar de zinc, el cual interviene en el paso hidrolítico de reacciones catalíticas (Bunning, Holmquist et al. 1983). Su acción es clave en la regulación del SRA, escindiendo el dipéptido C-terminal de la Ang I para dar lugar al péptido vasoconstrictor Ang II, efector principal del SRA (Imai, Kuba et al. 2010).

La ECA-1 es una proteína integral de membrana tipo I con un peso molecular de 180 kDa que se ancla a través de un único dominio transmembrana situado en el extremo C-terminal. En la superficie celular funciona como una ectoenzima, hidrolizando péptidos circulantes. La ECA-1 también extiende su efecto catalizador a la inactivación de la bradiquinina y calidina, ambos péptidos vasodilatadores. Además, puede actuar como una enzima soluble y aparece en suero y otros fluidos corporales (Tipnis, Hooper et al. 2000).

Desde el punto de vista cardiovascular, se ha descrito que la ECA-1 se expresa principalmente en células endoteliales, tanto cardíacas como vasculares, y en fibroblastos cardíacos y está presente en todas las válvulas del corazón. En extractos cardíacos humanos se ha observado que la ECA-1 es responsable del 90% de la conversión de Ang I a Ang II (Carey and Siragy 2003). Además, en estudios realizados en arteria coronaria de perro afirman que la Ang 1-7 inhibe la actividad de la ECA-1 y aumenta la liberación de óxido nítrico (NO) y bradiquinina (Li, Chappell et al. 1997).

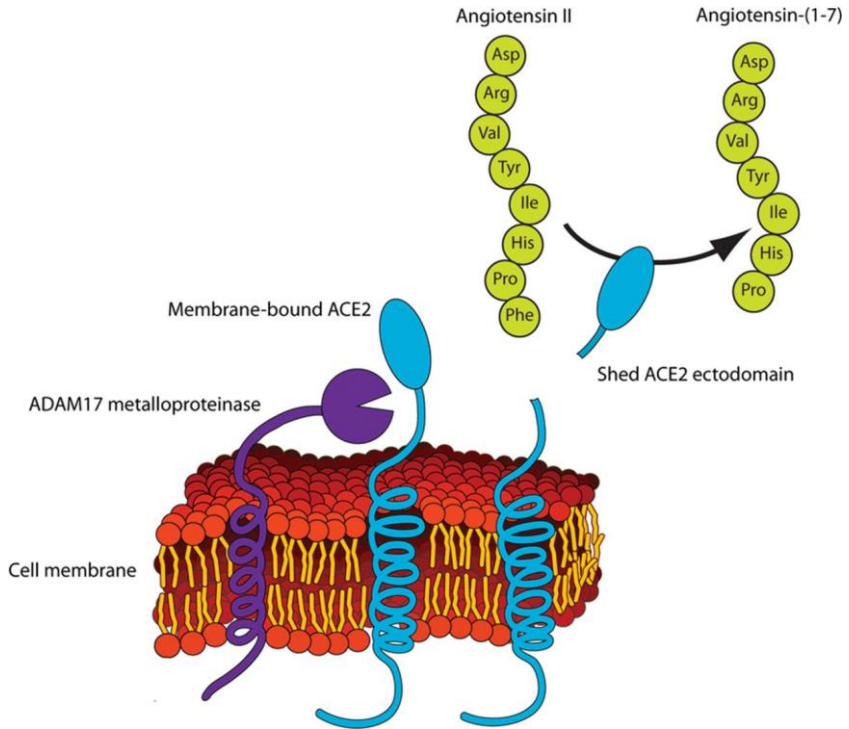
En condiciones patológicas, la acción catalítica de la ECA-1 puede resultar en un refuerzo en la pared de los vasos sanguíneos y en una incapacidad para relajarse tras la contracción, relacionado con la fisiopatología de la hipertensión arterial. De hecho, los inhibidores sintéticos de la ECA-1 (IECA, como captopril, enalapril, lisinopril), el inhibidor de la renina (aliskiren), y los bloqueantes de los receptores de la angiotensina (como losartan) se encuentran entre los principales tratamientos para la insuficiencia cardíaca congestiva y la hipertensión arterial (Girgih, Nwachukwu et al. 2015).

Por otra parte, la ECA-2 es una glicoproteína transmembrana tipo I que fue descubierta en el año 2000 y es la responsable de la síntesis de la Ang 1-7. Es la primera proteína homóloga reconocida de la ECA-1, pero difiere de ésta en la especificidad de sustrato. La ECA-2 posee una considerable homología con la

ECA-1 (con una secuencia 40% idéntica y 60% similar), especialmente marcada en su dominio de unión a zinc (Tipnis, Hooper et al. 2000, Ingelfinger 2009).

La ECA-2 se ha detectado principalmente en el endotelio de los vasos coronarios y renales, y en el epitelio tubular renal (Donoghue, Hsieh et al. 2000). También se han identificado transcripciones de ECA-2 en tracto gastrointestinal, cerebro, pulmón, corazón, riñón y testículos. La identificación de la ECA-2 en esta gran variedad de órganos confirma la ubicuidad de su distribución (Burrell, Johnston et al. 2004).

La ECA-2 también se expresa en forma soluble (Grace, Herath et al. 2012) (Fig. 2), tras perder los dominios citosólicos y transmembrana y generar una proteína glicosilada de 120 kDa, la cual contiene 7 posibles sitios de glicosilación, y un peso molecular de 85 kDa (Tipnis, Hooper et al. 2000). Esta forma soluble aparece expresada en endotelio, corazón, riñón, y testículos, por lo que podría jugar un papel en la regulación de la función cardiovascular y renal, así como en fertilidad (Tipnis, Hooper et al. 2000).

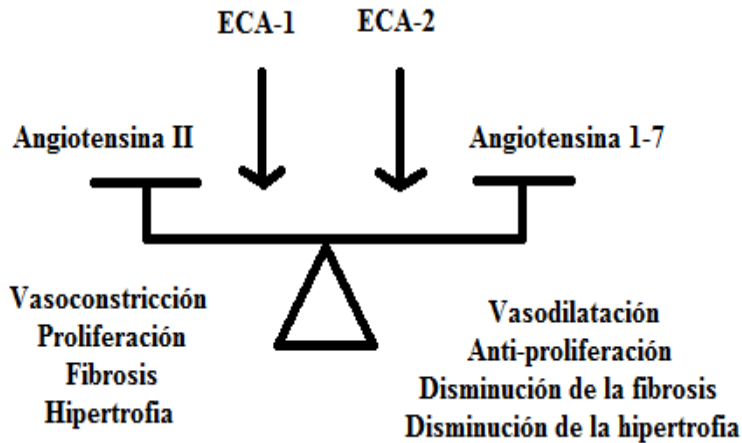


**Figura 2. ECA-2 transmembrana y ECA-2 soluble.** La escisión de la ECA-2, una glicoproteína transmembrana de tipo 1 carboximonopeptidasa, que escinde un aminoácido terminal del extremo C de la Ang II para formar Ang 1-7. La ECA-2 sufre escisión por la acción de una metaloproteasa para liberar ECA-2 soluble. Tomado de Grace, Herath et al., 2012.

Las acciones fisiológicas de la ECA-2 y su relación con hipertensión se conocen bien y se reconoce además que Ang 1-7 tiene un papel relevante en la fisiopatología de la hipertensión (Santos, Brosnihan et al. 1992, Donoghue, Hsieh et al. 2000). Por una parte, la ECA-2 contribuye a la vasodilatación en hipertensión portal en humanos (Vilas-Boas, Ribeiro-Oliveira et

al. 2009, Grace, Herath et al. 2012). En modelos murinos disminuye su expresión cuando hay hipertensión cardíaca y renal. Los corazones de ratones a los que se les induce una mutación de ECA-2 desarrollan dilatación de cavidades cardíacas e insuficiencia cardíaca. La ECA-2 compite de forma teórica con la ECA-1 por su substrato, la Ang I, y además degrada también a la Ang II. El incremento de los niveles de Ang II estimula a endopeptidasas y a la propia ECA-2 para favorecer la síntesis de Ang 1-7 que, a través del receptor Mas, ejerce efectos opuestos a los mediados por el receptor AT1 de la Ang II (Raz, Gamliel-Lazarovich et al. 2007, Grace, Herath et al. 2012).

En condiciones fisiológicas existe un equilibrio en las acciones de la ECA-1 y la ECA-2, de tal manera que cuando predomina la ECA-1 aumentan los niveles de Ang II, produciéndose vasoconstricción, proliferación de células de músculo liso vascular, fibrosis e hipertrofia vascular. La acción vascular de la Ang 1-7 contrarrestaría la acción de la Ang II (Santos, Simoes e Silva et al. 2003), por lo que si predomina la ECA-2 aumentan los niveles de Ang 1-7, y predominarán los efectos de vasodilatación, anti-proliferación, disminución de la fibrosis y disminución de la hipertrofia vascular (Chappel and Ferrario 2006, Villalobos 2009) (Fig. 3).



**Figura 3. Relación ECA-1/ECA-2.** Dependiendo del balance ECA-1/ECA-2, se obtendrá los efectos de la Ang 1-7 o Ang II; ya que si la relación ECA-1/ECA-2 es alta, se tendrá mayores niveles de Ang II que de Ang 1-7, observándose vasoconstricción, proliferación, fibrosis, hipertrofia; por su parte, si la relación ECA-1/ECA-2 es baja, se favorece la formación de Ang 1-7, y predominarán sus efectos, como la vasodilatación, anti proliferación. ECA-1: Enzima convertidora de Angiotensina I. ECA-2: Enzima convertidora de Angiotensina II. Modificado de Chappel y Ferrario, 2006.

El equilibrio ECA-1/ ECA-2 ha sido investigado mediante ensayos enzimáticos y, además, en estudios de aterogénesis se ha localizado el ácido ribonucleico mensajero (RNAm) y la proteína ECA-2 en la vasculatura humana. El RNAm de ECA-2 se expresa en las lesiones ateroscleróticas tempranas y avanzadas en carótidas humanas. La proteína ECA-2 también está presente en la pared vascular de las venas humanas, en arterias mamarias y en las arterias carótidas con placas

ateroscleróticas y se expresa en células endoteliales, células de músculo liso y los macrófagos. Análisis cuantitativos de inmunorreactividad en estos sitios vasculares, demuestran que la expresión total de ECA-1 y ECA-2 en la pared vascular es similar en todas las fases de las lesiones ateroscleróticas estudiadas. Además, en las lesiones ateroscleróticas estables avanzadas, la proteína ECA-2 es enzimáticamente activa, aunque su actividad es menor que en tejido sano (Sluimer, Gasc et al. 2008).

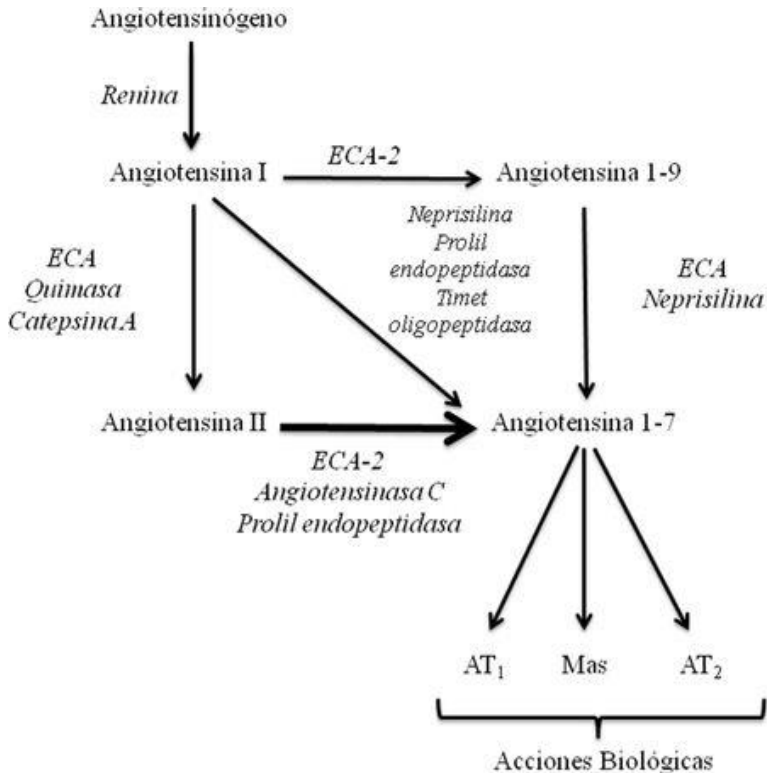
### 1.3. Angiotensina 1-7

La Ang 1-7 es un heptapéptido conocido desde la década de los 80 por estudios en tejido cerebral de ratas, en los que se observó la degradación de la Ang I en los péptidos Ang II y angiotensina III (Tonnaer, Engels et al. 1983). Inicialmente se consideró a la Ang 1-7 como un producto inactivo del SRA. Posteriormente se demostró que la Ang 1-7 es equipotente a la Ang II en liberar vasopresina *in vivo* (Schiavone, Santos et al. 1988), y que la administración de Ang 1-7 a nivel del núcleo del tracto solitario ocasiona una disminución de la presión arterial en ratas (Campagnole-Santos, Diz et al. 1990). Actualmente se considera la Ang 1-7 como un integrante biológicamente activo del SRA.

Este heptapéptido se puede sintetizar a partir de la Ang II por la acción de varias enzimas como la ECA-2, angiotensinasa C y prolil endopeptidasa (PEP). La conversión de angiotensina 1-9 (Ang 1-9) a Ang 1-7 se realiza por la ECA o la neprililina, previo paso de la ECA -2 que cataliza la hidrólisis de la Ang I para formar Ang 1-9. Sin embargo, la ECA-2 tiene más afinidad por la Ang II que por la Ang I, siendo la conversión de la Ang II a la Ang 1-7 la vía prioritaria, con una eficiencia 500 veces superior que la de la Ang I (Ferrario, Chappell et al. 1998) (Fig. 4).



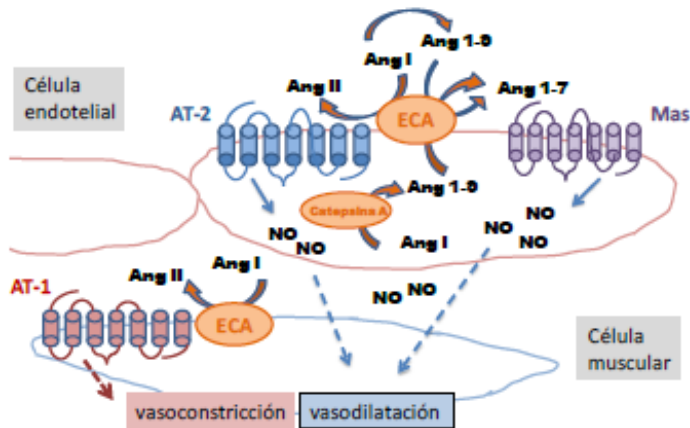
Por otra parte, se puede obtener Ang 1-7 directamente de la Ang I, mediante la neprilisina o la PEP. En estudios realizados en pacientes se observó que el 60% de la concentración plasmática de Ang 1-7 que media efectos antihipertensivos se debe a la participación tanto de la ECA-1 como de la neprilisina (Chappell, Iyer et al. 1998). Otras enzimas que participan en la ruta estudiada son la PEP y la catepsina A. La PEP es una proteína principalmente soluble, probablemente citosólica, y que degrada neurotensina en membrana sináptica de cerebro de rata, siendo su actividad especialmente elevada en cerebro (Mentlein 1988). La catepsina A se expresa en gran cantidad en tejido cardíaco, llegando a demostrar que la purificación de plaquetas de sangre humana muestra un alto porcentaje de catepsina A sobretodo en macrófagos y células endoteliales (Jackman, Massad et al. 2002).



**Figura 4. Vías de síntesis de la angiotensina 1-7.** La metabolización del angiotensinógeno conlleva la producción de Ang I y su conversión a Ang II a través de la enzima ECA-1. Sin embargo, los últimos estudios confirman la creciente participación de la Ang 1-7 en el SRA. La Ang 1-7 puede formarse directamente a través de la Ang II, o bien tras la formación de la Ang 1-9 y posterior conversión a Ang 1-7. Tomado y adaptado de Carey y Siragy, 2003.

La Ang 1-7 puede actuar a través de sus receptores, el receptor Mas y AT<sub>2</sub>, mediando sus acciones biológicas (Ferreira and Santos 2005). Las células endoteliales son un sitio de formación de la Ang 1-7, la cual actuando a través del receptor Mas

produce NO, de manera similar a la Ang II a través del receptor AT2, provocando vasodilatación (Ferreira and Santos 2005, Su, Palen et al. 2008) (Fig. 5).



**Figura 5. Relación entre la localización de la ECA-1 y los receptores AT1, AT2 de la Ang II, y el receptor Mas para la Ang 1-7 según el tipo celular.** La ECA-1 se encuentra más próxima al AT2, y no al AT1, en las células endoteliales, por lo que la Ang II formada por la enzima, activaría preferentemente el receptor vasodilatador. La angiotensina 1-9 (Ang 1-9) por medio de la ECA-1 se transforma en Ang 1-7 en CE y actuando a través del receptor Mas produce NO. Y también se observa que la Catepsina A en CE transforma la Ang 1-9 en Ang 1-7. Tomado de (Sobrino 2011) y adaptada de (Su, Palen et al. 2008).

El corazón y los vasos sanguíneos son las principales dianas de acción de la Ang 1-7, que tiene efectos cardiovasculares beneficiosos por vía directa o bien indirectamente a través de la potenciación de la bradiquinina o por contra regulación de la Ang II (Iusuf, Henning et al. 2008).

En aorta de ratón, la Ang 1-7 tiene tanto actividad vasodilatadora como antiproliferativa, frente a los efectos contráctiles y proliferativos de la Ang II (Clark, Diz et al. 2001). Estudios realizados en pacientes con hipertensión esencial describen las diversas vías enzimáticas por las cuales la Ang 1-7 se escinde de Ang I mediante la acción de endopeptidasas específicas de tejidos (Sasaki, Higashi et al. 2001).

En la actualidad, la Ang 1-7 se considera un mediador con un efecto regulador de la Ang II, y protector contra las enfermedades cardiovasculares. La inyección intracerebroventricular de Ang 1-7 tiene efectos beneficiosos sobre el derrame cerebral isquémico, mejora la disminución del flujo cerebral y aumenta la expresión de la óxido nítrico sintasa (NOS), lo que se debe a la activación de la vía ECA-2 / Ang 1-7 (Mecca, Regenhardt et al. 2011, Zheng, Li et al. 2014). Además, hay pruebas que demuestran que la Ang 1-7 ejerce sus efectos a través de un mecanismo dependiente de NO (Costa, Lopez Verrilli et al. 2010, Yang, Yin et al. 2011).

Estudios recientes han demostrado que Ang 1-7 juega un papel importante en la reducción de la proliferación y la migración de células del músculo liso, la mejora de la función endotelial y la regulación del metabolismo de lípidos, lo que lleva a una inhibición de las lesiones ateroscleróticas y a un aumento en la estabilidad de la placa (Zhang, Liu et al. 2015).

#### **1.4. El receptor Mas de angiotensina 1-7**

El receptor Mas fue inicialmente descrito en 1986 como un proto-oncogén (Young, Waitches et al. 1986), pero actualmente se ha aclarado que es un receptor de siete dominios transmembrana acoplado a proteínas G (Bader, Alenina et al. 2014). En los primeros estudios, se sugirió que era un receptor de la Ang II, el péptido efector principal del SRA. Años después, se demostró que Mas no puede unirse directamente a la Ang II, pero puede heterooligomerizar con el receptor AT1 y al hacerlo inhibe las acciones de Ang II. De este modo, Mas no es, *per se*, uno de los receptores de Ang II, pero sí influye en las cascadas de señalización activadas por el eje Ang II / AT1 (Gembaradt, Grajewski et al. 2008, Zheng, Li et al. 2014).

Debido a que algunos de los efectos de la Ang 1-7 podían ser bloqueados con inhibidores selectivos de los receptores AT1 y AT2, se suponía que estos receptores mediaban algunas de las acciones de la Ang 1-7. Sin embargo, la baja afinidad de la Ang 1-7 por los receptores AT1 y AT2 (Rowe, Saylor et al. 1995), así como la existencia de efectos de la Ang 1-7 que no eran bloqueados por los antagonistas de los receptores AT1 y AT2, llevaron a plantear la existencia de un receptor selectivo para la Ang 1-7.

Se demostró que la delección del gen del receptor Mas en ratones evita la unión de la Ang 1-7 y ocasiona la pérdida de la acción antidiurética de la misma, lo que demostraba que la Ang 1-7 es el ligando endógeno del receptor Mas (Santos, Simoes e Silva et al. 2003). Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de la existencia de ligandos adicionales para el receptor Mas, o que la Ang 1-7 pueda actuar sobre otros receptores adicionales (Rowe, Saylor et al. 1995).

Mediante el receptor Mas, la Ang 1-7 incrementa la producción de NO al activar la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), a través de un mecanismo que involucra una cascada de fosforilaciones, entre ellas la fosforilación de la Ser1777 y la defosforilación de la Thr495, lo cual lleva a la activación de la vía PIK3-AKT (Duckles and Miller 2010). Junto con la interacción Mas-Ang 1-7 se ven envueltos otros mecanismos como la disminución de la resistencia vascular o del flujo sanguíneo en riñón, cerebro, mesenterio y piel de rata, atribuido al efecto vasodilatador de la Ang 1-7, acción que dependerá del diámetro del vaso sanguíneo y de la región vascular (Ferreira and Santos 2005, Alenina, Xu et al. 2008).

La investigación a través de la modulación farmacológica de Mas se inició con el antagonista específico del receptor Mas (A779), un heptapéptido antagonista selectivo de Ang 1-7, fue descrito en ratas con la secuencia Asp1-Arg2-Val3-Tyr4-Ile5-His6-D-Ala7 (Santos, Campagnole-Santos et al. 1994). En

experimentos donde se exponían a Ang 1-7 neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo de rata, se demostró el efecto antagonista específico del A779 sobre el receptor Mas (Ambuhl, Felix et al. 1994) y más tarde se probó la inhibición de la acción hipotensiva de la Ang 1-7 por este antagonista en la presión arterial de ratas (Bayorh, Wang et al. 1999). En células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), también se demostró el bloqueo del receptor de Ang 1-7, provocando una inhibición de la liberación de NO en células tratadas con Ang 1-7 y BK (Peiro, Vallejo et al. 2007). El A779 antagoniza varias acciones de la Ang 1-7, incluyendo el efecto antidiurético y los cambios en las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) producidos por la Ang 1-7 (Liu, Li et al. 2015).

Estudios recientes, realizados en modelos de animales *knockout*, modificados genéticamente para la caracterización de nuevos componentes del SRA, han demostrado que el receptor Mas y el AT2 son los receptores protectores mejor caracterizados dentro del SRA y, recientemente, se ha demostrado que existe un receptor Mas circulante relacionado a proteína G (MrgD), identificado en sangre humana (Lautner, Villela et al. 2013), y que ha demostrado que tiene propiedades similares al receptor Mas de membrana al unirse y activarse con el péptido alamandina. Ambos receptores AT2 y receptor Mas median en multitud de acciones regenerativas y protectoras de tejidos, incluyendo acciones antiinflamatorias, antifibróticas,

neuroregenerativas, vasodilatación y acciones metabólicas beneficiosas (Villela, Leonhardt et al. 2015).



## **1.5. Células endoteliales.**

El endotelio vascular es un epitelio simple que reviste internamente los vasos sanguíneos, linfáticos y el corazón. Está formado por una monocapa de células endoteliales, cuyas características varían dependiendo de que el vaso sea una vena, arteria, vénula, arteriola o capilar, y del lugar y función que desempeñe. El endotelio es un órgano esencial para la fisiología vascular cuya disfunción puede ser un factor crítico en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular (Aird 2007).

En condiciones normales, el endotelio presenta actividades paracrinas, endocrinas y autocrinas que ejercen un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis del organismo (Aird 2007). El endotelio está implicado en funciones fisiológicas vitales como el control del tono vasomotor, el intercambio de fluidos y nutrientes, el mantenimiento de la hemostasia y coagulación, la respuesta inflamatoria y la angiogénesis y vasculogénesis (Reriani, Lerman et al. 2010).

Las células endoteliales regulan el flujo sanguíneo y el tono vasomotor y, por tanto, la presión sanguínea, a través de la liberación de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras. Entre las sustancias asociadas a las respuestas vasomotoras mediadas por el endotelio están el NO, la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>),

las endotelinas (ET), la angiotensina, el tromboxano (TXA<sub>2</sub>), radicales libres y posiblemente otras sustancias aún por caracterizar (Davies and Hagen 1993).

## 1.6. Óxido Nítrico

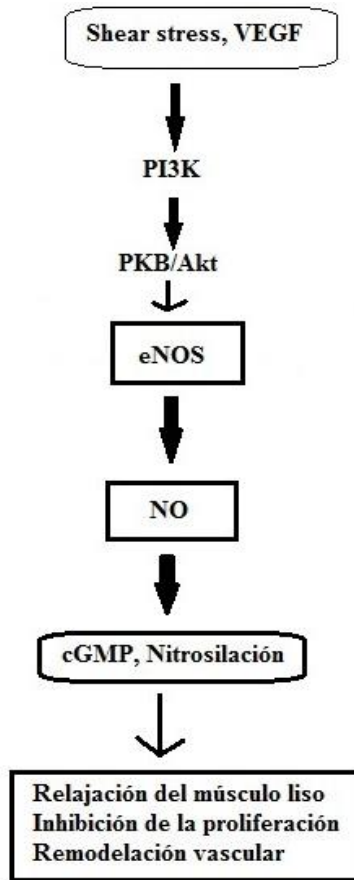
El NO se forma a partir de la L-arginina por acción de las NOS, que catalizan la oxidación de uno de los dos nitrógenos guanidínicos equivalentes de la L-arginina, aminoácido semiesencial para producir NO y L-citrulina (Palmer, Ashton et al. 1988). Otros sustratos requeridos son el dinucleótido fosfato de nicotinamida adenina (NADPH) y el oxígeno, ya que la formación de NO procede en dos pasos, y consiste en la oxidación de la L-arginina para producir N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginina, reduciendo el NADPH, seguida de una oxidación de nitrógeno para formar NO.

El NO es una molécula de señalización gaseosa y es un efector en diversos procesos biológicos. En células de mamíferos, el NO es producido por una familia de NOS y se han identificado tres isoformas de NOS como la NOS neuronal (nNOS), la NOS inducible (iNOS) y la NOS endotelial (eNOS), por lo que el NO participa en muy diversos procesos como la regulación del tono vascular (endotelio), la neurotransmisión (sistema nervioso central y periférico), y la citotoxicidad mediada por células (macrófagos y neutrófilos) (Moncada and Higgs 1993, Bredt and Snyder 1994).

Además de NO, la NOS también produce anión superóxido, y la generación de superóxido se produce principalmente cuando NOS está desacoplada con su cofactor o sustrato, este fenómeno se denomina el desacoplamiento de la NOS. Aunque en un principio se describió que la NOS producía superóxido solamente cuando estaba desacoplada con su cofactor (NADPH) o sustratos (L-arginina y oxígeno), estudios recientes revelan que la reducción del oxígeno a superóxido es un proceso intrínseco dentro de la síntesis de NO. La producción de superóxido es una característica común de las tres isoformas de NOS, pero se ha descrito que la formación de superóxido a partir del desacoplamiento de la eNOS desempeñan papeles críticos en los procesos de diversas enfermedades cardiovasculares (Luo, Lei et al. 2014).

La eNOS, que es la isoforma de la NOS involucrada en nuestros estudios, es la fuente principal del NO liberado en el lumen de los vasos sanguíneos, actúa como inhibidor de la agregación y adhesión plaquetaria a la pared vascular, y es un vasodilatador fisiológico con efectos vasoprotectores (Forstermann and Sessa 2012). El NO es una molécula clave dentro del sistema cardiovascular, ya que niveles adecuados de esta molécula, son de suma importancia en el mantenimiento de la fisiología vascular normal (Ignarro 1999). Las células endoteliales vasculares sintetizan NO continuamente para causar vasodilatación y limitar cualquier incremento en la presión

sanguínea sistémica (Rees, Palmer et al. 1989). Existen diferentes estímulos que hacen que la producción vascular del NO varíe a lo largo del tiempo. Entre los factores que estimulan la producción de NO figuran el ejercicio físico, el estrés de cizallamiento (Fig. 6), la Ang II, la PGI<sub>2</sub>, la histamina, la acetilcolina, bradiquinina o la baja presión parcial de oxígeno (Snyder and Jaffrey 1999). Entre los factores que han demostrado disminuir la producción de NO encontramos el estrés oxidativo, tabaquismo y la LDL oxidada (Palmer, Ashton et al. 1988, Tozzi-Ciancarelli, Penco et al. 2002, Michel and Vanhoutte 2010, Van Keulen, Gomes et al. 2017).



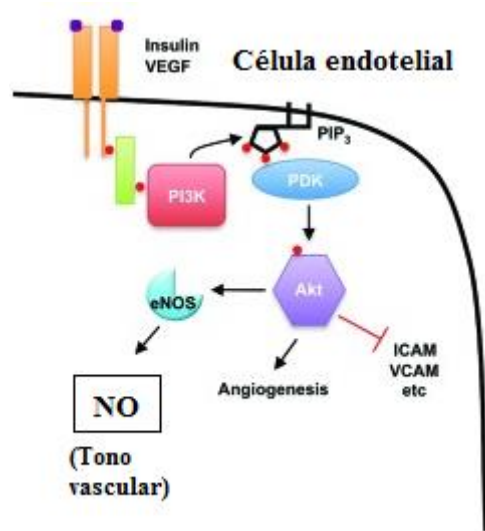
**Figura 6. Ilustración del efecto del óxido nítrico liberado por la ruta de la Akt y la acción de la eNOS.** Debido al estrés de cizallamiento, *shear stress*, se produce la activación de la ruta de PI3K/Akt conduce a la fosforilación de eNOS y una producción constitutiva de NO. Tomado y traducido de (Snyder and Jaffrey 1999).

Los cambios en la producción de NO pueden producirse de forma rápida o a largo plazo: los efectos rápidos, mediante

enzimas que fosforilan la eNOS y los cambios a largo plazo mediante cambios en la cantidad de proteína eNOS. Entre los efectos rápidos en la producción de NO en células endoteliales destaca la cascada de fosforilación de PI3K/Akt cuya activación forma parte del desarrollo vascular normal (McCurdy and Klemm 2013) (Fig. 7).

En el endotelio, la vía PI3K/ Akt participa en funciones tales como la regulación del tono vascular, la angiogénesis, el control de la adhesión y el reclutamiento de leucocitos en la pared de los vasos, y en particular las isoformas de la PI3K están implicadas en la síntesis de NO, en la biología de las células progenitoras endoteliales y en la angiogénesis (Morello, Perino et al. 2009).

La función de la eNOS está estrictamente regulada a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-translocacional. Este último está implicado en la fosforilación de diferentes residuos de la eNOS por diferentes quinasas, incluyendo la quinasa A, la activación de la MAP quinasa y la quinasa C. Tras la estimulación de la PI3K, la activación de la Akt fosforila la eNOS en Ser-1177 potenciando la actividad basal de la eNOS dando lugar a la liberación de NO (McCurdy and Klemm 2013).



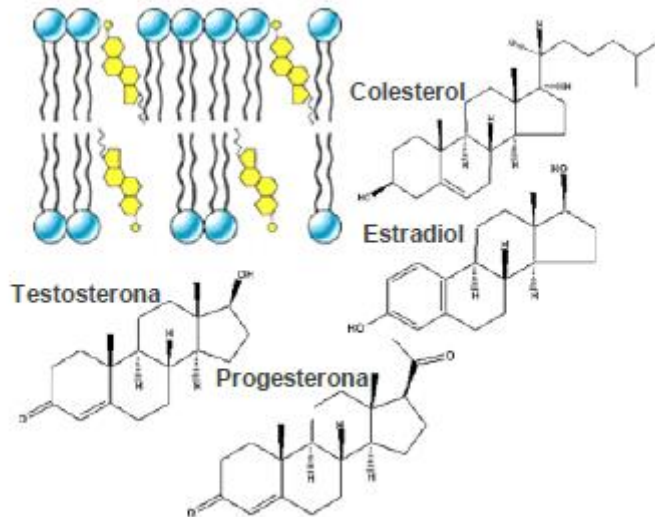
**Figura 7. Cascada de señalización de PI3P en células endoteliales:** En células endoteliales vasculares la activación del Akt, como consecuencia de la cascada de señalización de PI3K, promueve la angiogénesis y la regulación del tono vascular con la producción de NO (McCurdy and Klemm 2013).

El NO juega un papel importante en la propia protección del endotelio contra enfermedades coronarias. La disminución del NO por parte de las células endoteliales inicia una serie de eventos, denominados en conjunto disfunción endotelial, que conducen a la aparición de aterosclerosis y con frecuencia a la enfermedad coronaria (Michel and Vanhoutte 2010).



## **1.7. Los estrógenos en el sistema cardiovascular**

Los estrógenos son hormonas sexuales esteroideas, producidas por los ovarios y, en menor cantidad, por las glándulas adrenales. El núcleo fundamental de estas hormonas es el ciclopentanoperhidrofenantreno, y según el número de átomos de carbono pueden dividirse en pregnanos (21 carbonos), androstanos (19 carbonos) y estranos (18 carbonos). Los ejemplos típicos de estos grupos de hormonas sexuales son la progesterona, la testosterona y el  $17\beta$ -estradiol (E2), respectivamente (Fig. 8).



**Figura 8. Hormonas esteroideas.** Según el número de átomos de carbono pueden dividirse en pregnanos (21 carbonos), androstanos (19 carbonos) y estranos (18 carbonos). Los ejemplos típicos de estos grupos son la progesterona, la testosterona y el E2, respectivamente (Sobrino 2011).

En humanos, el E2 es el más abundante de los estrógenos. Las concentraciones plasmáticas de E2 en las mujeres, suelen estar en el rango de 0,1- 1 nM, aunque son variables según la etapa fisiológica en la que se encuentre la mujer. Los niveles de E2 son superiores en la etapa de gestación y los valores fisiológicos de E2 disminuyen un 90% al alcanzar la menopausia (Geisler 2003).

Los estrógenos juegan un papel central en la fisiología del organismo. Tres proteínas han sido identificadas como mediadoras de estos efectos estrogénicos y por tanto receptores de estrógenos (RE): RE $\alpha$ , RE $\beta$  y GPER. El modelo clásico o “genómico” de acción de los RE sugiere que el receptor al unir la hormona es capaz de activar la transcripción de genes que participan en el control del crecimiento y proliferación celular (RE $\alpha$  y RE $\beta$ ). El efecto no-genómico de los RE de membrana, se lleva a cabo a través de una activación de cascadas de transducción de señales por medio de un receptor estrógeno anclado a la membrana (RE $\alpha$ , RE $\beta$  y GPER). Los RE son proteínas de la “súper familia de receptores nucleares”, la cual incluye también otros receptores de hormonas esteroideas, el receptor de la vitamina D, retinoides, hormona tiroidea y algunos receptores huérfanos (Evans 1988). Tanto el RE $\alpha$  como el RE $\beta$  son receptores esteroideos clásicos que se dimerizan y se translocan al núcleo tras la unión con su ligando (Zimmerman, Budish et al. 2016).

El RE $\alpha$  está implicado en la síntesis de NO por medio de la activación de la eNOS mientras que se ha descrito que el RE $\beta$  no interacciona con PI3K, lo que refuerza la idea de que las 2 isoformas de RE tengan distintos papeles tanto en tejidos como en la pared vascular (Simoncini, Rabkin et al. 2003). Ha habido algunas controversias sobre la existencia del RE $\alpha$  en HUVEC, como en el estudio de Toth y colaboradores (Toth, Saadat et al.

2008) que afirmó que las HUVEC solo expresaban RE $\beta$ , pero diversos autores han confirmado la existencia del RE $\alpha$  en HUVEC y endotelio de aorta de rata (Sobrino, Mata et al. 2009, Arnal, Fontaine et al. 2010, Chakrabarti, Lekontseva et al. 2010).

El papel de los receptores de estrógenos clásicos se ha estudiado fundamentalmente gracias al inhibidor inespecífico de RE, el ICI182780, descubierto por su potente efecto (Wakeling, Dukes et al. 1991) y que se describió como un antiestrógeno puro, candidato ideal para tratar el cáncer de mama humano endocrino-sensible (Hermenegildo and Cano 2000). Sin embargo, estudios realizados posteriormente en neuronas de hipocampo de rata, han demostrado que el ICI182780 actúa como agonista de RE induciendo directamente una serie de oscilaciones rápidas de concentración de Ca<sup>2+</sup> comparando este efecto con el E2 (Zhao, O'Neill et al. 2006). Otros análisis demostraron que también era comparable el efecto inductor del ICI182780 al efecto del 17  $\beta$ -estradiol sobre la proteína quinasa B y la Akt en neuronas de hipocampo de rata. Tomando este conjunto de resultados del análisis de ICI182780 se obtuvo una evidencia clara del efecto agonista estrogénico de esta molécula en neuronas, actuando también con una alta afinidad por el receptor estrogénico de membrana GPER, por lo que se postula que tendría una aplicación en el tratamiento del Alzheimer y en la prevención de la neurodegeneración post-menopausica (Zhao,

O'Neill et al. 2006). En células endoteliales está ampliamente demostrado su efecto antagonista, del RE $\alpha$ , RE $\beta$ , y de ambos RE (Sobrino, Mata et al. 2009, Novella, Laguna-Fernandez et al. 2013, Mompeon, Lazaro-Franco et al. 2016).

Los estudios realizados hasta el momento sobre los efectos vasculares de los estrógenos son mucho más numerosos que los realizados con otras hormonas esteroideas. Incluyen estudios clínicos, realizados fundamentalmente en mujeres posmenopáusicas, estudios realizados en vasos aislados y estudios realizados en cultivos celulares, en los dos tipos celulares más implicados en la función vascular, las células del músculo liso vascular (CMLV) y las células endoteliales (Tostes, Nigro et al. 2003). A nivel vascular, el endotelio es la diana principal para el E2. En su función endocrina, los estrógenos atraviesan la membrana celular para llegar al núcleo, en el que se encargan de activar o desactivar determinados genes, regulando la síntesis de proteínas.

En el caso de las células vasculares, los efectos biológicos del E2 también están mediados por la unión y la activación de los receptores intracelulares RE $\alpha$  y RE $\beta$ . Junto con estas acciones genómicas clásicas, un pequeño grupo de RE localizado en la membrana plasmática puede iniciar una cascada de señalización esteroidea dando lugar a la activación de varias rutas metabólicas de fosforilaciones de quinasas (Arnal, Fontaine et al. 2010).

El receptor GPER, está distribuido a lo largo del cuerpo incluyendo corazón, cerebro, páncreas, músculo esquelético, riñón, vasos sanguíneos y órganos reproductores, pero el GPER vascular no es sensible al estado hormonal por lo que se afirma que la activación de este receptor no solo induce vasodilatación, sino que también protege frente a la hipertensión. En arterias carótidas de rata, el GPER induce vasodilatación y es dependiente de endotelio, pero en arterias coronarias la respuesta es independiente de endotelio (Zimmerman, Budish et al. 2016). Estos descubrimientos y los experimentos realizados por otros autores indican que ni los receptores estrogénicos, ni los componentes del SRA se regulan de manera uniforme bajo las mismas condiciones (Barton, Meyer et al. 2011).

Los estrógenos ejercen muchas otras acciones vasculares, fundamentalmente promoviendo la síntesis de vasodilatadores endoteliales (Sobrinho, Mata et al. 2009). Entre otros efectos, los estrógenos actúan sobre el SRA en diferentes puntos de la cascada: en la formación de Ang II, en los niveles de receptor de Ang II y en la respuesta inducida por Ang II (Tostes, Nigro et al. 2003). Por tanto, por un lado, los estrógenos aumentan la expresión génica y los niveles plasmáticos de angiotensinógeno. Los estrógenos también afectan a los niveles circulatorios de renina, variando según el sexo y los niveles de hormonas. Por otro lado, el déficit de estrógenos se ha demostrado que aumenta los niveles de RNAm del receptor de Ang II; AT1, así como la

eficacia de la vasoconstricción ejercida por la Ang II (Tostes, Nigro et al. 2003).

Existen otros mecanismos por los cuales las hormonas estrogénicas ejercen efectos beneficiosos a nivel vascular en las mujeres, aunque no hayan sido demostrados en ensayos clínicos bien controlados (Novella, Dantas et al. 2012). Uno de los enfoques más relevantes se relaciona con los efectos de los estrógenos sobre el metabolismo de los lípidos (Nathan and Chaudhuri 1997). Estudios recientes en aorta humana afirman que la expresión del RE $\alpha$  inducido por E2 en el endotelio reduce los lípidos circulantes (Li, Liu et al. 2015).

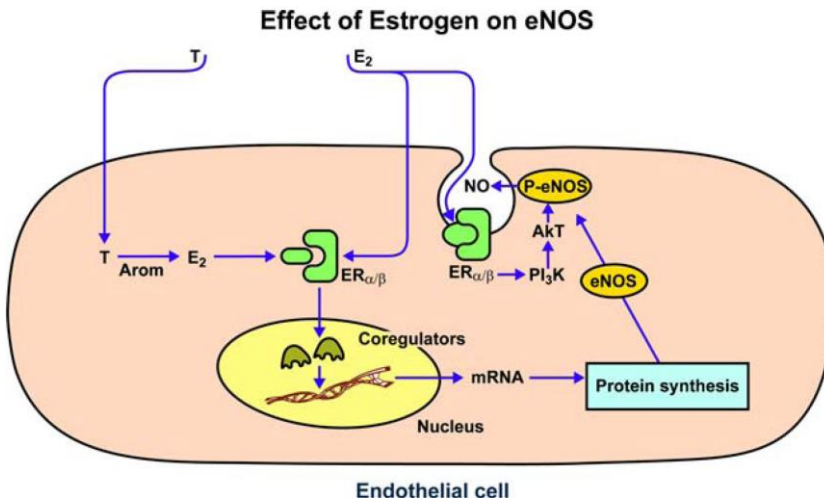
Por otra parte, se han descrito los efectos de los estrógenos sobre la homeostasis sanguínea (Bilsel, Onaran et al. 2000) y la inflamación (Cvoro, Tatomer et al. 2008). Y otros enfoques han analizado los efectos que estas hormonas sexuales ejercen sobre las células endoteliales, generando la síntesis de factores derivados del endotelio como las PGI<sub>2</sub>, la ET-1 y el NO (Wakasugi, Noguchi et al. 1989, Polderman, Stehouwer et al. 1993, Tostes, Nigro et al. 2003). En el sistema cardiovascular los estrógenos han demostrado que regulan tanto la reactividad vascular como la ruta de regulación del crecimiento y apoptosis celular (Li, Liu et al. 2015).

Sin embargo, el principal mecanismo por el que el E2 induce vasodilatación en el sistema cardiovascular es a través del

aumento de la producción de NO, demostrado en diversos lechos arteriales (Thompson, Pinkas et al. 2000, Guo, Razandi et al. 2005). Estudios recientes muestran que el E2 induce aumentos de NO en células endoteliales cerebrales y periféricas humanas, a través de la activación de la eNOS y a través de mecanismos mediados por receptores de E2 (Nevzati, Shafighi et al. 2015).

Tanto el RE $\alpha$  como el RE $\beta$ , están involucrados en la síntesis de NO por medio de la activación de la eNOS. Este efecto está parcialmente atribuido a la MAP kinasa o a la tirosin kinasa, también al efecto celular de la Akt, por acción de la PI3K, aumenta la eNOS en células endoteliales de vena safena humana (Simoncini, Rabkin et al. 2003) (Fig. 9).





**Figura 9. Efecto del E2 en la eNOS.** E2 se une a ER $\alpha$  y ER $\beta$  en 2 sitios: receptores de membrana y citosólicos. La unión de E2 a receptores de membrana activa la vía de la PI3K/Akt, llevando a una fosforilación de la eNOS. Este aumento de la eNOS produce NO. La unión a ER citosólicos provoca una translocación del receptor al núcleo, y esta unión produce una co-regulación en el DNA aumentando el RNAm de eNOS, lo que se traducirá en un aumento de la producción de proteína eNOS ribosómica. Tomado de (Duckles and Miller 2010).

Los estrógenos también tienen un efecto protector cardiovascular que depende de la regulación no transcripcional en la pared de los vasos. El papel más importante es ejercido por la activación de la síntesis de NO en células endoteliales el cual interviene en efectos estrogénicos. En estudios realizados en 3 tipos de ratas, los resultados sugieren que el E2 protege a los individuos de padecer hipertensión y tienen un efecto protector

del endotelio por aumentar el NO y el péptido natriurético atrial mientras que disminuye la actividad de la renina. Este efecto protector de los estrógenos tiene una aparente contradicción con los efectos de algunos de los componentes del SRA, pero esto es una de las claves para el control de la presión arterial y las patologías cardiovasculares, en particular la región promotora del gen del angiotensinógeno es sensible a E2 (Dean, Tan et al. 2005, Xu, Xiao et al. 2008). Los estrógenos también provocan la liberación de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras, y en concreto en el endotelio liberan sustancias vasodilatadoras como el NO, prostaciclina y factor hiperpolarizante derivado del endotelio, y sustancias vasoconstrictoras como la endotelina, Ang II y tromboxano A<sub>2</sub> (Khalil 2013).

Estudios recientes afirman que los beneficios cardiovasculares, observados en HUVEC, de la terapia con E2 se ven potencialmente incrementados cuando se combina el E2 con progesterona a dosis bajas de (5nM), lo que provoca una cascada de fosforilaciones, ya descritas con anterioridad (Fig. 9), dando como resultado un aumento de la producción de NO, afirmando con estos resultados la posibilidad de una mejora en los efectos beneficiosos de la terapia hormonal sustitutiva en mujeres postmenopáusicas (Pang and Thomas 2017).



## **2. HIPÓTESIS**



Las células endoteliales juegan un papel central en el mantenimiento de la homeostasis vascular, siendo el SRA un modulador fundamental. Estudios previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que el E2 aumenta la expresión génica de ECA-1 en HUVEC. La mayor parte de las acciones endoteliales del E2 han demostrado, en estudios realizados en células en cultivo, un perfil potencialmente beneficioso desde el punto de vista cardiovascular, mediado en la mayor parte de las ocasiones a través del REa.

El aumento en la expresión de ECA-1 inducido por E2 podría dar lugar a un incremento de Ang II, que no se correspondería con el perfil beneficioso habitual de este estrógeno. Por ello, es importante conocer también la regulación de la expresión de ECA-2. Además, para ser funcionalmente relevante, esta regulación a nivel génico debería tener consecuencias tanto a nivel proteico como a nivel de la actividad enzimática, resultando en un cambio en la producción de Ang II y/o de Ang 1-7.

Finalmente, para valorar las consecuencias de la regulación del SRA debemos también estudiar el papel de los receptores de los metabolitos propuestos, que en el caso de la Ang 1-7 sería el

receptor Mas, y valorar su implicación funcional sobre el endotelio, concretamente en la producción de NO.

Por todo ello, la hipótesis que pretendemos testar es: “El E2 regula el SRA endotelial a través de los RE y modifica la producción de Ang II y/o Ang 1-7 que, actuando a través de sus receptores, provocan cambios en la producción endotelial de NO”.

### **3. OBJETIVOS**





El objetivo general de esta tesis doctoral es analizar la regulación por E2 a través de RE de la producción endotelial de Ang 1-7 y su repercusión en la producción de NO.

Los objetivos específicos son:

1. Analizar el efecto del E2 sobre la producción de Ang 1-7, estudiando la expresión génica y proteica de ECA-1 y ECA-2 y sus actividades enzimáticas, en HUVEC.
2. Estudiar la participación de los RE en la regulación de la producción de Ang 1-7 en HUVEC expuestas a E2.
3. Examinar la participación de los RE y del receptor Mas en la producción de NO en HUVEC expuestas a E2.



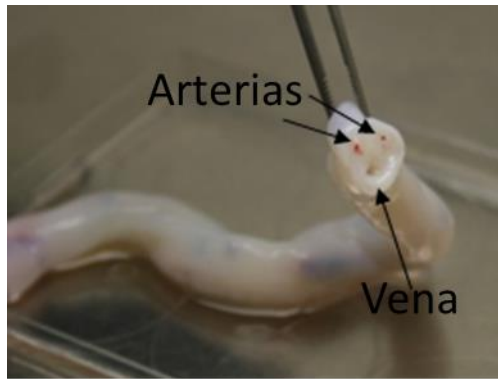
## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**



#### **4.1. Obtención y cultivo de células endoteliales de vena del cordón umbilical humano.**

Las HUVEC se obtuvieron a partir de vena de cordones umbilicales de recién nacidos procedentes de partos del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico Universitario de Valencia. Todas las donantes firmaron el consentimiento informado según la normativa del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

El procedimiento seguido para la obtención de HUVEC se basó en el método descrito por Jaffe (Jaffe, Nachman et al. 1973) y se describe a continuación. Tras el parto, los cordones umbilicales se mantuvieron en una solución de tampón fosfato (PBS) compuesto por NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM con un pH de 7,4 (Sigma-Aldrich) a 4°C hasta su procesado. La extracción de HUVEC se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar e inicialmente el cordón se lavó con PBS, se identificó la vena y se canuló con una llave de doble vía (Vygon); (Fig. 10).



**Figura 10. Cordón umbilical humano.**

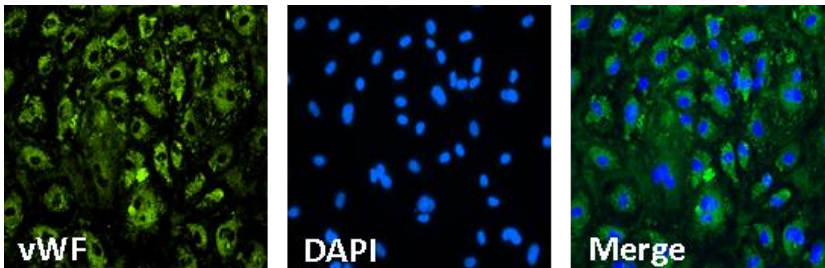
El interior de la vena se lavó con una solución de PBS para eliminar los restos de sangre de la luz vascular. Tras el lavado, se introdujo una solución de colagenasa (0,1 mg/mL) (Thermofisher Scientific) y se incubó durante 15 min. a 37°C, para desprender las HUVEC por digestión enzimática. Transcurrido este tiempo, se recogieron los líquidos que contenían las células disgregadas con Medio 199 suplementado con 20% de suero bovino fetal (SBF); (Gibco, Life Technologies). Se centrifugó a 700 x g para sedimentar las células que fueron sembradas en frascos de 25 cm<sup>2</sup> (Orange Scientific) con el medio de cultivo específico para células endoteliales humanas EBM-2 (Lonza) y suplementado con los SingleQuots® (Lonza), compuesto por factores de crecimiento EGM-2 (Heparina, ECGS, antibióticos, antifúngicos y SBF 2%), y se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad del 95%.

El seguimiento de los cultivos se realizó mediante observación microscópica en un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon). El medio de cultivo se renovó cada 48 horas. Cuando el cultivo alcanzó el 100% de confluencia, las células endoteliales se despegaron del soporte plástico por acción enzimática de una solución de tripsina-EDTA 0,05% (GIBCO, Life technologies) al 1% en PBS. Para ello las células se lavaron con PBS y se incubaron con tripsina-EDTA durante 5 min. a 37°C. Una vez despegadas las células, la actividad enzimática de la tripsina se detuvo con la adición de Medio 199 suplementado con 20% de SBF. La suspensión celular se recogió en tubos estériles de fondo cónico de 50 ml y se centrifugó a 700 x g, quedando las células precipitadas en el fondo del tubo. Éstas se resuspendieron en el medio de cultivo final, EGM-2, y se sembraron en diferentes frascos o placas de cultivo, según el experimento al cual iban a ser destinadas.

Las células fueron identificadas como endoteliales por su característica morfología adoquinada en el microscopio de contraste de fases y también por la presencia del factor VIII o factor von Willebrand (vW) determinada mediante inmunocitoquímica con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti con objetivo 10X (magnificación total 100X). El factor vW se almacena y libera de los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales por lo que su anticuerpo es utilizado como un marcador específico de estas células. Para la



caracterización por inmunocitoquímica, las células se sembraron en un cristal estéril recubierto de fibronectina (25  $\mu\text{g/ml}$ ). Las células en este cultivo se incubaron con el anticuerpo anti- factor vW específico producido en conejo (F-3520, Sigma). Después de varios lavados con PBS, las células se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con una sonda fluorescente FITC, durante 1 hora a temperatura ambiente. La presencia del factor vW se determinó por la presencia de fluorescencia en el citoplasma celular. Los núcleos celulares fueron teñidos con el marcador celular DAPI, que se une fuertemente a regiones ricas en Adenina y Timina en secuencias de ADN. En el tercer pase celular, el 100% de las células fueron positivas para el factor vW (Fig. 11), por lo que todos los experimentos se realizaron entre el pase 3 y el pase 5.



**Figura 11. HUVEC positivas para el factor vW.** Inmunocitoquímica de HUVEC ; en verde el citoplasma de las células marcado con el factor vW, en azul los núcleos marcados con DAPI y la superposición de ambas.

Para mantener unas condiciones de cultivo reproducibles entre pases y experimentos, se sembró el mismo número de células

por pocillo. Para ello, se determinó el número de células mediante recuento en hemocitómetro, la cámara de Neubauer. Debido a que la tripsinización y pipeteo de las células siempre conlleva algo de muerte celular, las células se tiñeron con Azul de Tripán (Lonza), a 0,4% en PBS. El número de células viables se calculó previo recuento de células que mantenían la integridad de la membrana y no se teñían por tanto con azul tripán.

## **4.2. Exposición de las HUVEC a los distintos tratamientos.**

Cuando las células alcanzaron una confluencia de un 80%, el medio se reemplazó por un Medio 199 libre de rojo fenol (Life Technologies) suplementado con factores de crecimiento EGM-2 presentes en los SingleQuots® (Lonza) y SBF libre de estrógenos. Previamente, el SBF se trató durante 2 horas a 56°C con carbón activado recubierto de dextrano para eliminar el componente estrogénico. Este medio libre de hormonas y de rojo fenol es el adecuado para estudiar los efectos de hormonas sexuales. Las células se mantuvieron en este medio de cultivo durante 24 horas, antes de iniciar los tratamientos con las siguientes sustancias:

- Ang 1-7, 1  $\mu$ M (Bachem).
- E2, 0,1-10 nM (17 $\beta$ -estradiol; Sigma-Aldrich).
- PPT, 10 nM (1,3,5- tris (4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1h-pyrazole; Tocris Bioscience). Agonista específico de receptor de estrógenos  $\alpha$  (RE $\alpha$ ).
- DPN, 10 nM: (2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile; Tocris Bioscience). Agonista específico de receptor de estrógenos  $\beta$  (RE $\beta$ ).
- ICI 182780, 1  $\mu$ M (Biogen). Antagonista inespecífico de RE.

- MPP, 1  $\mu$ M (methyl-piperidino-pyrazole; Tocris Bioscience). Antagonista específico de RE $\alpha$ .
- Lisinopril, 1  $\mu$ M (Sigma-Aldrich). Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina-1 (ECA-1), (Desideri, Grassi et al. 2008).
- A779, 1  $\mu$ M (D-Ala-Ang 1-7; Bachem). Antagonista específico del receptor Mas (Peiro, Vallejo et al. 2007).
- L-NAME, 100  $\mu$ M (Nitro-L-Arginine Methyl Ester Hydrochloride, Sigma-Aldrich). Inhibidor de la NOS.

Partiendo de una solución inicial de E2 de 100 mM, se realizaron diluciones seriadas de E2 en etanol al 10%. La concentración final de etanol en el medio de cultivo fue del 0,1%. Asimismo, se realizaron diluciones seriadas para ICI182780, MPP, PPT o DPN en dimetil sulfóxido (DMSO) al 10%, alcanzándose una concentración final de DMSO en el medio de cultivo del 0,1%. A779 y lisinopril fueron diluidos en PBS. En todos los experimentos las células fueron expuestas a sus respectivos vehículos, comprobando que éstos no provocaban cambios respecto a las células control.

Todos los antagonistas (MPP, ICI, lisinopril y A779) se añadieron 30 min. antes que los agonistas (E2, Ang 1-7, DPN y PPT). Posteriormente las células se mantuvieron con cada uno de estos tratamientos durante 24 horas.

### **4.3. Determinación de la expresión génica de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC.**

El análisis de la expresión génica se llevó a cabo mediante una PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) midiendo la cantidad relativa de transcritos de un conjunto determinado de genes respecto a un gen endógeno expresado constitutivamente.

#### **4.3.1. Extracción del RNA total.**

Tras la exposición de las HUVEC a los diferentes tratamientos, éstas se recogieron con Trizol (Thermo Fisher Scientific) para proceder a la extracción del RNA total. Para asegurar una perfecta homogenización las células se recogieron utilizando jeringuillas de 1 mL y agujas hipodérmicas 25G x 5/8". La extracción del RNA total se realizó en columnas de sílica gel con el kit comercial PureLink RNA Mini Kit (Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. El DNA genómico se eliminó por digestión con DNasa, en columna. Finalmente, el RNA fue eluido de las columnas, se cuantificó y se congeló a -80°C hasta su posterior uso.

La integridad del RNA se determinó mediante el bioanalizador 2100 Bioanalyzer (Agilent). Además, también se determinó la pureza de muestras de RNA aislado mediante el cálculo del ratio

de absorbancia  $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ . Únicamente se utilizaron aquellas muestras en las que el RNA presentaba buena integridad y un ratio  $\lambda_{260}/\lambda_{280} > 1,8$ .

#### **4.3.2. Síntesis de cDNA a partir del RNA total.**

Para poder llevar a cabo la RT-PCR es necesario retrotranscribir el RNA total a cDNA. Este proceso se llevó a cabo con el kit High-Capacity RNA-to-cDNA (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante. El termociclador utilizado para la retrotranscripción fue el Mastercycler Eppendorf Thermocycler (Eppendorf).

#### **4.3.3. PCR cuantitativa a tiempo real.**

La cuantificación de los genes ECA1, ECA2 y GAPDH se realizó con sondas TaqMan (Hs00174179\_m1, Hs01085333\_m1 y Hs99999905\_m1, respectivamente) (Thermofisher Scientific) y se llevó a cabo por RT-PCR en el termociclador ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) y con el uso de la tecnología TaqMan (Applied Biosystems). Esta tecnología permite la detección y cuantificación de la expresión genética relativa a un gen endógeno. En nuestro caso el gen endógeno de elección fue el GAPDH.

Las reacciones de PCR se prepararon con el Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) y las sondas Taqman

siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se analizaron con el programa SDS 2.3 (Applied Biosystems) y se expresaron como la expresión relativa al gen endógeno GADPH. Los valores de las gráficas se calcularon como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  y se expresan como el porcentaje (%) del control. La variación en la expresión de un gen ( $\Delta\Delta Ct$ ) se obtuvo de la siguiente manera:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{tratamiento}} - \Delta Ct_{\text{control}}$$

donde

$$\Delta Ct_{\text{tratamiento}} = Ct(\text{gen problema}_{\text{tratamiento}}) - Ct(\text{gen endógeno}_{\text{tratamiento}})$$

y

$$\Delta Ct_{\text{control}} = Ct(\text{gen problema}_{\text{control}}) - Ct(\text{gen endógeno}_{\text{control}})$$

#### **4.4. Determinación de la expresión proteica de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC.**

##### **4.4.1. Lisado y homogeneización de las células.**

Una vez que las células HUVEC fueron tratadas en los frascos de 25 cm<sup>2</sup> durante 24 horas con E2, agonistas y antagonistas de los RE, se recogieron las células y se resuspendieron en tampón de lisis, compuesto por Ripa Buffer (Sigma) con inhibidor de proteasas, Complete Mini (Roche), e inhibidor de fosfatasa PhosSTOP (Roche). Después fueron sonicadas (amplitud = 20 kHz; durante 1+1sec) y centrifugadas a 12.000 x g, quedando en el precipitado los restos celulares y en el sobrenadante las proteínas que se congelaron a -20°C hasta su ensayo.

##### **4.4.2. Cuantificación de proteínas.**

Para determinar la concentración de proteínas de cada una de las muestras se utilizó la determinación con ácido bicinónico (BCA) siguiendo las instrucciones del fabricante (BCA Protein Assay, Pierce, Fisher Scientific). Para realizar la lectura de las absorbancias a 562 nm, las placas se colocaron en un espectrofotómetro (Spectra Max Plus 384, Molecular Devices) acoplado a un ordenador con el software SoftMax Pro 4.3 LS (Molecular Devices). Los valores de absorbancia obtenidos para las diferentes muestras fueron interpolados en una curva patrón



que se preparó utilizando diluciones seriadas de una solución stock de 2 mg/ml en 0,9% de NaCl de albúmina de suero bovino (BSA) proporcionada por el kit.

#### **4.4.3. Western blot.**

La separación de las proteínas fue realizada utilizando el kit Miniprotean Tetrasystem (Biorad) por transferencia electroforética, método basado en la movilidad de las proteínas en función de su carga eléctrica y su peso molecular. En la transferencia, el gel de poliacrilamida que contiene las proteínas, se pone en contacto con la membrana de polivinilideno fluoruro (PVDF Transfer Membrana Westran, Schleicher & Schuell) entre dos electrodos sumergidos en una solución conductora. Cuando se aplica un campo eléctrico, las proteínas migran fuera del gel de poliacrilamida hacia la superficie de la membrana donde quedan fuertemente adheridas generando una copia exacta del patrón de proteínas que se tenía en el gel. Las electroforesis se realizaron en la solución conductora llamada tampón de electroforesis, preparada el mismo día a un pH de 8,3, compuesto por Tris base 25 mM, Glicina 0,19 M, SDS 0,1% y agua ultrapura, a un voltaje constante de 100 mV. Cantidades iguales de proteína, en un rango de 50-100 µg, fueron separadas mediante un gel de electroforesis al 10% de SDS-poliacrilamida preparado previamente y, posteriormente, las proteínas fueron transferidas a una hoja de PVDF. Como marcador de peso molecular se utilizó el MagicMark™ (Thermo Fisher Scientific).

El marcador preteñido fue transferido a la membrana conjuntamente con las proteínas de la muestra para estimar el peso molecular de las bandas de las proteínas.

Para la transferencia de las proteínas se usó un tampón de transferencia, compuesto por Tris base 25 mM, Glicina 0,19 mM, agua ultrapura y 20% de Metanol. La transferencia se realizó a 400 mA – 100 V (Voltaje constante) durante 2 horas. Transcurrido el tiempo de transferencia y para reducir las uniones inespecíficas de las proteínas durante los siguientes pasos, se procedió al bloqueo de la membrana mediante la incubación durante 1 hora con una solución compuesta por TBS con un 3% BSA, 0,02% azida sódica y 0,1% de Tween-20. Antes y después de cada incubación con el anticuerpo se realizaron lavados por triplicado de 10 min con tampón Tris salino y Tween-20 al 0,05% (T-TBS). A continuación, se incubó con el anticuerpo primario durante 18 horas a 4°C, y después de varios lavados, la detección inmunológica se realizó con anticuerpos secundarios marcados con enzimas.

La inmunodetección se realizó utilizando un anticuerpo específico anti-ACE1 (ab11734; Abcam) y anti-ACE2 (sc-20998; Santa Cruz Biotechnology) a diluciones 1:200. Como anticuerpo secundario se utilizó goat anti-rabbit conjugado con peroxidasa de rábano, HRP (sc-2004; Santa Cruz Biotechnology) a dilución 1:10000. Tras realizar otros 3 lavados, las membranas se incubaron con un sustrato

quimioluminiscente *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific) y se captó la señal mediante el sistema ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina (UCIM).

La cantidad de señal se analizó con el programa ImageJ (NIH Image, NIH). Se realizaron medidas por duplicado de cada muestra restando en cada una de ellas el ruido de fondo correspondiente a cada carrera. Para que la expresión de los resultados representara las diferencias existentes en cada muestra y no a variaciones en la carga de proteína, se utilizó  $\beta$ -actina (Sigma-Aldrich) como control de carga a dilución 1:5000.

## **4.5. Medida de la actividad enzimática de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC.**

### **4.5.1. Extracción de proteínas.**

Las células de pases entre 3 y 5 fueron sembradas en placas de 6 pocillos. Una vez que los cultivos celulares alcanzaron una confluencia del 80%, las células fueron expuestas a los tratamientos deseados en medio libre de factores de acción estrogénica durante 24 horas.

Tras la exposición a los tratamientos, las células se recogieron y se resuspendieron en los tampones de extracción proteica para la ECA-1 ( $K_2PO_4$  0,1 M) y ECA-2 (NaCl 1 M,  $ZnCl_2$  0,5 mM, TrisHCl 75 mM, Tritón X-100 0,5%). Tras esto se centrifugaron durante 5 minutos a 16.000 x g y los sobrenadantes se congelaron a  $-80^{\circ}C$  hasta su ensayo. Para determinar la concentración de proteínas de cada una de las muestras se utilizó la determinación con BCA, como se ha explicado anteriormente.

### **4.5.2. Medida de la actividad ECA-1.**

La actividad ECA-1 se determinó mediante un ensayo espectrofluorimétrico en base a lo publicado por Schwager (Schwager, Carmona et al. 2006). La reacción está basada en la cuantificación fluorimétrica del aducto fluorescente formado como producto de la catalización del sustrato hipuril-L-histidil-

L-leucina por el enzima L-histidil-L-leucina y este ensayo es adaptado a placas de 96 pocillos que produjo datos con una mayor eficacia con respecto a tiempos y reactivos de ensayos anteriores de medidas de actividad ECA-1.

La medida de la fluorescencia se llevó a cabo en el espectrofluorímetro SpectraMax Gemini XPS (Molecular devices), con una longitud de onda excitación de 360 nm y una longitud de onda emisión de 485 nm, mediante el programa Softmax Pro 6.2.2. Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos con un volumen final de 250  $\mu$ L. A cada uno de los pocillos se añadió el sustrato, hippuril-L-histidil-L-leucina, HHL (Sigma) y muestra (8  $\mu$ g de proteína). Tras una incubación de 2 horas a 37°C, se paró la reacción utilizando NaOH 0,28 M. Posteriormente se añadió o-phthaldialdehido, que tras una incubación de 10 min. a temperatura ambiente forma un aducto con el producto catalizado por el enzima, L-histidil-L-leucina, el cual puede cuantificarse fluoriméricamente.

Para la cuantificación de la actividad ECA-1 de las muestras obtenidas se realizó una interpolación de absorbancia en la curva patrón. Se utilizó el estándar L-histidil-L-leucina (0,5 mM en  $K_2PO_4$ ), el cual, como se ha explicado anteriormente, puede ser cuantificado fluoriméricamente al formar un aducto con o-phthaldialdehido. Utilizando diferentes cantidades de L-histidil-L-leucina y  $K_2PO_4$  en diluciones seriadas y representándolas frente a la intensidad de fluorescencia se constituyó la curva

estándar (0-12 nmoles). Con la concentración de estándar asociada a esa intensidad de fluorescencia, se llevó a cabo el cálculo de la actividad de la enzima ECA-1 (nmoles/min x mg de muestra) (Gomez, Cirillo et al. 1987, Yayama, Kunimatsu et al. 2003).

#### **4.5.3. Medida de la actividad ECA-2.**

La determinación de la actividad ECA-2 se llevó a cabo utilizando un sustrato fluorogénico, Mca-APK(Dnp) (Enzo Life Science). Se trata de un sustrato para la ECA-2, con la siguiente secuencia: Mca-Ala-Pro-Lys(Dnp)-OH. Su fluorescencia está inactiva hasta que se produce la escisión del grupo Dnp (en Pro-Lys). Esta escisión da lugar a un producto fluorescente detectable mediante espectrofluorimetría con longitud de onda de excitación de 328 nm y 393 nm de emisión.

Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos. En cada pocillo se añadió tampón de reacción ECA-2 (NaCl 1 M, ZnCl<sub>2</sub> 0,5 mM, TrisHCl 75 mM, pH: 6,5), junto con 0,5% de Triton X-100. La suspensión se sonicó (amplitud = 20 kHz; durante 1+1sec) en hielo, se mantuvo durante 15 min en hielo y a continuación se centrifugó. La actividad ECA-2 fue medida en sobrenadante (Guy, Jackson et al. 2003).

La actividad específica de ECA-2 se calculó midiendo la actividad de esta enzima en muestras con 25 µg de proteína y el sustrato Mca-APK(Dnp) a 50 µM en presencia y en ausencia del

inhibidor específico de ECA-2, DX600 10  $\mu\text{M}$  (Phoenix Pharmaceuticals), (Huang, Sexton et al. 2003), o con agua ultrapura (Millipore). La medida de la actividad se fue registrando durante 4 horas a 37°C. Para la cuantificación de la actividad enzimática se utilizaron curvas estándar entre 0-50  $\mu\text{M}$  del control fluorogénico OmniMMP (Enzo Life Sciences), con la secuencia Mca-Pro-Leu-OH. Con la concentración de estándar asociada a esa intensidad de fluorescencia, se llevó a cabo el cálculo de la actividad de la enzima ECA-2 (nmoles/min. x mg de proteína).

#### **4.6. Medida de Ang II y Ang 1-7 por inmunofluorescencia.**

Después del correspondiente tratamiento de HUVEC durante 24 horas en placas de 24 pocillos, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se realizó el protocolo de detección de Ang 1-7, basado en un método de inmunofluorescencia. En este método se permeabilizaron las células para permitir la entrada de los anticuerpos primarios y secundarios de Ang II y Ang 1-7 con los que se incubaron las células.

La Ang II se detectó con su anticuerpo primario específico, anti-Angiotensina II para humanos (Bachem) y su secundario, desarrollado en cabra, conjugado con Texas Red. Los núcleos fueron marcados con DAPI 1  $\mu\text{g/ml}$  (BioLegend). El anticuerpo utilizado para Ang 1-7 es un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo, donado por la Dra. Mariela Gironacci de la Universidad de Buenos Aires. Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados y se incubó con el anticuerpo secundario durante 90 min a temperatura ambiente. Se incubó en paralelo una muestra sólo con anticuerpo secundario como control negativo. El anticuerpo secundario desarrollado en conejo, estaba marcado con fluoresceína (FITC); (Sigma Chemical).

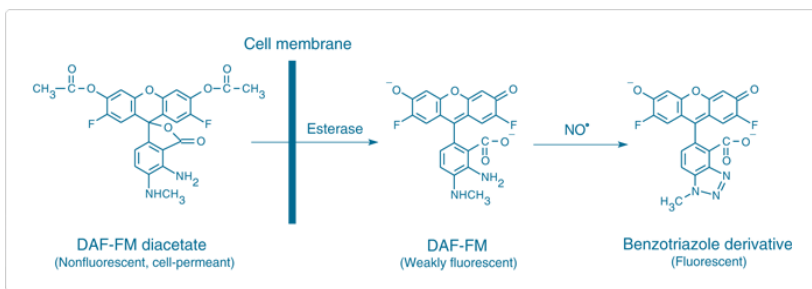


El análisis de la expresión de Ang II y Ang 1-7 se llevó a cabo en el Servicio de Microscopía Confocal de la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina (UCIM) con un microscopio confocal espectral Leica TCS SP2. Las células fueron incubadas anteriormente con DAPI, con el que se marcan los núcleos celulares en azul y tiene un rango de excitación a una longitud de onda de 351- 364 nm y una longitud de onda de emisión de 380 a 485 nm, el anticuerpo para la Ang 1-7 conjugado con FITC, que tiene una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de emisión de 506 a 564 nm, y el anticuerpo para la Ang II conjugado con Texas red, que tiene una longitud de onda de excitación de 543 nm y una longitud de onda de emisión de 557 a 654 nm. El objetivo utilizado fue de 40X/1,25 oil (magnificación total 100X) y el proceso de captación de las imágenes se llevó a cabo realizando un barrido en Z y captando el plano de mayor intensidad.

La cuantificación de la señal emitida se realizó con el programa Image J (NIH Image, NIH), y seleccionando áreas aleatorias dentro de cada imagen se obtuvieron las intensidades medias de fluorescencia. Los resultados se expresaron con intensidad de medida de fluorescencia por campo.

#### 4.7. Medida de óxido nítrico en HUVEC por fluorescencia.

La detección de NO por fluorescencia se realizó mediante la sonda fluorescente 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM diacetato) (Thermo Scientific). Este compuesto no se hace fluorescente hasta que reacciona con el NO y forma un benzotriazol fluorescente (Fig. 12). El grupo diacetato de la molécula DAF-FM le confiere permeabilidad a las membranas celulares que atraviesa por difusión pasiva. Una vez dentro de las células, se desacetila por esterasas intracelulares para convertirse en DAF-FM, con máximos de excitación / emisión de 495/515 nm. Cuando la sonda interacciona con el NO producido en el interior celular emite una fluorescencia en la región verde del espectro visible.



**Figura 12.** El esquema de reacción para la detección de óxido nítrico (NO) por DAF-FM y diacetato de DAF-FM (tomado de Thermo Fisher Scientific).

Para ello, tras exponer las células a los tratamientos explicados con anterioridad durante 24 horas se procedió a retirar el medio y se sustituyó por Medio 199 libre de rojo fenol (Gibco, Life Technologies) suplementado con SingleQuots® (Lonza) + SBF libre de hormonas al 2% (Gibco) y piruvato. Se añadió DAF-FM a una concentración de tratamiento de 2,5  $\mu\text{M}$  y se incubó con este durante 40 min. Transcurrido este tiempo se lavó con Medio 199 libre de rojo fenol durante 10 min.

La producción de NO se determinó midiendo la fluorescencia emitida por las células en las imágenes captadas con la cámara digital Nikon Ds-QiMic en cinco campos aleatorios con el microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse Ti con el objetivo 10X (magnificación total 100X). Los resultados se analizaron con el programa Image Pro-Plus V.6 y se expresaron como intensidad media de fluorescencia por campo.

#### **4.8. Análisis estadístico.**

El análisis estadístico de los resultados se realizó utilizando el software Prism versión 6 (GraphPad Software Inc.). Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  EEM (error estándar de la media). Para comparaciones múltiples se aplicó el test ANOVA de uno o dos vías y luego el post-test de Bonferroni. Los valores con una  $p < 0,05$  fueron considerados significativos.



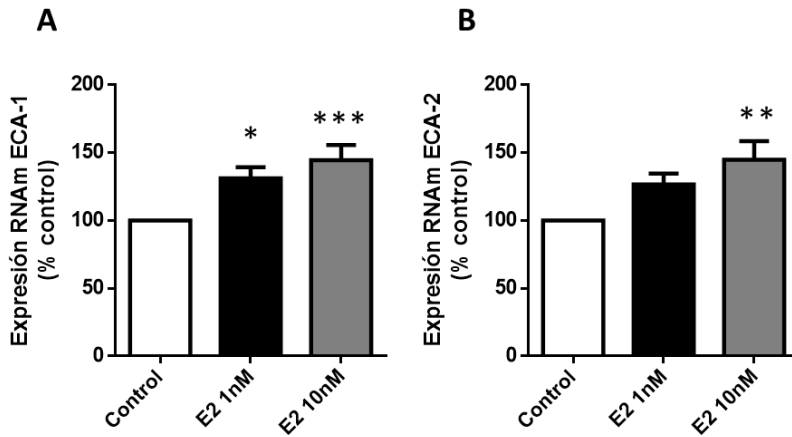
## **5. RESULTADOS**



### **5.1. El E2 aumenta la expresión génica de ECA-1 y ECA-2 a través del RE $\alpha$ en HUVEC.**

El primer objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del E2 sobre la expresión génica de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC. Para ello, las células fueron expuestas a diferentes concentraciones, fisiológicas y supra fisiológicas de E2 (1 y 10 nM respectivamente) durante 24 horas y se midió el RNAm por RT-PCR. Los resultados muestran un aumento de RNAm de ECA-1 en las células tratadas con 1 nM y 10 nM de E2 (Fig. 13A) con respecto al control. Asimismo, se observó una fuerte tendencia a aumentar la expresión de RNAm en ECA-2 a 1 nM de E2, que se hacía significativa a 10 nM (Fig. 13B). Por estos resultados y en concordancia con los publicados por nuestro grupo con anterioridad (Sobrino, Mata et al. 2009, Oviedo, Sobrino et al. 2011) los siguientes experimentos se realizaron fijando 10 nM como concentración de tratamiento de E2.



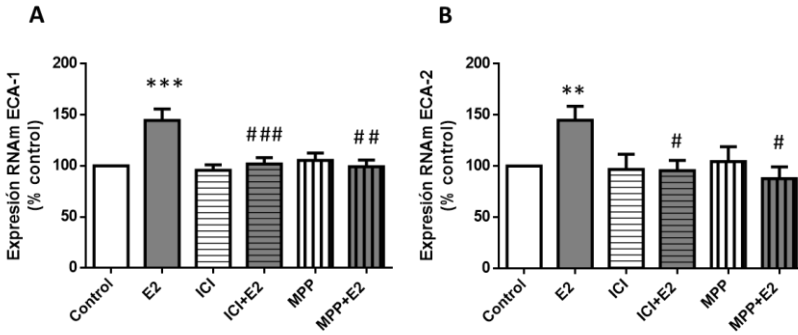


**Figura 13. El E2 incrementa la expresión de RNAm de ECA-1 y ECA-2.** Las HUVEC fueron tratadas con concentraciones de E2 de 1 y 10 nM durante 24 horas. Los niveles de RNAm de ECA-1 (A) y ECA-2 (B) se determinaron mediante RT-PCR. Los datos son expresados como % del valor del control y presentados como media  $\pm$  EEM de 6-8 valores (entre 3 - 4 experimentos distintos). \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  ó \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Control.

Después de comprobar que hay un aumento significativo de la expresión génica de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC expuestas a E2 (10 nM), se estudió la participación de los RE en esta respuesta, por lo que las HUVEC se trataron con una concentración del antagonista inespecífico de los RE, ICI182780 (1  $\mu$ M) y con el antagonista específico de RE $\alpha$ , MPP (1 $\mu$ M) 30 min antes de iniciar el tratamiento con E2. El bloqueo de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  con ICI182780 revirtió completamente el incremento en la expresión de RNAm de ECA-1 (Fig. 14A) y ECA-2 (Fig. 14B), lo que demostraba una participación inespecífica de los RE. El efecto del antagonista del RE $\alpha$ , MPP

fue el mismo que el observado con ICI182780, e inhibió completamente el aumento en la expresión de RNAm de ECA-1 y ECA-2 inducido por E2, sugiriendo que el RE $\alpha$  media esta respuesta a E2 en la expresión génica de estas enzimas endoteliales en HUVEC.

Paralelamente se realizó un tratamiento de las células sólo con los antagonistas sin observarse ningún cambio con respecto a la respuesta control (Fig. 14A y 14B), por lo que se descartó un posible efecto inespecífico de los antagonistas en ausencia de E2.



**Figura 14. El E2 incrementa la expresión de RNAm de ECA-1 y ECA-2 a través del RE $\alpha$ .** Las HUVEC fueron tratadas con E2 10 nM en presencia y ausencia del antagonista inespecífico de RE, ICI182780 1  $\mu$ M, y antagonista específico de RE $\alpha$ , MPP 1  $\mu$ M durante 24 horas. Los niveles de RNAm de ECA-1 (A) y ECA-2 (B) se determinaron mediante RT-PCR. Los datos son expresados como % del valor del control y presentados como media  $\pm$  EEM con n = 6-8 valores (entre 3 - 4 experimentos distintos). \*\* p < 0,01 ó \*\*\* p < 0,001 vs. control; #p < 0,05, ##p < 0,01 y ###p < 0,001 vs. E2 10 nM.

## **5.2. E2 aumenta la expresión proteica de ECA-1 a través de RE $\alpha$ .**

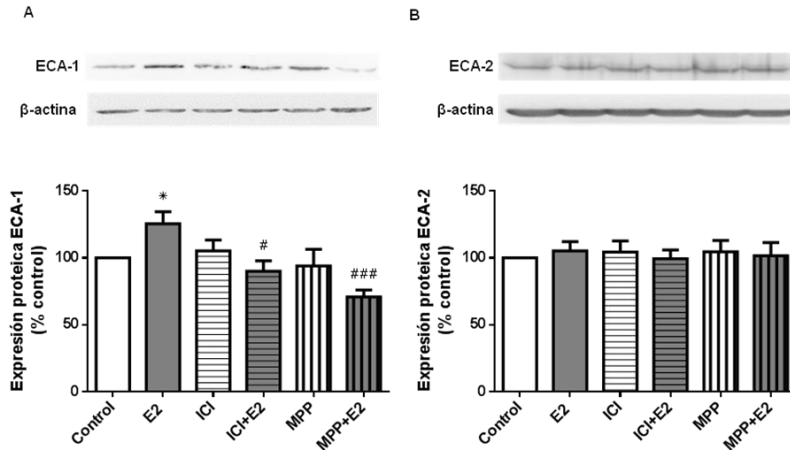
Tras observar que el E2 aumentaba la expresión génica de ECA-1 y ECA-2 se quiso comprobar si este aumento del RNAm se veía reflejado en un aumento en la cantidad de proteína de las mismas.

En primer lugar, el análisis con Western Blot demuestra que las HUVEC expresan ambas proteínas, ECA-1 y ECA-2 (Fig. 15), confirmando la existencia de un SRA intracelular en este modelo de célula endotelial.

La exposición de las HUVEC a 10 nM de E2 resultó en un aumento en la expresión de ECA-1 de un 25% sobre los valores control ( $p < 0,05$ ; Fig. 15A), mientras que la expresión de ECA-2 se mantuvo inalterada tras la exposición a E2 (Fig. 15B). Con el fin de analizar si estos efectos estaban mediados por los RE, las células se expusieron a los antagonistas ICI182780 (1  $\mu$ M) y MPP (1  $\mu$ M). Ambos tratamientos revirtieron por completo el efecto de E2 (Fig. 15A) sobre la expresión de ECA-1, sin que se observara ningún efecto sobre la expresión de ECA-2 (Fig. 15B).

Por lo tanto, nuestros resultados indican que el tratamiento de HUVEC con E2, incrementa la expresión proteica selectiva de

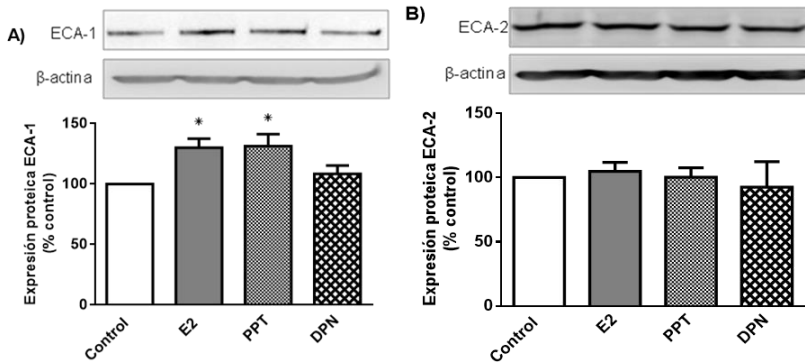
ECA-1 a través de RE $\alpha$ , sin que tenga efecto sobre la cantidad de proteína de ECA-2.



**Figura 15. Expresión proteica de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC.** Las células fueron tratadas con 10 nM de E2, en presencia y ausencia del antagonista inespecífico de RE ICI182780 1  $\mu$ M y el antagonista específico de RE $\alpha$  MPP 1  $\mu$ M durante 24 horas. La producción proteica de ECA-1 (A) y ECA-2 (B), fueron medidas por Western blot según se describe en Material y Métodos. Los niveles relativos fueron determinados por densitometría de las bandas que correspondían a un Pm de 160kDa para ECA-1 o 90 KDa para ECA-2. Los datos son expresados como % del valor del control y presentados como media  $\pm$  EEM con n = 6-8. \* p < 0,05 vs. control; #p < 0,05 y ###p < 0,001 vs. E2 (10 nM).

Para corroborar que los efectos inducidos por E2 estaban mediados exclusivamente por el RE $\alpha$ , se realizaron una serie de experimentos exponiendo las células al agonista selectivo de RE $\alpha$ , PPT, y al agonista selectivo de RE $\beta$ , DPN, a la misma concentración que el E2. La exposición de las HUVEC a PPT

(10 nM) provocó un aumento de la expresión proteica de ECA-1 en la misma medida que E2, sin que el DPN (10 nM) ejerciera ningún efecto (Fig. 16A). La expresión de proteína ECA-2 no varió ni con E2, ni con ningún agonista utilizado, (Fig. 16B).



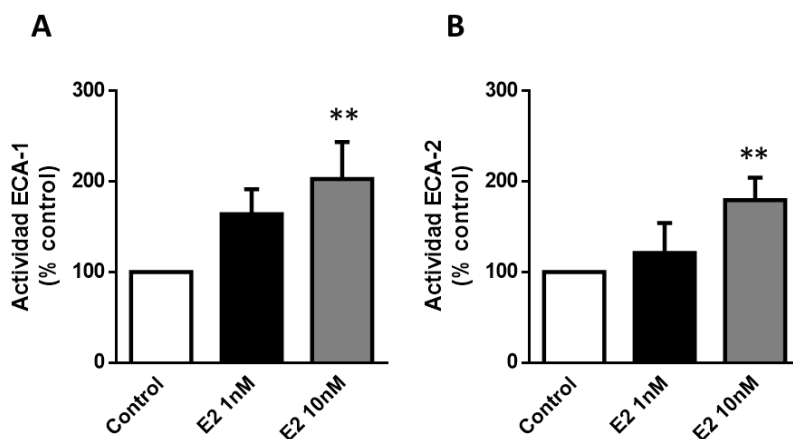
**Figura 16. El efecto de los agonistas de RE $\alpha$  y RE $\beta$  en la expresión proteica de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC.**

Las células fueron tratadas con E2 (10 nM), el agonista de RE $\alpha$ , PPT (10 nM) y el agonista de RE $\beta$ , DPN (10 nM) durante 24 horas. Las expresiones proteicas de ECA-1 (A) y ECA-2 (B), fueron medidas por western blot según se describe en Material y Métodos. Los niveles relativos fueron determinados por densitometría de las bandas que correspondían a un Pm de 160kDa para ECA-1 o 90 KDa para ECA-2. Los datos son expresados como % del valor del control y presentados como media  $\pm$  EEM con n = 3-6. \* p < 0,05 vs. control.

### **5.3. E2 aumenta la actividad enzimática de ECA-1 y ECA-2 a través del RE $\alpha$ en HUVEC.**

Una vez demostrado que las HUVEC tratadas con E2 presentaban un aumento de la expresión génica de ECA-1 y ECA-2 y un aumento de la expresión proteica de ECA-1 a través del RE $\alpha$ , el siguiente paso fue ver si la actividad de estas enzimas del SRA también se veía modificada.

Antes de medir la actividad en las HUVEC expuestas a los tratamientos pertinentes, obtuvimos los valores control de la actividad enzimática de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC, las cuales eran de  $0,660 \pm 0,150$  y  $0,014 \pm 0,002$  nmol/min  $\times$  mg de proteína, respectivamente. El tratamiento con E2 (1 nM) durante 24 horas, resultó en una fuerte tendencia a aumentar la actividad enzimática de ECA-1 sin afectar a la de ECA-2. A 10 nM el E2 aumentó la actividad enzimática de ECA-1 y ECA-2 y alcanzó valores de  $203 \pm 26$  y  $180 \pm 19\%$  del control, respectivamente. ( $p < 0,01$  vs. control; Fig. 17).



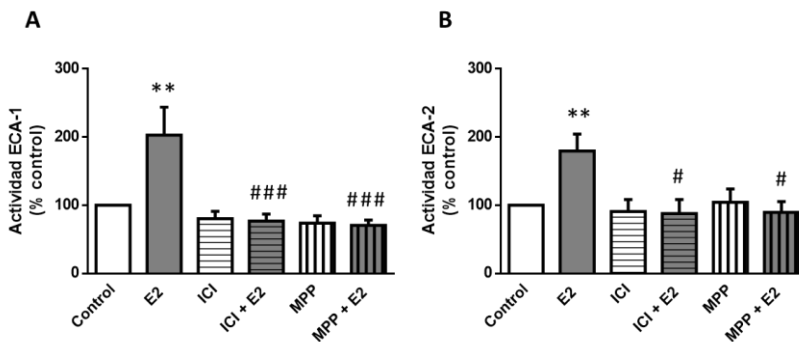
**Figura 17. Efecto del E2 en la actividad enzimática de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC.** Las células fueron tratadas con 1-10 nmol/l de E2 durante 24 horas. La actividad enzimática de ECA-1 (A) y ECA-2 (B), fue medida según se describe en Material y Métodos. Los datos son expresados como % del valor del control y presentados como media  $\pm$  EEM con  $n = 6-9$ , (3 - 4 experimentos distintos). \*\*  $p < 0,01$  vs. control.

Después de comprobar que se produce un aumento significativo de la actividad enzimática de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC expuestas a E2 (10 nM) durante 24 horas, se quiso estudiar la participación de los RE en esta respuesta, por lo que se trataron las HUVEC con los antagonistas ICI182780 y MPP. El antagonista inespecífico de RE, ICI182780 (1  $\mu$ M), bloqueó completamente el incremento de la actividad tanto de ECA-1 (Fig. 18A) como de ECA-2 (Fig. 18B) que inducía el tratamiento con E2. De manera similar, el antagonista del RE $\alpha$ , MPP (1  $\mu$ M), bloqueó completamente el efecto del E2 sobre la actividad de ECA-1 y ECA-2 (Fig. 18A y 18B), demostrando



que los cambios en la actividad enzimática en HUVEC están mediados por el RE $\alpha$ .

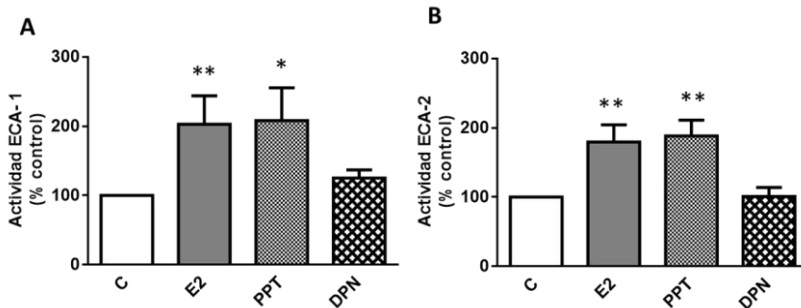
Como en experimentos anteriores, paralelamente se realizó un tratamiento de las células sólo con los antagonistas y no se observó ningún cambio con respecto a la respuesta control (Fig. 18A y 18B) por lo que se descartó un posible efecto inespecífico de los antagonistas en ausencia de E2.



**Figura 18. Participación de los RE en la actividad enzimática de ECA-1 y ECA-2 en respuesta al E2 en HUVEC.** Las HUVEC fueron tratadas con 10 nM de E2 en presencia y en ausencia del antagonista inespecífico de RE, ICI182780 1  $\mu$ M y del antagonista de RE $\alpha$ , MPP 1  $\mu$ M durante 24 horas. La actividad enzimática de ECA-1 (A) y ECA-2 (B), fue medida según se describe en Material y Métodos. Los datos son expresados como % del valor del control y presentados como media  $\pm$  EEM con n = 6-9, (3 - 4 experimentos distintos). \*\* p < 0,01 vs. control; #p < 0,05 y ###p < 0,001 vs. E2 10 nM.

Para verificar la implicación del RE $\alpha$  y descartar la de RE $\beta$ , se utilizaron además los agonistas específicos PPT y DPN, respectivamente. El PPT (10 nM) ejerció el mismo efecto que el

E2, aumentando tanto la actividad ECA-1 (Fig. 19A) como la actividad ECA-2 y alcanzando los mismos valores (Fig. 19B), mientras que el DPN (10 mM) no modificó ninguna de estas actividades.



**Figura 19. Efecto de los agonistas de RE $\alpha$  y RE $\beta$  en la actividad enzimática de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC.** Las células fueron tratadas con E2 (10 nM), el agonista de RE $\alpha$ , PPT (10 nM) y el agonista de RE $\beta$ , DPN (10 nM) durante 24 horas. La actividad enzimática de ECA-1 (A) y ECA-2 (B), fue medida por espectrofluorimetría según se describe en Material y Métodos. Los datos son expresados como % del valor del control y presentados como media  $\pm$  EEM con  $n = 3-6$ . \*  $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs. control.

Estos resultados refuerzan los datos obtenidos anteriormente con el antagonista selectivo de RE $\alpha$ , el MPP, e indican que el aumento de las actividades enzimáticas de ECA-1 y ECA-2 inducido por E2 está mediado por RE $\alpha$ .

#### **5.4. E2 aumenta la producción de Ang 1-7 a través de RE $\alpha$ en HUVEC.**

Tal y como queda reflejado en la introducción, la reciente visión del SRA establece un nuevo eje ECA-2/Ang 1-7/Receptor Mas. Nos propusimos, por tanto, determinar si los resultados intracelulares obtenidos, que describen el efecto del E2 sobre la expresión y la actividad de ECA-1 y ECA-2, estaban relacionados con un posible aumento en la producción del octapéptido vasoconstrictor, Ang II y el heptapéptido vasodilatador, Ang 1-7.

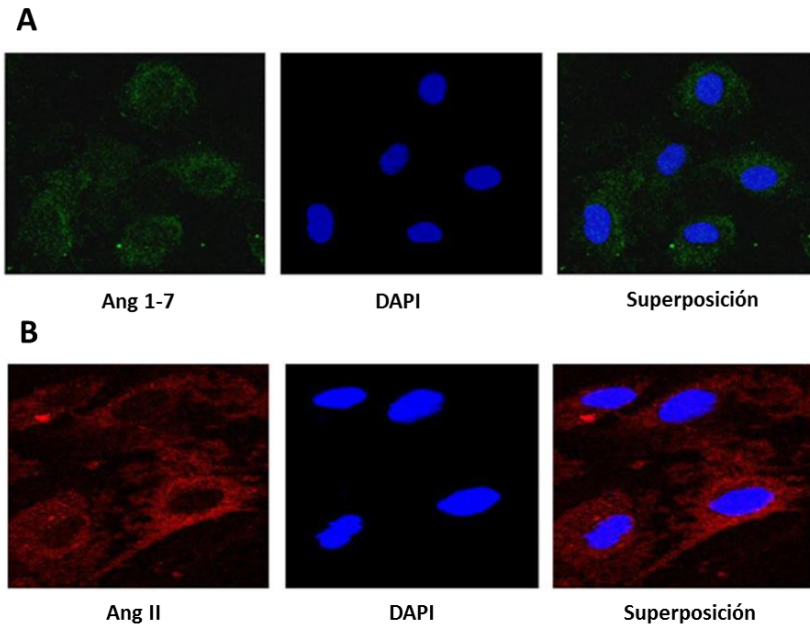
Para ello, se puso a punto un sistema de detección y cuantificación de Ang 1-7 en HUVEC detallado en la sección Material y métodos. Dada la baja producción de Ang 1-7 en células endoteliales, la utilización de la técnica de Western Blot quedó descartada por su baja sensibilidad. Por ello, decidimos utilizar la técnica de inmunofluorescencia, basándonos en un protocolo anterior utilizado en neuronas (Block, Santos et al. 1988).

Dado que no existía un método ni un anticuerpo comercial, nos pusimos en contacto con la Dra. Mariela Gironacci de la Universidad de Buenos Aires, quien donó a nuestro laboratorio el anticuerpo policlonal para Ang 1-7 desarrollado en conejo, que ya había sido utilizado y caracterizado satisfactoriamente

(Lopez Verrilli, Pirola et al. 2009). La detección de Ang 1-7 en HUVEC se llevó a cabo por la técnica de inmunofluorescencia confocal.

#### **5.4.1. Producción basal de Ang 1-7 y Ang II en HUVEC.**

En las imágenes de la figura 20A se observa la distribución de Ang 1-7 en células endoteliales en condiciones basales, en las que la Ang 1-7 se encuentra localizada de forma difusa en el citoplasma, con escasa presencia en el núcleo celular. También se puede observar su especial localización en las membranas. Su detección en condiciones control nos muestra la existencia de una expresión basal de Ang 1-7 en las HUVEC. Con respecto a la Ang II (Fig. 20B) también se encuentra localizada en el citoplasma y membranas celulares, lo cual es razonable, ya que los dos péptidos comparten la misma vía de síntesis y la Ang II es el precursor de la Ang 1-7.



**Figura 20. Producción basal de Ang 1-7 y Ang II detectada por inmunofluorescencia.** A) Imagen representativa de la producción basal de Ang 1-7 en HUVEC. B) Imagen representativa de la producción basal de Ang II en HUVEC. En verde, Ang 1-7, cuyo anticuerpo secundario para está marcado con FITC; en rojo, Ang II, cuyo anticuerpo secundario está marcado con Texas red; en azul, los núcleos celulares marcados con DAPI, y la superposición de las imágenes, todas ellas obtenidas por microscopía confocal.

#### 5.4.2. Efecto del E2 en la producción de Ang 1-7 y Ang II.

El tratamiento de las HUVEC con E2 10 nM provocó un aumento significativo en la producción de Ang 1-7 (Fig. 21A y B) alcanzando niveles por encima del control de un  $67,31 \pm 19,92$  %. Este heptapéptido aumentado seguía el mismo patrón

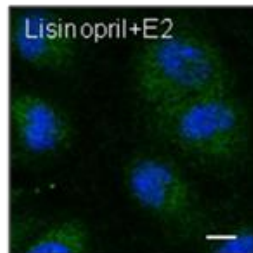
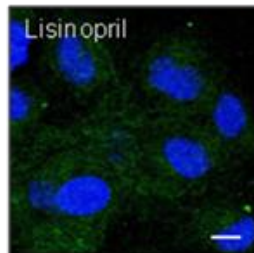
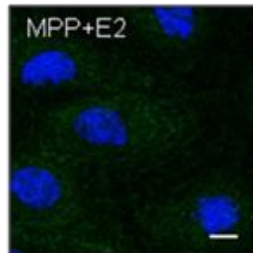
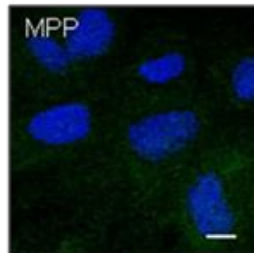
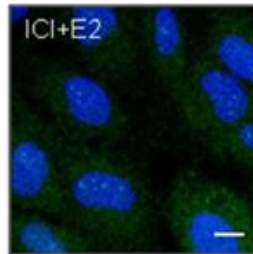
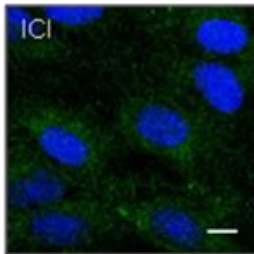
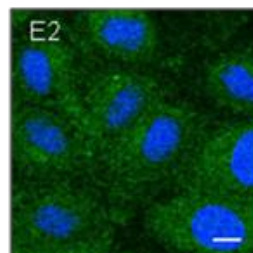
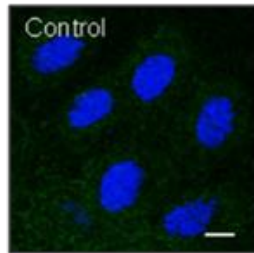
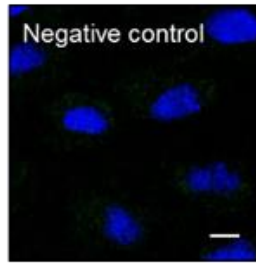
de localización que en HUVEC en condiciones basales (Fig. 20A), es decir, en citoplasma y membrana celular.

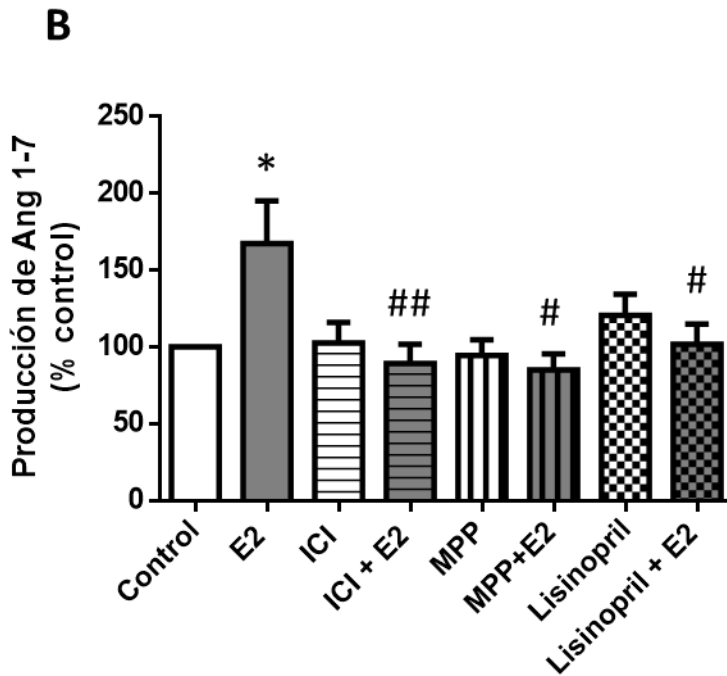
Para comprobar si este efecto estaba mediado por RE, se midieron los niveles de Ang 1-7 tras el tratamiento de las HUVEC con el antagonista inespecífico de RE, ICI182780 (1  $\mu\text{M}$ ) y con el antagonista específico de RE $\alpha$ , MPP (1  $\mu\text{M}$ ), observando que ambos revertían completamente el efecto del E2, e indicando por tanto que el E2 aumenta la producción de Ang 1-7 a través del RE $\alpha$ .

Dentro de esta serie de experimentos, y para medir la participación de los ECA en la producción de Ang 1-7 inducida por E2, se trataron las células con un inhibidor de la ECA-1, lisinopril. El lisinopril (1  $\mu\text{M}$ ) prevenía por completo el aumento en la producción de Ang 1-7 inducido por el tratamiento con E2 (Fig. 21), lo que corrobora la relación del E2 con las ECA en HUVEC. Nuestros resultados indican por tanto que el E2 estimula la producción de Ang 1-7 participando en el aumento de los enzimas del SRA.

Por otro lado, la exposición a E2 (10 nM) no afectó a la producción de Ang II (Fig. 22), así como tampoco lo hizo en presencia y en ausencia de los antagonistas ICI182780 y MPP.

**A**

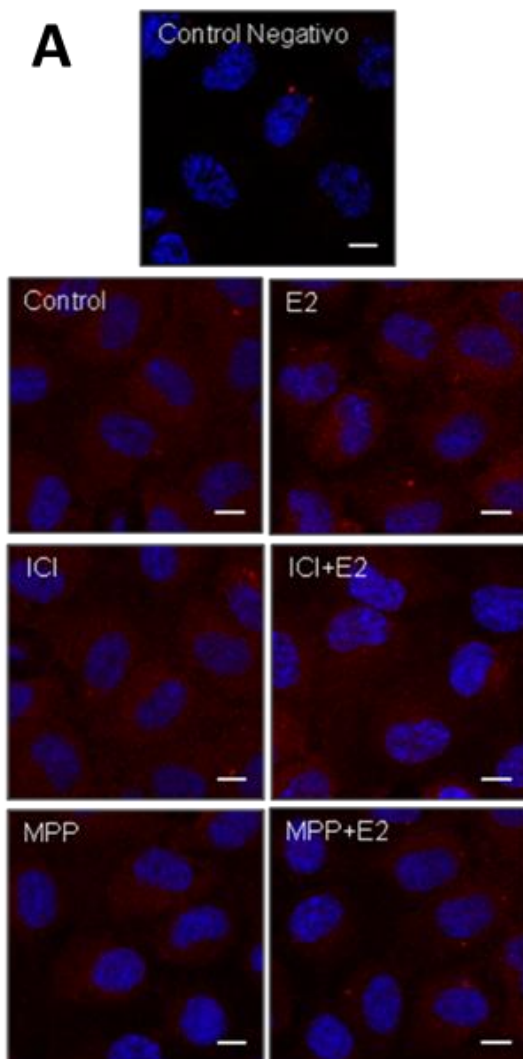


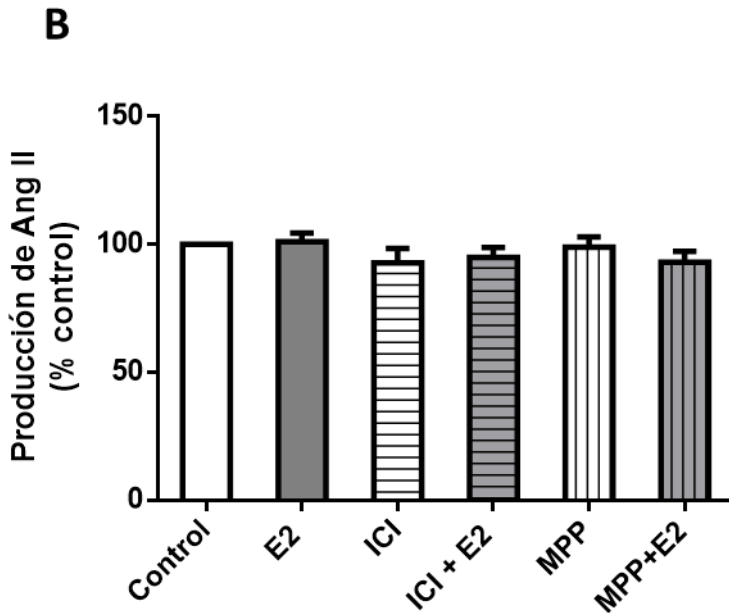


**Figura 21. Niveles de Ang 1-7 en HUVEC.** (A) Imágenes de microscopía confocal representativas de la producción de Ang 1-7 en HUVEC. Las células fueron tratadas con 10 nM de E2 en ausencia y en presencia del antagonista inespecífico de RE ICI182780 (1  $\mu$ M) y antagonista específico de RE $\alpha$  MPP (1  $\mu$ M) y del inhibidor de ECA-1, Lisinopril (1 $\mu$ M) durante 24 horas. En azul, el núcleo teñido específicamente con DAPI. En verde, Ang 1-7 (FITC). Como control negativo, las células se expusieron únicamente al anticuerpo secundario para detectar posibles reacciones inespecíficas (B) Cuantificación de las imágenes de confocal de Ang 1-7 en HUVEC. Los datos son expresados como % del valor del control y presentados como media  $\pm$  EEM con n = 6 experimentos duplicados. \* p < 0,05 vs. control; #p < 0,05 y ##p < 0,01 vs. E2 10 nM. La escala representa 10  $\mu$ m (Magnificación total 400 $\times$ ).



**A**



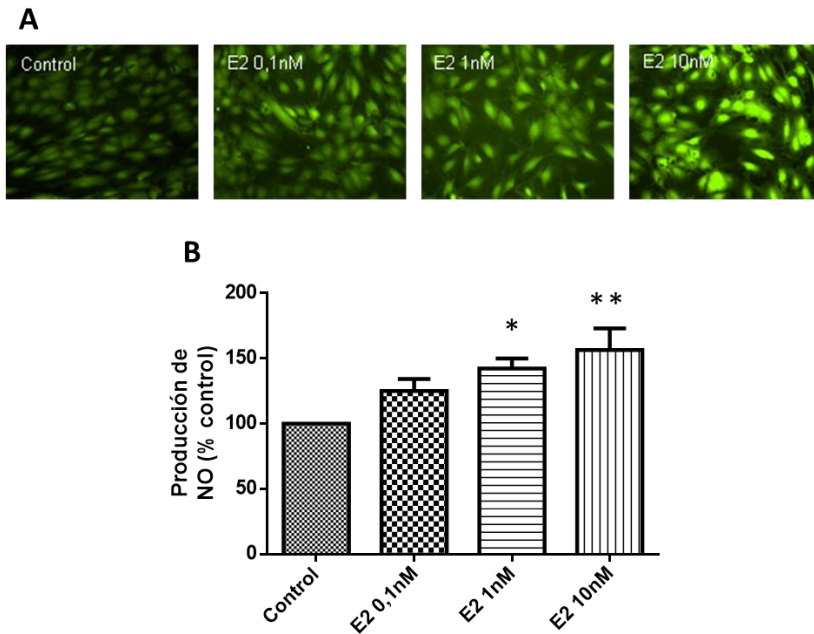


**Figura 22. Niveles de Ang II en HUVEC.** (A) Imágenes de microscopía confocal representativas de la producción de Ang II en HUVEC. Las células fueron tratadas con 10 nM de E2 en ausencia y en presencia del antagonista inespecífico de RE ICI182780 (1  $\mu$ M) y antagonista específico de RE $\alpha$  MPP (1  $\mu$ M) durante 24 horas. En azul, el núcleo teñido específicamente con DAPI. En rojo, Ang II (Texas Red). Como control negativo, las células se expusieron únicamente al anticuerpo secundario para detectar posibles reacciones inespecíficas. (B) Cuantificación de las imágenes de microscopía confocal de Ang II en HUVEC. Los datos son expresados como % del valor del control y presentados como media  $\pm$  EEM con n = 4-6 experimentos duplicados. La escala representa 10  $\mu$ m (magnificación total 400X).

### **5.5. Determinación de la producción dosis-respuesta de NO por E2 en HUVEC por fluorescencia.**

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar las consecuencias del aumento de la producción de Ang 1-7 sobre la función endotelial. Para ello, nos centramos en la producción de NO.

En estos experimentos iniciales, las HUVEC se trataron con diferentes concentraciones de E2 (0,1 nM, 1 nM y 10 nM) y se cuantificó la producción de NO por fluorescencia con la sonda DAF-FM (Fig. 23). Se observó un aumento de NO dependiente de la dosis, con una fuerte tendencia con E2 a 0,1 nM, que era significativa a 1 y 10 nM. Por ello y en concordancia con el resto de los resultados presentados en esta tesis, se determinó que la concentración de tratamiento de E2 para los siguientes experimentos sería 10 nM (Fig. 23).



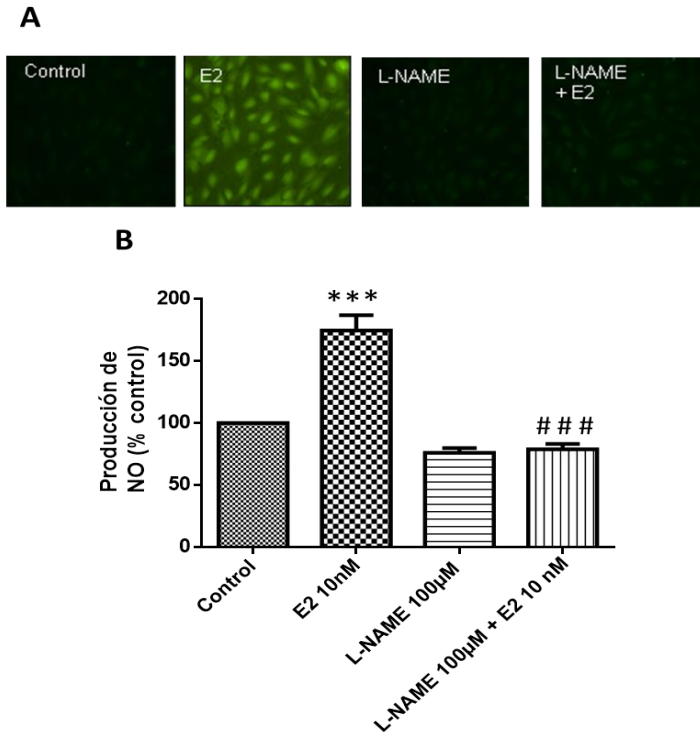
**Figura 23. Cuantificación de producción de NO en HUVEC a diferentes concentraciones de E2.** Las células fueron expuestas a

diferentes concentraciones de E2 (0,1 nM, 1 nM y 10 nM) durante 24 horas, y la producción de NO se midió por fluorescencia con DAF-FM como está descrito en Material y métodos. A) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media de las imágenes obtenidas. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM con  $n = 7-12$  (4 experimentos diferentes).

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. Control.

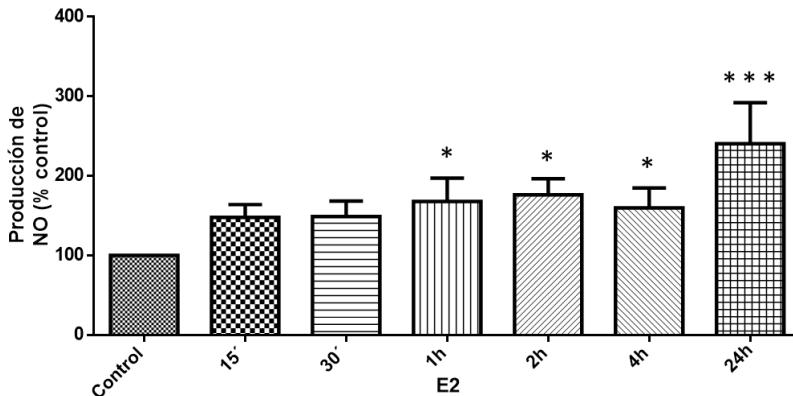
Sabiendo que el NO se libera como resultado de la actividad de la enzima NO sintasa endotelial (eNOS), se expusieron las HUVEC a E2 10 nM en presencia y ausencia del inhibidor de la NOS, L-NAME (100  $\mu$ M). El efecto del E2 en la producción de

NO era bloqueado totalmente por L-NAME, sugiriendo la participación específica del enzima eNOS (Fig. 24).



**Figura 24. Participación de la eNOS en la producción de NO en HUVEC.** Las células fueron expuestas a concentraciones de E2 (10 nM) en ausencia y en presencia del antagonista de la óxido nítrico sintasa, L-NAME (100 µM), durante 24 horas, y la producción de NO se midió por fluorescencia con DAF-FM como está descrito en material y métodos. A) Imágenes representativas de microscopio de fluorescencia invertido. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media de las imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM con  $n = 21$ . En 4 experimentos diferentes. \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Control ###  $p < 0.001$  vs. E2.

Para determinar el tiempo de tratamiento adecuado al que se producía la máxima producción de NO, se expusieron a continuación las HUVEC a E2 (10 nM) a diferentes tiempos de incubación (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h y 24 h). En la figura 25 se observa una tendencia al aumento en la producción de NO en HUVEC tratadas con E2 a tiempos cortos y que este aumento se hacía significativo tras incubar las células con E2 (10 nM) durante 24 h.



**Figura 25. Cuantificación de producción de NO en HUVEC a diferentes tiempos de incubación con E2.** Las células fueron expuestas a E2 10 nM, a diferentes tiempos (de 15 min a 24 h), y la producción de NO se midió por fluorescencia con DAF-FM como está descrito en Material y métodos. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM con  $n = 7-18$  (en 4 experimentos diferentes). \*  $p < 0.05$  vs Control.

\*\*\*  $p < 0.001$  vs. Control.

Por lo tanto, tras estos experimentos determinamos que una concentración de tratamiento de E2 a (10 nM) y un periodo de

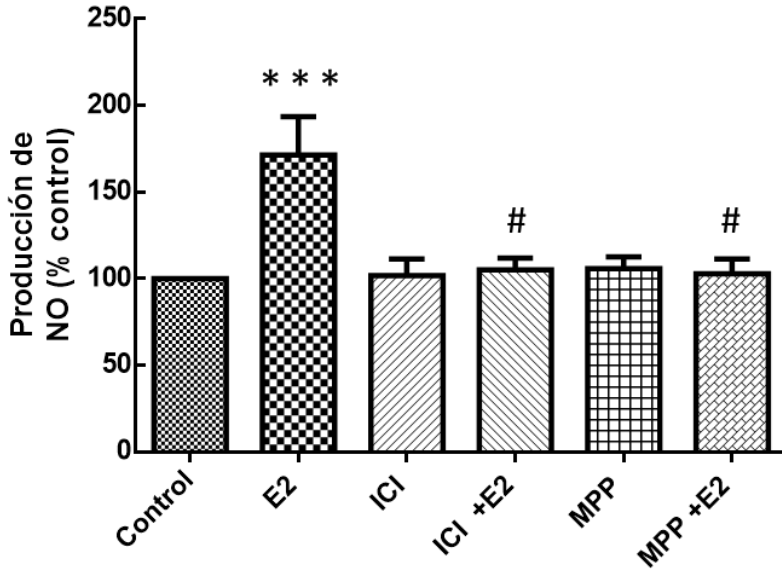
incubación de 24 h son las condiciones óptimas para el estudio de la producción de NO en HUVEC por fluorescencia. Estos resultados coinciden además con la concentración de E2 y el tiempo de tratamiento utilizados por nuestro grupo con anterioridad para el estudio de producción de NO (Hermenegildo, Garcia-Martinez et al. 2002, Sobrino, Mata et al. 2009).

### **5.6. El aumento en la producción de NO por E2 está mediado por RE $\alpha$ .**

Para estudiar la participación de los RE implicados en el aumento de la producción de NO observado en HUVEC, las células se expusieron a E2 (10 nM) en presencia y en ausencia del antagonista inespecífico de RE, ICI182780 (1  $\mu$ M) y del antagonista selectivo del RE $\alpha$ , MPP (1  $\mu$ M) durante 24 horas. Los resultados indicaron que la producción de NO estimulada por E2 se bloqueó completamente en presencia de ambos antagonistas, sugiriendo de nuevo la implicación del RE $\alpha$  en esta respuesta (Fig. 26).

Paralelamente se realizó un tratamiento de las células sólo con los antagonistas y no se observó ningún cambio con respecto a la respuesta control (Fig. 26) por lo que se descartó un posible efecto inespecífico de los antagonistas en ausencia de E2.

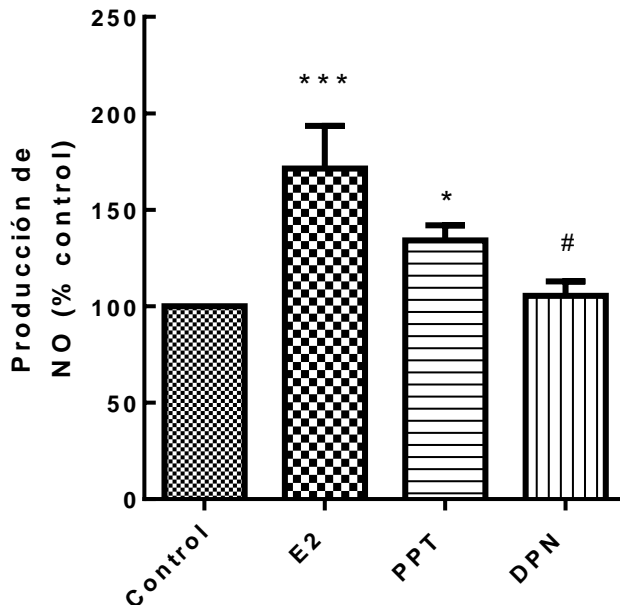




**Figura 26. Papel de RE en la producción de NO en células endoteliales humanas expuestas a E2.** Las HUVEC fueron expuestas a E2 (10 nM), en ausencia y en presencia del antagonista inespecífico de RE, ICI182780 (1  $\mu$ M) y el antagonista específico de RE $\alpha$ , MPP (1  $\mu$ M), durante 24 horas. La producción de NO se midió por fluorescencia con DAF-FM como está descrito en Material y métodos. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM con n=6-14 (4 experimentos diferentes). \*\*\* p<0,001 vs. Control. # p<0,05 vs. E2.

Para corroborar la implicación del RE $\alpha$  en la producción de NO estimulada por E2, se trataron las HUVEC con el agonista selectivo de RE $\alpha$ , PPT (10 nM) y el agonista selectivo de RE $\beta$ , DPN (10 nM). Tanto el E2 como el PPT aumentaron la producción de NO de forma muy significativa por encima de los niveles control ( $71,36 \pm 16,60$  % y  $34,20 \pm 6,79$  %,

respectivamente). Sin embargo, el tratamiento de las células con el agonista de RE $\beta$ , DPN, no alteró los valores de producción de NO (Fig. 27). Estos resultados indican que el E2 aumenta la liberación de NO a través de RE $\alpha$ .



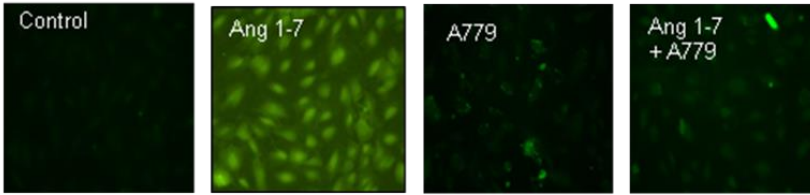
**Figura 27. Papel del RE $\alpha$  en la producción de NO en células endoteliales humanas expuestas a E2.** Las HUVEC fueron expuestas a E2 (10 nM), al agonista selectivo de RE $\alpha$ , PPT (10 nM) al agonista selectivo de RE $\beta$ , DPN (10 nM), durante 24 horas, y la producción de NO se midió por fluorescencia con DAF-FM como está descrito en Material y métodos. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM con n=6-12 (4 experimentos diferentes). \*  $p < 0.05$  vs Control. \*\*\*  $p < 0.001$  vs. Control. #  $p < 0.05$  vs. E2.

### **5.7. E2 aumenta la producción de NO a través del receptor Mas.**

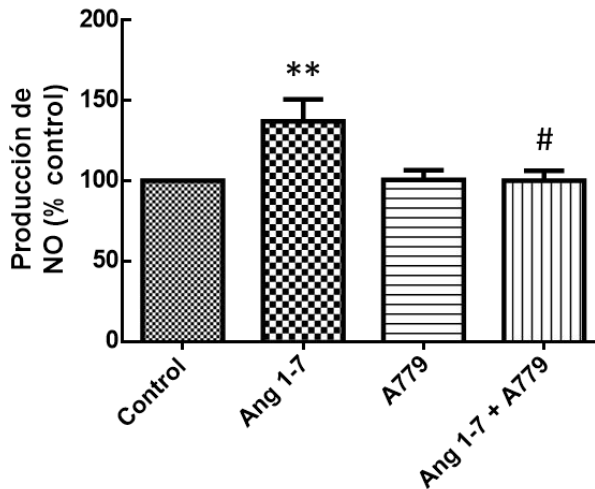
Los resultados del presente trabajo, demuestran que el E2 es capaz de estimular la producción de NO en células endoteliales a través de RE $\alpha$ . A su vez, la producción de Ang 1-7 aumenta con E2 y está también mediada a su vez por el RE $\alpha$ . Por ello se decidió estudiar si la producción endotelial de NO estaba estimulada por la Ang 1-7 y la implicación del receptor Mas, específico de la Ang 1-7, mediante la utilización de su antagonista, A779.

En primer lugar, se comprobó si la administración de Ang 1-7 exógena era capaz de estimular la producción de NO en HUVEC. Como se refleja en las imágenes de la figura 28, la Ang 1-7 (1  $\mu$ M) aumentó la producción de NO ( $37 \pm 9,17$  % por encima del control). Además, este efecto estaba mediado a través del receptor Mas ya que se bloqueó completamente con su antagonista selectivo A779 (1  $\mu$ M) (Fig. 28).

A

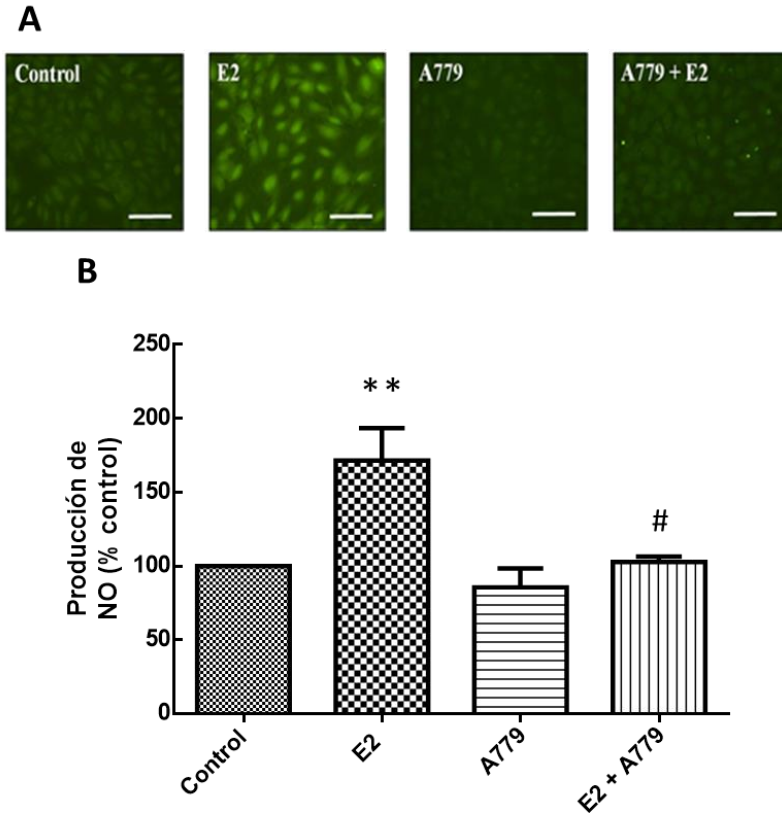


B



**Figura 28. Participación del receptor Mas en el aumento en la producción de NO mediado por Ang 1-7 y el receptor Mas.** Las HUVEC fueron expuestas a Ang 1-7 (1  $\mu$ M) en ausencia y en presencia del antagonista selectivo del receptor Mas, A779 (1  $\mu$ M) durante 24 horas, y la producción de NO se midió por fluorescencia con DAF-FM como está descrito en Material y métodos. A) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media de las imágenes obtenidas de DAF-FM. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM con n= 6-9 (3 experimentos diferentes). \*\* p<0,01 vs. Control. # p<0,05 vs. E2.

Una vez demostrada la participación del receptor Mas en la producción endotelial de NO estimulado por Ang 1-7, se midió el efecto de este receptor sobre la producción estimulada por E2.



**Figura 29. Participación del receptor Mas en la producción de NO en HUVEC tratadas con E2.** Las HUVEC fueron expuestas a E2 (10 nM) en ausencia y en presencia del antagonista selectivo de receptor Mas, A779 (1  $\mu$ M) durante 24 horas, y la producción de NO se midió por fluorescencia con DAF-FM como está descrito en Material y métodos. A) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia. B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media de las imágenes obtenidas de DAF-FM. Los datos están expresados como media  $\pm$  EEM con n=6-11 (4 experimentos diferentes). \*\* p<0,01 vs. Control. # p<0,05 vs. E2.

La producción de NO inducida por E2 (10 nM) se bloqueó completamente por el antagonista selectivo del receptor Mas, A779 (1  $\mu$ M), demostrando la participación del receptor Mas de Ang 1-7 en los efectos observados (Fig. 29). Paralelamente se realizó un tratamiento de las células sólo con el antagonista para descartar un posible efecto inespecífico del A779 en ausencia de E2. Estos resultados indican que el E2 aumenta la producción de NO en HUVEC a través del receptor Mas.

## **6. DISCUSIÓN**





Estudios previos de nuestro grupo han aportado evidencias de la regulación de algunos componentes del SRA por E2, en concreto de los genes ECA-1, angiotensinógeno y catepsina A (Sobrino, Mata et al. 2009). Tomando como base esta referencia, la presente tesis doctoral se ha centrado en el estudio de la interacción de los componentes del SRA endotelial con la producción de NO, su regulación por E2 a nivel génico, proteico y enzimático, y en la determinación del RE implicado en los efectos observados. Nuestro trabajo demuestra la existencia de un SRA en el endotelio vascular humano regulado por estrógenos a través del receptor RE $\alpha$ . Concretamente, hemos demostrado que concentraciones fisiológicas de E2 a través del RE $\alpha$  aumentan los niveles del péptido vasodilatador Ang 1-7 y éste, a través de su receptor Mas, incrementa la producción de NO en cultivos de células endoteliales humanas HUVEC. Además, el E2 aumenta los niveles de expresión génica y de la actividad enzimática de ECA-1 y ECA-2, y aumenta la expresión proteica de ECA-1, lo que explicaría el aumento de Ang 1-7 en estas células, demostrándose una conexión entre el E2 y el eje Mas/Ang 1-7.

Desde la primera identificación de la renina por Tigerstedt y Bergmann en 1898, el SRA se ha estudiado extensamente por su papel fundamental en la homeostasis del líquido extracelular y,

por tanto, en la regulación de la presión arterial. Los años de estudio del SRA han confirmado la existencia de un SRA circulante clásico y un SRA tisular, debido a que sus componentes también pueden ser sintetizados y actuar de forma local en diferentes órganos y sistemas (Nguyen Dinh Cat and Touyz 2011). Concretamente, todos los componentes del SRA se expresan en la pared vascular, excepto la renina que es captada de la circulación (Te Riet, van Esch et al. 2015). De este modo, el SRA local puede contribuir a un mejor ajuste del tono vascular e incluso amplificar los efectos vasculares del SRA circulante en determinadas circunstancias (Nguyen Dinh Cat and Touyz 2011). Los resultados de la presente tesis doctoral indican que la pared vascular no sólo actúa como un órgano efector del SRA circulante sino como un SRA local con una actividad independiente y regulada por estrógenos, convirtiéndose en un sistema de regulación vascular local (Paul, Poyan Mehr et al. 2006).

Las concentraciones de E2 utilizadas en nuestro estudio, fisiológicas en el rango de 1 a 10 nM, aumentaron la expresión de RNAm, así como la actividad enzimática de ECA-1 de manera concentración-dependiente en HUVEC. Asimismo, el E2 aumentó la expresión de la proteína ECA-1 pero no de ECA-2. Estos resultados confirman estudios previos en los que se analiza por microarrays los cambios en la expresión de genes en respuesta a E2 en células endoteliales humanas HUVEC

(Sobrino 2011). En ese estudio, la expresión del RNAm de ECA-1 aumenta con E2, al igual que la cantidad de otras proteínas, la catepsina A, la AKT y la eNOS, con participación de los receptores AT2 y Mas (Sobrino 2011). En nuestro caso, 24h de incubación con E2 es tiempo suficiente para que se produzca la traducción del RNAm, aunque no podemos descartar que con tiempos mayores podamos ver incrementada la expresión de proteína ECA-2. Otra posibilidad que explique el aumento de actividad de ECA-2 que observamos sin un aumento de la proteína es que la traducción de RNAm pueda disminuir de manera directa por E2, o de forma indirecta, a través de un aumento de actividad de ECA-2 o de un aumento en su producto, Ang 1-7. Esta discrepancia entre expresión proteica y la actividad enzimática ha sido señalada previamente por otros autores en cerebro de ratas (Xue, Zhang et al. 2014).

En otros trabajos, sin embargo, se ha detectado el aumento simultáneo en la cantidad de proteína de ambas enzimas del SRA en determinados procesos patológicos. Por ejemplo, el infarto de miocardio induce un aumento en la expresión de ECA-1 y ECA-2 en el tejido cardíaco en ratas y también en humanos, determinado en explantes de tejido isquémico cardíaco procedente de los receptores de trasplante de corazón (Burrell, Risvanis et al. 2005), deduciendo de estos resultados que ECA-2 aumenta en procesos fisiopatológicos, como es en

este caso el infarto agudo de miocardio, dando lugar a un posible efecto compensatorio ante este fenómeno.

La actividad enzimática de ECA-1 ha sido determinada por diversos grupos en diferentes condiciones experimentales (Villard, Alonso et al. 1998, Lim, Retnam et al. 2002, Proudler, Cooper et al. 2003, Yang, Matsukawa et al. 2003, Dean, Tan et al. 2005). En nuestro trabajo, los valores obtenidos para la actividad de ECA-1 (0,15 nmol/mg x min) corresponden a rangos intermedios entre los publicados por otros autores en HUVEC, que oscilan entre 0,01 y 25 nmol/mg prot x min (Villard, Alonso et al. 1998, Yang, Matsukawa et al. 2003). Sin embargo, no hemos encontrado datos de la actividad de ECA-2 en HUVEC, por lo que sería la primera vez que se determina en este tipo celular. Comparativamente, los valores de actividad enzimática de ECA-2 obtenidos en este trabajo son de 60 a 70 veces más bajos que los valores de actividad de ECA-1.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con E2 incrementó significativamente la actividad ECA-1 y ECA-2 en HUVEC en proporciones similares. La ECA-1 sintetiza Ang II a partir de Ang I, de manera que su función promueve la producción de Ang II, favoreciendo un perfil vasoconstrictor. Por otro lado, la acción de la ECA-2 da lugar a la formación del péptido vasodilatador Ang 1-7 a partir de Ang II.

El E2 no solo desencadena la liberación de Ang 1-7, como sustancia vasoactiva, con el aumento de la actividad de las ECA, sino que también desencadena la liberación de sustancias como la PGI2 y el tromboxano, que provienen de la ciclooxigenasa (COX), que es el paso limitante en la formación de prostanoideos vasoactivos a partir de ácido araquidónico. Por tanto, el E2 aumenta la eNOS, como efecto vasodilatador de la Ang 1-7, y también ejerce una regulación positiva de la expresión de la PGI2, dando lugar a un posible efecto vasodilatador y antiagregante (Sobrino, Oviedo et al. 2010).

En la mayoría de los trabajos sobre los efectos inducidos por E2 en el SRA circulante e incluso local, coinciden en una reducción de la actividad de ECA-1 y un aumento en la de ECA-2. Sin embargo y por primera vez en HUVEC, hemos descrito que la actividad de ambas enzimas aumenta por E2 y, por lo tanto, ECA-1 proporcionaría el sustrato Ang II a ECA-2 para producir Ang 1-7, como se demostró al inhibir el aumento de Ang 1-7 que inducía el E2 por lisinopril, inhibidor selectivo de la ECA-1 que no actúa sobre la actividad de la ECA-2 (Donoghue, Hsieh et al. 2000). Este efecto de inhibición de ambas enzimas ante la exposición a un inhibidor de la ECA-1 y la afirmación de otros autores de una co-localización de las mismas, nos puede indicar la posible existencia de una interacción enzimática entre ECA-1 y ECA-2 en HUVEC. Esto podría explicar que, en las lesiones endoteliales por enfermedades cardiovasculares, se observe una

restauración en la función celular atribuida al efecto protector de los inhibidores del ECA-1 (Donnini, Terzuoli et al. 2010), debido al aumento en la producción de Ang 1-7 y su consiguiente efecto vasodilatador, antiagregante y favorecedor del remodelado vascular. Por tanto, según los resultados obtenidos, el E2 en HUVEC daría lugar a un incremento de la Ang 1-7 a partir de la actividad de ECA-2 y, previamente, de ECA-1. Estos resultados se ajustan a resultados previos de nuestro grupo, que describen el perfil de expresión génica en células endoteliales humanas con E2, exhibiendo en general un efecto vasodilatador y antiagregante (Sobrino, Mata et al. 2009).

La participación de los estrógenos en la modulación de la actividad del ECA se ha reflejado en otros tejidos. Así, en la corteza renal de rata, la actividad ECA-1 fue mayor en hembras que en machos (Bhatia, Zimmerman et al. 2013). Sin embargo, otros estudios realizados sobre el SRA a nivel vascular y sistémico, sugieren que los estrógenos producen una disminución de expresión génica y actividad enzimática de ECA-1. En aorta de ratas ovariectomizadas se ha demostrado un aumento en la expresión de ECA-1 que era revertido tras la administración de estrógenos (Gallagher, Li et al. 1999, Yung, Wong et al. 2011) y en suero de mujeres postmenopáusicas tratadas con estrógenos se observó una disminución de la actividad enzimática ECA-1 (Proudler, Cooper et al. 2003, Seely, Brosnihan et al. 2004). Otros estudios realizados también

en aorta de ratas ovariectomizadas demuestran que el E2 disminuye la expresión y densidad de otras proteínas del SRA, como los receptores AT1 de la Ang II, implicados en la patogénesis de la hipertensión y la aterosclerosis (Nickenig, Baumer et al. 1998, Krishnamurthi, Verbalis et al. 1999, Wu, Zheng et al. 2003). También se ha descrito que la actividad plasmática ECA-1 es mayor en hombres (Zapater, Novalbos et al. 2004) como en ratones macho (Lim, Retnam et al. 2002). Las diferencias entre machos y hembras podrían ser debidas a una mayor estimulación de la actividad de la ECA-1 por los andrógenos, como se ha demostrado en hombres en los que la testosterona aumenta la actividad ECA-1 (Pingili, Kara et al. 2015) o incluso en mujeres con síndrome de ovario poliquístico, en las que la elevada concentración de andrógenos está relacionada con una mayor actividad ECA-1 (Arefi, Mottaghi et al. 2013). Estas discrepancias entre los resultados obtenidos en HUVEC tratadas con E2 y los datos obtenidos de experimentos de terapia hormonal sustitutiva podrían deberse al equilibrio entre el SRA local y circulante, o incluso a una diferencia fisiológica en la regulación por E2 en las células del músculo liso y el endotelio vascular.

A pesar de la falta de referencias sobre el efecto del E2 en la actividad del ECA-2, los datos experimentales en rata sugieren un aumento en su actividad por estrógenos. Por ejemplo, la expresión de ECA-2 en tejido renal de ratas hembra es mayor



que en machos, demostrando una mayor actividad de esta ruta vasodilatadora del SRA en hembras (Sampson, Moritz et al. 2012). Además, el aumento en la actividad ECA-2 en la corteza y médula renal en ratas preñadas se correlaciona con aumentos en las concentraciones séricas de E2 (Joyner, Neves et al. 2007), y en ratas ovariectomizadas la actividad y expresión de proteína de ECA-2 disminuye en la corteza renal y se normaliza después de un tratamiento con estrógenos (Ji, Menini et al. 2008). Este efecto también coincide con el observado en tejido cardíaco, donde el aumento en la expresión de ECA-2 aumenta después del tratamiento con E2 en rata (Shenoy, Grobe et al. 2009). Sin embargo, los datos en ratón son menos coincidentes ya que los ratones machos tienen también mayor actividad renal ECA-2, mientras que no se detectaron diferencias de género en tejido cardíaco ni pulmonar (Liu, Ji et al. 2010).

Se ha propuesto que ECA-2, que daría lugar a Ang 1-7, podría proteger frente a los aumentos en la presión arterial, por lo que una deficiencia en la actividad de ECA-2 podría derivar en hipertensión (Crackower, Sarao et al. 2002). Como se ha comentado anteriormente, en la mayoría de los trabajos los efectos inducidos por E2 sobre el SRA circulante o local son duales, reduciendo la actividad ECA-1 y aumentando la de ECA-2. En HUVEC, la actividad de ambas enzimas aumentó por E2, y, por tanto, ECA-1 asegura el sustrato Ang II a la ECA-2 para generar Ang 1-7, como se ha demostrado por la

inhibición de la producción de Ang 1-7 por E2 en presencia de lisinopril, un inhibidor selectivo de ECA-1 sin actividad sobre ECA-2 (Donoghue, Hsieh et al. 2000). Por lo tanto, en el endotelio, el aumento de actividad en el SRA inducido por E2, resultaría en un incremento en la producción de Ang 1-7 que prevendría la acumulación de Ang II.

Los estrógenos modulan la función fisiológica y cardiovascular a través de sus receptores clásicos,  $ER\alpha$  y  $ER\beta$ , ambos expresados en HUVEC (Wagner, Pfau et al. 2001, Mendelsohn 2002, Sobrino, Mata et al. 2009), y también en células endoteliales de origen arterial (Novella, Laguna-Fernandez et al. 2013). Los efectos inducidos por E2 en la expresión de RNAm, proteína y actividad de ECA-1 y ECA-2, y sobre la producción de Ang 1-7, se inhibieron con el antagonista competitivo de  $RE\alpha$  y  $RE\beta$ , ICI182780, y por el antagonista específico del  $RE\alpha$ , MPP. Además, el agonista del  $RE\alpha$ , PPT, pero no el del  $RE\beta$ , DPN, ejercía efectos similares. Estos resultados demuestran una implicación selectiva del  $RE\alpha$  en los efectos moduladores del E2 sobre los componentes del SRA en HUVEC. Teniendo en cuenta los efectos beneficiosos de la Ang 1-7, la degradación de la Ang II por la actividad ECA-2 y la consiguiente formación de Ang 1-7, podría representar un mecanismo de protección. Por tanto, nuestros resultados ofrecen nueva información que apoya al  $RE\alpha$  en los efectos vasodilatadores mediados por E2 y su papel central en los efectos beneficiosos del E2 en la fisiología

endotelial (Arnal, Fontaine et al. 2010, Novella, Dantas et al. 2012, Novella, Laguna-Fernandez et al. 2013).

En HUVEC, el E2 aumentó significativamente la producción de Ang 1-7. Este resultado encaja con el aumento en la expresión y actividad enzimática de la ECA-1 y ECA-2 inducido por el E2 en HUVEC y coincide con lo observado en células endoteliales procedentes de arteria coronaria humana expuestas a 10 nM de E2 durante 24 horas, donde también se ha descrito un aumento en la expresión de ECA-1 (Wingrove, Garr et al. 1999). El efecto estimulante del E2 se bloqueó con ICI182780, el antagonista inespecífico de los RE, demostrando la implicación de los RE tradicionales en el aumento de Ang 1-7, y el bloqueo de la estimulación inducida por E2 resultado del tratamiento con MPP, el antagonista de RE $\alpha$ , demuestra la implicación del RE $\alpha$  en el aumento de Ang 1-7 en HUVEC. Asimismo, el bloqueo con lisinopril demuestra la implicación de la ECA en los efectos observados.

Nuestros resultados coinciden con varios estudios experimentales en los que se describe una relación entre los estrógenos y el aumento local de Ang 1-7. Por ejemplo, ratas hembra tienen mayores niveles de Ang 1-7 renal que los machos, mientras que los niveles de Ang II son mayores en los machos (Bhatia, Zimmerman et al. 2013). En ratas Lewis normotensas no se demostraron las diferencias de género en de la Ang II y Ang 1-7 plasmáticas y renales, pero en ratas Lewis

hipertensas mRen2 (modelo que tiene sobreexpresado el gen de la renina), los niveles de Ang II en el plasma de los machos eran mayores y los niveles de Ang 1-7 eran menores que en las hembras (Pendergrass, Pirro et al. 2008, Yamaleyeva, Gilliam-Davis et al. 2012). La regulación de la Ang II y Ang 1-7 se produce de forma diferente en machos y hembras con obesidad inducida por la dieta (Gupte, Thatcher et al. 2012). En este modelo, las hembras alimentadas con una dieta con bajo contenido en grasa mostraban unos bajos niveles de Ang 1-7 en plasma, mientras que las hembras alimentadas con un alto contenido en grasas los niveles de Ang II en plasma disminuyeron y aumentaron los niveles de Ang 1-7. Además, en las ratas alimentadas con dieta con alto contenido en grasas que luego fueron ovariectomizadas se observó una disminución de los niveles de Ang 1-7, apoyando así el papel del E2 en el mantenimiento de los niveles de Ang 1-7.

Asimismo, en tejido renal, se ha demostrado que el RE $\alpha$  es el principal responsable de la regulación génica de la ECA-2 y los receptores AT1 y AT2. Sin embargo, en HUVEC expuestas a E2, estudios previos de nuestro grupo (Sobrino, Mata et al. 2009) demuestran la ausencia de cambios en los receptores AT1 y AT2, pero muestran un aumento, corroborado los datos de esta tesis, de los niveles de RNAm de ECA-1 y ECA-2, cambios que como demostramos están, a su vez, mediados por RE $\alpha$ .

El endotelio es el lugar de mayor generación y metabolismo de Ang 1-7 (Santos, Brosnihan et al. 1992, Lemos, Cortes et al. 2002, Qaradakhi, Apostolopoulos et al. 2016). Además de Ang 1-7, las células endoteliales expresan ECA-2 y su receptor Mas. Las acciones de la Ang 1-7 vascular son objeto de controversia en humanos ya que ha sido demostrado que la Ang 1-7 provoca vasodilatación en la circulación del antebrazo de los sujetos normotensos y en pacientes con hipertensión esencial, mientras que otros estudios no fueron capaces de informar ningún efecto significativo de Ang 1-7 en el mismo territorio vascular que los pacientes tratados con IECA (Ferreira, Murca et al. 2012). Pero sin embargo, años antes se afirmó que la administración crónica de IECA aumenta de 10 a 20 veces los niveles plasmáticos de Ang 1-7, sugiriendo que parte del efecto beneficioso de los inhibidores de las ECA pueden estar mediados por este péptido (Iusuf, Henning et al. 2008).

Se ha demostrado el papel de la Ang 1-7 en la modulación del riesgo cardiovascular y que presenta efectos cardioprotectores. Estudios realizados en animales demuestran el papel protector contra el deterioro endotelial asociado a la obesidad inducida por la dieta en aorta de ratones (Beyer, Guo et al. 2013). Además, este péptido puede desempeñar un papel en los efectos beneficiosos de los IECA en las enfermedades cardiovasculares, como se observó en estudios realizados en un modelo de rata Sprague-Dawley macho para la insuficiencia cardíaca, donde se

evaluaron los efectos de la Ang 1-7 sobre la progresión de la insuficiencia cardíaca y, concluyeron, que la Ang 1-7 preservó la función cardíaca, la perfusión coronaria y la función endotelial aórtica (Loot, Roks et al. 2002).

La Ang 1-7 presenta también un efecto antiarrítmico, el cual se observó en modelos de ratas y ratones transgénicos para Ang 1-7 TG(A1-7) L-3292, donde se obtuvo un efecto anti-modulador significativo en diferentes modelos de cardiomiopatía, denotando un incremento en la circulación de Ang 1-7 en los animales perfundidos tras provocarles isquemia cardíaca.

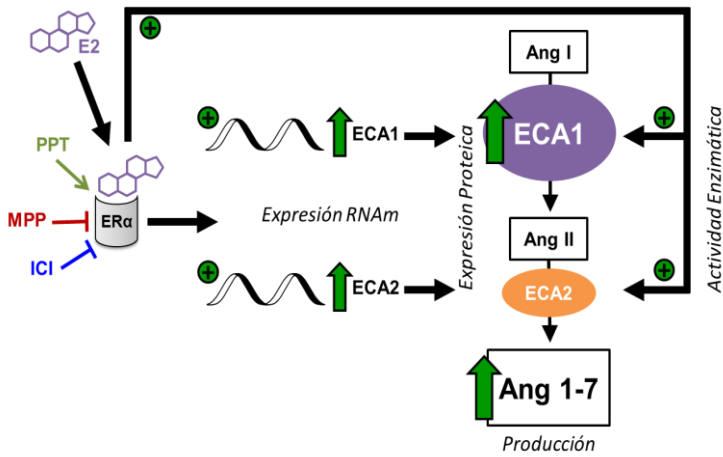
El eje compuesto por Ang 1-7/ Mas, demostró con sus resultados en el modelo de ratas transgénicas con hipertensión provocada por la sal de DOCA, que modificaban la hipertrofia de cardiomiocitos, descubriéndose un efecto que previene la hipertrofia.

En vasos sanguíneos humanos, el efecto vasodilatador de la Ang 1-7 se observó en pacientes tratados crónicamente con IECA, que tienen los niveles circulantes de Ang 1-7 especialmente incrementados, y además de sus efectos sobre la función endotelial y el tono vascular, se observaron también efectos antiproliferativos de la Ang 1-7 en células del músculo liso vascular (Santos 2014)

La ECA-1 es la enzima que convierte la Ang I a Ang II, por lo que un incremento en su actividad provocaría un aumento de

Ang II. Sin embargo, hemos comprobado que los niveles de Ang II no varían con E2, a pesar del aumento en la expresión y actividad de ECA-1. Desde un punto de vista teórico, el tratamiento con lisinopril se debería reflejar en una disminución en los niveles de Ang II y consecuentemente de Ang 1-7. Sin embargo, nuestros experimentos demuestran que en HUVEC se siguen expresando estos péptidos tras el tratamiento con lisinopril. Probablemente, el mantenimiento constante de sus niveles celulares sea debido a la conversión del exceso de Ang II en Ang 1-7. Este fenómeno podría deberse a las enzimas PEP o ECA-2 que transforman Ang II en Ang 1-7 (Iusuf, Henning et al. 2008) o a la catepsina A, cuya expresión también está estimulada por E2 (Sobrino, Mata et al. 2009).

Englobando los resultados obtenidos podemos concluir con que el E2 a través de su RE $\alpha$  produce un aumento de la expresión y actividad enzimática de ECA-1 y ECA-2 en HUVEC, generando finalmente el péptido vasodilatador Ang 1-7 (Fig. 30).



**Figura 30. Esquema ilustrativo del efecto inducido por E2 en HUVEC.** El E2 actuando a través del ERα aumenta la expresión del RNAm y la actividad de ECA-1 y ECA-2, aumenta la expresión proteica de ECA-1, resultando un aumento de la producción de Ang 1-7. PPT es un antagonista específico de ERα, MPP es un antagonista específico de ERα e ICI182780 es un antagonista inespecífico de RE.

La repercusión funcional en el endotelio de la interacción del E2 con el SRA la hemos estudiado en la producción de NO, partiendo de la base de que tanto el E2 como la Ang 1-7 son capaces de aumentar significativamente la producción de NO en HUVEC (Sobrino, Mata et al. 2009, Santos 2014, Mompeon, Lazaro-Franco et al. 2016) como hemos comprobado en esta tesis. Para estudiar la participación de la eNOS en la liberación de NO inducida por E2 tratamos a las células con el inhibidor de la NOS, observando un bloqueo total de la producción de NO con el tratamiento con L-NAME. En la cuantificación de liberación de NO a diferentes tiempos se observa que el



aumento comienza a ser significativo tras 1 hora de exposición a E2 10 nM y comprobamos que el periodo de incubación que se corresponde con la máxima producción de NO es a las 24 horas. Estos resultados coinciden también con las condiciones de tratamiento utilizados por nuestro grupo en estudios anteriores (Hermenegildo, Garcia-Martinez et al. 2002, Sobrino, Mata et al. 2009).

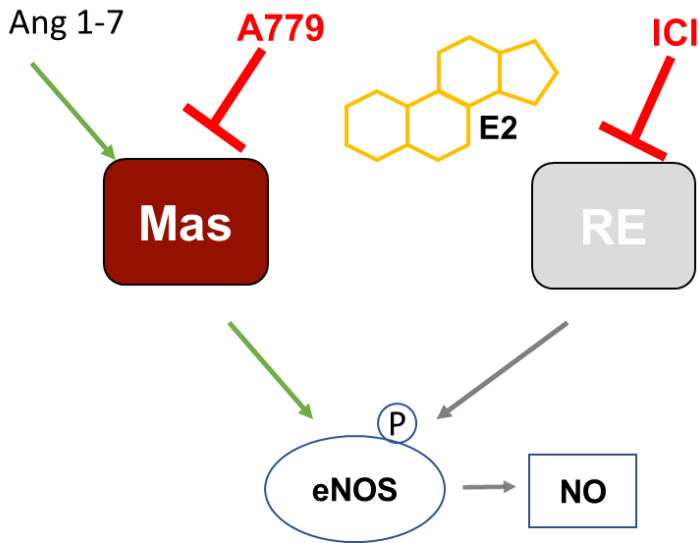
Al igual que en las determinaciones anteriores, comprobamos farmacológicamente que el RE implicado en la producción de NO en HUVEC es el RE $\alpha$ , lo que concuerda con las publicaciones de otros autores (Simoncini, Rabkin et al. 2003, Satake, Takaoka et al. 2008, Pastore, Talwar et al. 2016), que afirman que la activación de la eNOS en células endoteliales y renales provoca una cascada de fosforilaciones de Akt y eNOS que daría lugar a la liberación de NO. De este modo, el RE $\alpha$  se erige como el principal receptor implicado en los efectos vasodilatadores inducidos por E2 aumentando la producción local de NO y de otras sustancias vasoactivas, como la prostaciclina (Mendelsohn and Karas 2005, Sobrino, Mata et al. 2009, Sobrino, Oviedo et al. 2010, Oviedo, Sobrino et al. 2011) de carácter vasodilatador y antiagregante plaquetario.

Los estrógenos, además, representan una clase de factores químicos circulantes que pueden modular la producción de NO e induce aumentos de NO a nivel de células endoteliales cerebrales y periféricas, a través de la activación de la eNOS y a

través de mecanismos mediados por RE (Li, Liu et al. 2015, Pang and Thomas 2017). Estos mecanismos, implican la activación de la ruta de fosforilación Akt/eNOS y la transcripción de eNOS y liberando finalmente NO (Duckles and Miller 2010, Nevzati, Shafighi et al. 2015), afirmaciones que concuerdan con nuestros resultados obtenidos en HUVEC, en los que el tratamiento de las mismas con E2 a concentraciones fisiológicas fosforilaba la quinasa Akt(Ser473) y eNOS en la quinasa Ser1177 donde observamos como resultado de estas fosforilaciones un aumento de la producción de NO (Sobrino, Mata et al. 2009).

Considerando los beneficios del efecto cardiovascular de la Ang 1-7 y que la degradación de la Ang II mediada por la ECA-2 resulta en la formación de Ang 1-7, podemos concluir en que nuestros resultados representarían un mecanismo de protección endotelial. Además, la producción de NO inducida por E2 se bloquea no sólo con ICI182780 y MPP, antagonista selectivo de los RE $\alpha$  y no selectivo de los RE $\alpha$  y RE $\beta$ , respectivamente, sino también con A779, antagonista del receptor Mas, lo que sugiere que tanto el RE $\alpha$  como el receptor Mas comparten una ruta de señalización que posibilita la interacción entre ambos receptores a nivel funcional, observada por primera vez en HUVEC (Fig. 31). Demostramos, por tanto, que el receptor Mas juega un papel fundamental en la vasodilatación dependiente de NO y mediada

por E2. De hecho, es necesaria la presencia de un receptor Mas funcional para la producción de NO mediada por E2.



**Figura 31. Esquema ilustrativo de la producción de NO en HUVEC tratadas con E2.** Estradiol actuando a través de RE y con la participación del receptor Mas de Ang 1-7 incrementa la producción de NO. A779 es antagonista específico del receptor Mas e ICI182780 es un antagonista inespecífico de RE.

Nuestros resultados confirman estudios publicados previamente (Peiro, Vallejo et al. 2013) en los que se demuestra que las HUVEC incubadas con A779 pierden su capacidad de producir NO endotelial, incluso después de estimularlas con bradiquinina.

Por consiguiente, podemos concluir afirmando que en HUVEC el E2, por medio del RE $\alpha$  y a través de las ECA, aumenta la producción de Ang 1-7, y que actuando a través del receptor Mas incrementa la liberación de NO. Y por primera vez en HUVEC se detecta un incremento en la expresión de ECA-1 y ECA-2, y se observa una posible interacción entre el RE $\alpha$  y el receptor Mas de Ang 1-7.

La regulación de la ECA-2 y el NO por E2 observada en la presente tesis, plantea la posibilidad de que haya una regulación diferencial de la enzima en las mujeres durante su vida debido a sus cambios hormonales fisiológicos. De esta manera, el desorden hormonal puede incrementar la susceptibilidad a sufrir enfermedades donde está involucrado el SRA, teniendo especial repercusión en las mujeres postmenopáusicas. Por lo tanto, la modulación de la actividad ECA-2 y la estimulación del RE $\alpha$  o el receptor Mas, se pueden plantear como una oportunidad terapéutica para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.



## **7. CONCLUSIONES**



1. Nuestros resultados confirman la expresión y actividad de las enzimas ECA-1 y ECA-2 en HUVEC, resultando en una producción basal de Ang II y Ang 1-7 y demostrando la existencia de un SRA en células endoteliales humanas.
2. La exposición a concentraciones fisiológicas de E2 en HUVEC estimula el SRA local a través del RE $\alpha$ , que conduce a un aumento de la producción de Ang 1-7 a través del incremento en la expresión y en la actividad de ECA-1 y ECA-2 endoteliales.
3. El E2 estimula la producción endotelial de NO tanto de forma aguda como después de 24 horas de exposición, lo cual implica mecanismos a corto plazo y también genómicos, estos últimos mediados por RE $\alpha$ .



4. La producción de NO estimulada por E2 en HUVEC está completamente inhibida por A779, demostrando la implicación del receptor Mas de Ang 1-7 en esta respuesta. El efecto similar que tienen el receptor Mas y el RE $\alpha$  en la regulación de la producción de NO, y la interacción existente entre ambas vías, abre nuevas líneas de investigación sobre el papel central de Mas en la función endotelial.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**



Aird, W. C. (2007). "Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds." Circ Res **100**(2): 174-190.

Alenina, N., P. Xu, B. Rentzsch, E. L. Patkin and M. Bader (2008). "Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1-7)." Exp Physiol **93**(5): 528-537.

Ambuhl, P., D. Felix and M. C. Khosla (1994). "[7-D-ALA]-angiotensin-(1-7): selective antagonism of angiotensin-(1-7) in the rat paraventricular nucleus." Brain Res Bull **35**(4): 289-291.

Arefi, S., S. Mottaghi and A. M. Sharifi (2013). "Studying the correlation of renin-angiotensin-system (RAS) components and insulin resistance in polycystic ovary syndrome (PCOs)." Gynecol Endocrinol **29**(5): 470-473.

Arnal, J. F., C. Fontaine, A. Billon-Gales, J. Favre, H. Laurell, F. Lenfant and P. Gourdy (2010). "Estrogen receptors and endothelium." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(8): 1506-1512.

Bader, M., N. Alenina, M. A. Andrade-Navarro and R. A. Santos (2014). "MAS and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs." Pharmacol Rev **66**(4): 1080-1105.

Barton, M., M. R. Meyer and E. R. Prossnitz (2011). "Estrogen-independent activation of estrogen receptors." Hypertension **57**(6): 1056-1057.

Bayorh, M. A., M. Wang, R. R. Socci, D. Eatman, N. Emmett and M. Thierry-Palmer (1999). "Angiotensin-(1-7) antagonist [D-Ala<sup>7</sup>-Ang-(1-7);A-779] attenuates post-suspension hypotension in Sprague-Dawley rats." J Gravit Physiol **6**(1): P115-116.

Beyer, A. M., D. F. Guo and K. Rahmouni (2013). "Prolonged treatment with angiotensin 1-7 improves endothelial function in diet-induced obesity." J Hypertens **31**(4): 730-738.

Bhatia, K., M. A. Zimmerman and J. C. Sullivan (2013). "Sex differences in angiotensin-converting enzyme modulation of Ang (1-7) levels in normotensive WKY rats." Am J Hypertens **26**(5): 591-598.

Bilsel, A. S., N. Onaran, H. Moini and K. Emerk (2000). "Long-term effect of 17beta-estradiol and thrombin on tissue factor pathway inhibitor release from HUVEC." Thromb Res **99**(2): 173-178.

Block, C. H., R. A. Santos, K. B. Brosnihan and C. M. Ferrario (1988). "Immunocytochemical localization of angiotensin-(1-7) in the rat forebrain." Peptides **9**(6): 1395-1401.

Bredt, D. S. and S. H. Snyder (1994). "Nitric oxide: a physiologic messenger molecule." Annu Rev Biochem **63**: 175-195.

Bunning, P., B. Holmquist and J. F. Riordan (1983). "Substrate specificity and kinetic characteristics of angiotensin converting enzyme." Biochemistry **22**(1): 103-110.

Burrell, L. M., C. I. Johnston, C. Tikellis and M. E. Cooper (2004). "ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system." Trends Endocrinol Metab **15**(4): 166-169.

Burrell, L. M., J. Risvanis, E. Kubota, R. G. Dean, P. S. MacDonald, S. Lu, C. Tikellis, S. L. Grant, R. A. Lew, A. I. Smith, M. E. Cooper and C. I. Johnston (2005). "Myocardial infarction increases ACE2 expression in rat and humans." Eur Heart J **26**(4): 369-375; discussion 322-364.

Campagnole-Santos, M. J., D. I. Diz and C. M. Ferrario (1990). "Actions of angiotensin peptides after partial denervation of the solitary tract nucleus." Hypertension **15**(2 Suppl): I34-39.

Carey, R. M. and H. M. Siragy (2003). "Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation." Endocr Rev **24**(3): 261-271.

Clark, M. A., D. I. Diz and E. A. Tallant (2001). "Angiotensin-(1-7) downregulates the angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells." Hypertension **37**(4): 1141-1146.

Costa, M. A., M. A. Lopez Verrilli, K. A. Gomez, P. Nakagawa, C. Pena, C. Arranz and M. M. Gironacci (2010). "Angiotensin-(1-7) upregulates cardiac nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **299**(4): H1205-1211.

Crackower, M. A., R. Sarao, G. Y. Oudit, C. Yagil, I. Kozieradzki, S. E. Scanga, A. J. Oliveira-dos-Santos, J. da Costa, L. Zhang, Y. Pei, J. Scholey, C. M. Ferrario, A. S. Manoukian, M. C. Chappell, P. H. Backx, Y. Yagil and J. M. Penninger (2002). "Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function." Nature **417**(6891): 822-828.

Cvoro, A., D. Tatomer, M. K. Tee, T. Zogovic, H. A. Harris and D. C. Leitman (2008). "Selective estrogen receptor-beta agonists repress transcription of proinflammatory genes." J Immunol **180**(1): 630-636.

Chakrabarti, S., O. Lekontseva, A. Peters and S. T. Davidge (2010). "17beta-Estradiol induces protein S-nitrosylation in the endothelium." Cardiovasc Res **85**(4): 796-805.

Chappel, M. C. and C. M. Ferrario (2006). "ACE and ACE2: their role to balance the expression of angiotensin II and angiotensin-(1-7)." *Kidney Int* **70**(1): 8-10.

Chappell, M. C., S. N. Iyer, D. I. Diz and C. M. Ferrario (1998). "Antihypertensive effects of angiotensin-(1-7)." *Braz J Med Biol Res* **31**(9): 1205-1212.

Cherne, P. N. and P. Young (2014). "[History of the renin-angiotensin system: great men, a great finding]." *Rev Med Chil* **142**(9): 1210-1216.

Davies, M. G. and P. O. Hagen (1993). "The vascular endothelium. A new horizon." *Ann Surg* **218**(5): 593-609.

Dean, S. A., J. Tan, E. R. O'Brien and F. H. Leenen (2005). "17beta-estradiol downregulates tissue angiotensin-converting enzyme and ANG II type 1 receptor in female rats." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **288**(3): R759-766.

Desideri, G., D. Grassi, G. Croce, R. Bocale, S. Tiberti, S. Evangelista, S. Necozone, F. Di Orio and C. Ferri (2008). "Different effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on endothelin-1 and nitric oxide balance in human vascular endothelial cells: evidence of an oxidant-sensitive pathway." *Mediators Inflamm* **2008**: 305087.



Donnini, S., E. Terzuoli, M. Ziche and L. Morbidelli (2010). "Sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibitor promotes endothelial cell survival through nitric-oxide synthase, fibroblast growth factor-2, and telomerase cross-talk." J Pharmacol Exp Ther **332**(3): 776-784.

Donoghue, M., F. Hsieh, E. Baronas, K. Godbout, M. Gosselin, N. Stagliano, M. Donovan, B. Woolf, K. Robison, R. Jeyaseelan, R. E. Breitbart and S. Acton (2000). "A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9." Circ Res **87**(5): E1-9.

Duckles, S. P. and V. M. Miller (2010). "Hormonal modulation of endothelial NO production." Pflugers Arch **459**(6): 841-851.

Evans, R. M. (1988). "The steroid and thyroid hormone receptor superfamily." Science **240**(4854): 889-895.

Ferrario, C. M., M. C. Chappell, R. H. Dean and S. N. Iyer (1998). "Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis." J Am Soc Nephrol **9**(9): 1716-1722.

Ferrario, C. M., M. C. Chappell, E. A. Tallant, K. B. Brosnihan and D. I. Diz (1997). "Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7)." Hypertension **30**(3 Pt 2): 535-541.

Ferreira, A. J., T. M. Murca, R. A. Fraga-Silva, C. H. Castro, M. K. Raizada and R. A. Santos (2012). "New cardiovascular and pulmonary therapeutic strategies based on the Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor axis." Int J Hypertens **2012**: 147825.

Ferreira, A. J. and R. A. Santos (2005). "Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7)." Braz J Med Biol Res **38**(4): 499-507.

Forstermann, U. and W. C. Sessa (2012). "Nitric oxide synthases: regulation and function." Eur Heart J **33**(7): 829-837, 837a-837d.

Gallagher, P. E., P. Li, J. R. Lenhart, M. C. Chappell and K. B. Brosnihan (1999). "Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA." Hypertension **33**(1 Pt 2): 323-328.

Geisler, J. (2003). "Breast cancer tissue estrogens and their manipulation with aromatase inhibitors and inactivators." J Steroid Biochem Mol Biol **86**(3-5): 245-253.

Gembardt, F., S. Grajewski, M. Vahl, H. P. Schultheiss and T. Walther (2008). "Angiotensin metabolites can stimulate receptors of the Mas-related genes family." Mol Cell Biochem **319**(1-2): 115-123.

Girgih, A. T., I. D. Nwachukwu, F. Hasan, T. N. Fagbemi, T. Gill and R. E. Aluko (2015). "Kinetics of the inhibition of renin

and angiotensin I-converting enzyme by cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates and their antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats." Food Nutr Res **59**: 29788.

Gomez, H. J., V. J. Cirillo and F. Moncloa (1987). "The clinical pharmacology of lisinopril." J Cardiovasc Pharmacol **9 Suppl 3**: S27-34.

Grace, J. A., C. B. Herath, K. Y. Mak, L. M. Burrell and P. W. Angus (2012). "Update on new aspects of the renin-angiotensin system in liver disease: clinical implications and new therapeutic options." Clin Sci (Lond) **123**(4): 225-239.

Guo, X., M. Razandi, A. Pedram, G. Kassab and E. R. Levin (2005). "Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase signaling to nitric oxide and estrogen receptors alpha and beta." J Biol Chem **280**(20): 19704-19710.

Gupte, M., S. E. Thatcher, C. M. Boustany-Kari, R. Shoemaker, F. Yiannikouris, X. Zhang, M. Karounos and L. A. Cassis (2012). "Angiotensin converting enzyme 2 contributes to sex differences in the development of obesity hypertension in C57BL/6 mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(6): 1392-1399.

Guy, J. L., R. M. Jackson, K. R. Acharya, E. D. Sturrock, N. M. Hooper and A. J. Turner (2003). "Angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2): comparative modeling of the active site,

specificity requirements, and chloride dependence." Biochemistry **42**(45): 13185-13192.

Hermenegildo, C. and A. Cano (2000). "Pure anti-oestrogens." Hum Reprod Update **6**(3): 237-243.

Hermenegildo, C., M. C. Garcia-Martinez, J. J. Tarin and A. Cano (2002). "Estradiol reduces F2alpha-isoprostane production in cultured human endothelial cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(6): H2644-2649.

Huang, L., D. J. Sexton, K. Skogerson, M. Devlin, R. Smith, I. Sanyal, T. Parry, R. Kent, J. Enright, Q. L. Wu, G. Conley, D. DeOliveira, L. Morganelli, M. Ducar, C. R. Wescott and R. C. Ladner (2003). "Novel peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2." J Biol Chem **278**(18): 15532-15540.

Ignarro, L. J. (1999). "Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology." Biosci Rep **19**(2): 51-71.

Imai, Y., K. Kuba, T. Ohto-Nakanishi and J. M. Penninger (2010). "Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in disease pathogenesis." Circ J **74**(3): 405-410.

Ingelfinger, J. R. (2009). "Angiotensin-converting enzyme 2: implications for blood pressure and kidney disease." Curr Opin Nephrol Hypertens **18**(1): 79-84.

Iusuf, D., R. H. Henning, W. H. van Gilst and A. J. Roks (2008). "Angiotensin-(1-7): pharmacological properties and pharmacotherapeutic perspectives." Eur J Pharmacol **585**(2-3): 303-312.

Jackman, H. L., M. G. Massad, M. Sekosan, F. Tan, V. Brovkovich, B. M. Marcic and E. G. Erdos (2002). "Angiotensin 1-9 and 1-7 release in human heart: role of cathepsin A." Hypertension **39**(5): 976-981.

Jaffe, E. A., R. L. Nachman, C. G. Becker and C. R. Minick (1973). "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria." J Clin Invest **52**(11): 2745-2756.

Ji, H., S. Menini, W. Zheng, C. Pesce, X. Wu and K. Sandberg (2008). "Role of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin(1-7) in 17beta-oestradiol regulation of renal pathology in renal wrap hypertension in rats." Exp Physiol **93**(5): 648-657.

Joyner, J., L. A. Neves, J. P. Granger, B. T. Alexander, D. C. Merrill, M. C. Chappell, C. M. Ferrario, W. P. Davis and K. B. Brosnihan (2007). "Temporal-spatial expression of ANG-(1-7) and angiotensin-converting enzyme 2 in the kidney of normal and hypertensive pregnant rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **293**(1): R169-177.

Khalil, R. A. (2013). "Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease." Biochem Pharmacol **86**(12): 1627-1642.

Krishnamurthi, K., J. G. Verbalis, W. Zheng, Z. Wu, L. B. Clerch and K. Sandberg (1999). "Estrogen regulates angiotensin AT1 receptor expression via cytosolic proteins that bind to the 5' leader sequence of the receptor mRNA." Endocrinology **140**(11): 5435-5438.

Lautner, R. Q., D. C. Villela, R. A. Fraga-Silva, N. Silva, T. Verano-Braga, F. Costa-Fraga, J. Jankowski, V. Jankowski, F. Sousa, A. Alzamora, E. Soares, C. Barbosa, F. Kjeldsen, A. Oliveira, J. Braga, S. Savergnini, G. Maia, A. B. Peluso, D. Passos-Silva, A. Ferreira, F. Alves, A. Martins, M. Raizada, R. Paula, D. Motta-Santos, F. Klempin, A. Pimenta, N. Alenina, R. Sinisterra, M. Bader, M. J. Campagnole-Santos and R. A. Santos (2013). "Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system." Circ Res **112**(8): 1104-1111.

Lemos, V. S., S. F. Cortes, D. M. Silva, M. J. Campagnole-Santos and R. A. Santos (2002). "Angiotensin-(1-7) is involved in the endothelium-dependent modulation of phenylephrine-induced contraction in the aorta of mRen-2 transgenic rats." Br J Pharmacol **135**(7): 1743-1748.

Li, H., Z. Liu, Y. Gou, H. Yu, S. Siminelakis, S. Wang, D. Kong, Y. Zhou, Z. Liu, Y. Ding and D. Yao (2015). "Estradiol mediates vasculoprotection via ERRalpha-dependent regulation of lipid and ROS metabolism in the endothelium." J Mol Cell Cardiol **87**: 92-101.

Li, P., M. C. Chappell, C. M. Ferrario and K. B. Brosnihan (1997). "Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide." Hypertension **29**(1 Pt 2): 394-400.

Lim, Y. K., L. Retnam, B. Bhagavath, S. K. Sethi, A. bin Ali and S. K. Lim (2002). "Gonadal effects on plasma ACE activity in mice." Atherosclerosis **160**(2): 311-316.

Liu, J., H. Ji, W. Zheng, X. Wu, J. J. Zhu, A. P. Arnold and K. Sandberg (2010). "Sex differences in renal angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) activity are 17beta-oestradiol-dependent and sex chromosome-independent." Biol Sex Differ **1**(1): 6.

Liu, Y., B. Li, X. Wang, G. Li, R. Shang, J. Yang, J. Wang, M. Zhang, Y. Chen, Y. Zhang, C. Zhang and P. Hao (2015). "Angiotensin-(1-7) Suppresses Hepatocellular Carcinoma Growth and Angiogenesis via Complex Interactions of Angiotensin II Type 1 Receptor, Angiotensin II Type 2 Receptor and Mas Receptor." Mol Med **21**: 626-636.

Loot, A. E., A. J. Roks, R. H. Henning, R. A. Tio, A. J. Suurmeijer, F. Boomsma and W. H. van Gilst (2002). "Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats." Circulation **105**(13): 1548-1550.

Lopez Verrilli, M. A., C. J. Pirola, M. M. Pascual, F. P. Dominici, D. Turyn and M. M. Gironacci (2009). "Angiotensin-(1-7) through AT receptors mediates tyrosine hydroxylase degradation via the ubiquitin-proteasome pathway." J Neurochem **109**(2): 326-335.

Luo, S., H. Lei, H. Qin and Y. Xia (2014). "Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling." Curr Pharm Des **20**(22): 3548-3553.

McCurdy, C. E. and D. J. Klemm (2013). "Adipose tissue insulin sensitivity and macrophage recruitment: Does PI3K pick the pathway?" Adipocyte **2**(3): 135-142.

Mecca, A. P., R. W. Regenhardt, T. E. O'Connor, J. P. Joseph, M. K. Raizada, M. J. Katovich and C. Sumners (2011). "Cerebroprotection by angiotensin-(1-7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke." Exp Physiol **96**(10): 1084-1096.

Meinert, C., F. Gembardt, I. Bohme, A. Tetzner, T. Wieland, B. Greenberg and T. Walther (2016). "Identification of intracellular



proteins and signaling pathways in human endothelial cells regulated by angiotensin-(1-7)." J Proteomics **130**: 129-139.

Mendelsohn, M. E. (2002). "Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature." Am J Cardiol **90**(1A): 3F-6F.

Mendelsohn, M. E. and R. H. Karas (2005). "Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences." Science **308**(5728): 1583-1587.

Mentlein, R. (1988). "Proline residues in the maturation and degradation of peptide hormones and neuropeptides." FEBS Lett **234**(2): 251-256.

Michel, T. and P. M. Vanhoutte (2010). "Cellular signaling and NO production." Pflugers Arch **459**(6): 807-816.

Mizuno, K., S. Niimura, M. Tani, H. Haga, T. Inagami and S. Fukuchii (1991). "Direct proof for local generation and release of angiotensin II in peripheral human vascular tissue." Am J Hypertens **4**(1 Pt 2): 67S-72S.

Mompeon, A., M. Lazaro-Franco, C. Bueno-Beti, D. Perez-Cremades, X. Vidal-Gomez, E. Monsalve, M. M. Gironacci, C. Hermenegildo and S. Novella (2016). "Estradiol, acting through ERalpha, induces endothelial non-classic renin-angiotensin system increasing angiotensin 1-7 production." Mol Cell Endocrinol **422**: 1-8.

Moncada, S. and A. Higgs (1993). "The L-arginine-nitric oxide pathway." N Engl J Med **329**(27): 2002-2012.

Morello, F., A. Perino and E. Hirsch (2009). "Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system." Cardiovasc Res **82**(2): 261-271.

Nathan, L. and G. Chaudhuri (1997). "Estrogens and atherosclerosis." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 477-515.

Nevzati, E., M. Shafighi, K. D. Bakhtian, H. Treiber, J. Fandino and A. R. Fathi (2015). "Estrogen induces nitric oxide production via nitric oxide synthase activation in endothelial cells." Acta Neurochir Suppl **120**: 141-145.

Nguyen Dinh Cat, A. and R. M. Touyz (2011). "A new look at the renin-angiotensin system--focusing on the vascular system." Peptides **32**(10): 2141-2150.

Nickenig, G., A. T. Baumer, C. Grohe, S. Kahlert, K. Strehlow, S. Rosenkranz, A. Stablein, F. Beckers, J. F. Smits, M. J. Daemen, H. Vetter and M. Bohm (1998). "Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo." Circulation **97**(22): 2197-2201.

Novella, S., A. P. Dantas, G. Segarra, P. Medina and C. Hermenegildo (2012). "Vascular Aging in Women: is Estrogen the Fountain of Youth?" Front Physiol **3**: 165.

Novella, S., A. Laguna-Fernandez, M. Lazaro-Franco, A. Sobrino, C. Bueno-Beti, J. J. Tarin, E. Monsalve, J. Sanchis and C. Hermenegildo (2013). "Estradiol, acting through estrogen receptor alpha, restores dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and nitric oxide production in oxLDL-treated human arterial endothelial cells." Mol Cell Endocrinol **365**(1): 11-16.

Oviedo, P. J., A. Sobrino, A. Laguna-Fernandez, S. Novella, J. J. Tarin, M. A. Garcia-Perez, J. Sanchis, A. Cano and C. Hermenegildo (2011). "Estradiol induces endothelial cell migration and proliferation through estrogen receptor-enhanced RhoA/ROCK pathway." Mol Cell Endocrinol **335**(2): 96-103.

Palmer, R. M., D. S. Ashton and S. Moncada (1988). "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine." Nature **333**(6174): 664-666.

Pang, Y. and P. Thomas (2017). "Additive effects of low concentrations of estradiol-17beta and progesterone on nitric oxide production by human vascular endothelial cells through shared signaling pathways." J Steroid Biochem Mol Biol **165**(Pt B): 258-267.

Pastore, M. B., S. Talwar, M. R. Conley and R. R. Magness (2016). "Identification of Differential ER-Alpha versus ER-Beta Mediated Activation of eNOS In Uterine Artery Endothelial Cells." Biol Reprod.

Paul, M., A. Poyan Mehr and R. Kreutz (2006). "Physiology of local renin-angiotensin systems." Physiol Rev **86**(3): 747-803.

Peiro, C., S. Vallejo, F. Gembardt, V. Azcutia, S. Heringer-Walther, L. Rodriguez-Manas, H. P. Schultheiss, C. F. Sanchez-Ferrer and T. Walther (2007). "Endothelial dysfunction through genetic deletion or inhibition of the G protein-coupled receptor Mas: a new target to improve endothelial function." J Hypertens **25**(12): 2421-2425.

Peiro, C., S. Vallejo, F. Gembardt, E. Palacios, S. Novella, V. Azcutia, L. Rodriguez-Manas, C. Hermenegildo, C. F. Sanchez-Ferrer and T. Walther (2013). "Complete blockade of the vasorelaxant effects of angiotensin-(1-7) and bradykinin in murine microvessels by antagonists of the receptor Mas." J Physiol **591**(9): 2275-2285.

Pendergrass, K. D., N. T. Pirro, B. M. Westwood, C. M. Ferrario, K. B. Brosnihan and M. C. Chappell (2008). "Sex differences in circulating and renal angiotensins of hypertensive mRen(2). Lewis but not normotensive Lewis rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **295**(1): H10-20.

Pingili, A. K., M. Kara, N. S. Khan, A. M. Estes, Z. Lin, W. Li, F. J. Gonzalez and K. U. Malik (2015). "6beta-hydroxytestosterone, a cytochrome P450 1B1 metabolite of testosterone, contributes to angiotensin II-induced hypertension

and its pathogenesis in male mice." Hypertension **65**(6): 1279-1287.

Polderman, K. H., C. D. Stehouwer, G. J. van Kamp, G. A. Dekker, F. W. Verheugt and L. J. Gooren (1993). "Influence of sex hormones on plasma endothelin levels." Ann Intern Med **118**(6): 429-432.

Proudlar, A. J., A. Cooper, M. Whitehead and J. C. Stevenson (2003). "Effects of oestrogen-only and oestrogen-progestogen replacement therapy upon circulating angiotensin I-converting enzyme activity in postmenopausal women." Clin Endocrinol (Oxf) **58**(1): 30-35.

Qaradakhi, T., V. Apostolopoulos and A. Zulli (2016). "Angiotensin (1-7) and Alamandine: Similarities and differences." Pharmacol Res **111**: 820-826.

Raz, A., A. Gamliel-Lazarovich, I. Bogner, A. Strigevsky and S. Keidar (2007). "[The importance of ACE2 in regulating the cardiovascular system]." Harefuah **146**(9): 703-706, 733.

Rees, D. D., R. M. Palmer and S. Moncada (1989). "Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(9): 3375-3378.

Reriani, M. K., L. O. Lerman and A. Lerman (2010). "Endothelial function as a functional expression of cardiovascular risk factors." Biomark Med **4**(3): 351-360.

Rowe, B. P., D. L. Saylor, R. C. Speth and D. R. Absher (1995). "Angiotensin-(1-7) binding at angiotensin II receptors in the rat brain." Regul Pept **56**(2-3): 139-146.

Sampson, A. K., K. M. Moritz and K. M. Denton (2012). "Postnatal ontogeny of angiotensin receptors and ACE2 in male and female rats." Gend Med **9**(1): 21-32.

Santos, R. A. (2014). "Angiotensin-(1-7)." Hypertension **63**(6): 1138-1147.

Santos, R. A., K. B. Brosnihan, D. W. Jacobsen, P. E. DiCorleto and C. M. Ferrario (1992). "Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium." Hypertension **19**(2 Suppl): II56-61.

Santos, R. A., M. J. Campagnole-Santos, N. C. Baracho, M. A. Fontes, L. C. Silva, L. A. Neves, D. R. Oliveira, S. M. Caligorne, A. R. Rodrigues, C. Gropen Junior and et al. (1994). "Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors." Brain Res Bull **35**(4): 293-298.

Santos, R. A., A. C. Simoes e Silva, C. Maric, D. M. Silva, R. P. Machado, I. de Buhr, S. Heringer-Walther, S. V. Pinheiro, M. T. Lopes, M. Bader, E. P. Mendes, V. S. Lemos, M. J. Campagnole-Santos, H. P. Schultheiss, R. Speth and T. Walther (2003). "Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8258-8263.

Sasaki, S., Y. Higashi, K. Nakagawa, H. Matsuura, G. Kajiyama and T. Oshima (2001). "Effects of angiotensin-(1-7) on forearm circulation in normotensive subjects and patients with essential hypertension." Hypertension **38**(1): 90-94.

Satake, A., M. Takaoka, M. Nishikawa, M. Yuba, Y. Shibata, K. Okumura, K. Kitano, H. Tsutsui, K. Fujii, S. Kobuchi, M. Ohkita and Y. Matsumura (2008). "Protective effect of 17beta-estradiol on ischemic acute renal failure through the PI3K/Akt/eNOS pathway." Kidney Int **73**(3): 308-317.

Schiavone, M. T., R. A. Santos, K. B. Brosnihan, M. C. Khosla and C. M. Ferrario (1988). "Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(11): 4095-4098.

Schwager, S. L., A. K. Carmona and E. D. Sturrock (2006). "A high-throughput fluorimetric assay for angiotensin I-converting enzyme." Nat Protoc **1**(4): 1961-1964.

Seely, E. W., K. B. Brosnihan, X. Jeunemaitre, K. Okamura, G. H. Williams, N. K. Hollenberg and D. M. Herrington (2004). "Effects of conjugated oestrogen and droloxifene on the renin-angiotensin system, blood pressure and renal blood flow in postmenopausal women." Clin Endocrinol (Oxf) **60**(3): 315-321.

Shenoy, V., J. L. Grobe, Y. Qi, A. J. Ferreira, R. A. Fraga-Silva, G. Collamat, E. Bruce and M. J. Katovich (2009). "17beta-Estradiol modulates local cardiac renin-angiotensin system to prevent cardiac remodeling in the DOCA-salt model of hypertension in rats." Peptides **30**(12): 2309-2315.

Simoncini, T., E. Rabkin and J. K. Liao (2003). "Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(2): 198-203.

Skeggs, L. T., Jr., J. R. Kahn and N. P. Shumway (1956). "The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme." J Exp Med **103**(3): 295-299.

Sluimer, J. C., J. M. Gasc, I. Hamming, H. van Goor, A. Michaud, L. H. van den Akker, B. Jutten, J. Cleutjens, A. P. Bijmens, P. Corvol, M. J. Daemen and S. Heeneman (2008). "Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and activity in human carotid atherosclerotic lesions." J Pathol **215**(3): 273-279.



Snyder, S. H. and S. R. Jaffrey (1999). "Vessels vivified by Akt acting on NO synthase." Nat Cell Biol **1**(4): E95-96.

Sobrinho, A. (2011). Nuevas rutas de expresión reguladas por estradiol en células endoteliales humanas., Medicine university of Valencia.

Sobrinho, A., M. Mata, A. Laguna-Fernandez, S. Novella, P. J. Oviedo, M. A. Garcia-Perez, J. J. Tarin, A. Cano and C. Hermenegildo (2009). "Estradiol stimulates vasodilatory and metabolic pathways in cultured human endothelial cells." PLoS One **4**(12): e8242.

Sobrinho, A., P. J. Oviedo, S. Novella, A. Laguna-Fernandez, C. Bueno, M. A. Garcia-Perez, J. J. Tarin, A. Cano and C. Hermenegildo (2010). "Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor- $\{\alpha\}$ ." J Mol Endocrinol **44**(4): 237-246.

Su, J., D. I. Palen, H. Boulares and K. Matrougui (2008). "Role of ACE/AT2R complex in the control of mesenteric resistance artery contraction induced by ACE/AT1R complex activation in response to Ang I." Mol Cell Biochem **311**(1-2): 1-7.

Te Riet, L., J. H. van Esch, A. J. Roks, A. H. van den Meiracker and A. H. Danser (2015). "Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations." Circ Res **116**(6): 960-975.

Thompson, L. P., G. Pinkas and C. P. Weiner (2000). "Chronic 17beta-estradiol replacement increases nitric oxide-mediated vasodilation of guinea pig coronary microcirculation." Circulation **102**(4): 445-451.

Tipnis, S. R., N. M. Hooper, R. Hyde, E. Karran, G. Christie and A. J. Turner (2000). "A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase." J Biol Chem **275**(43): 33238-33243.

Tonnaer, J. A., G. M. Engels, V. M. Wiegant, J. P. Burbach, W. De Jong and D. De Wied (1983). "Proteolytic conversion of angiotensins in rat brain tissue." Eur J Biochem **131**(2): 415-421.

Tostes, R. C., D. Nigro, Z. B. Fortes and M. H. Carvalho (2003). "Effects of estrogen on the vascular system." Braz J Med Biol Res **36**(9): 1143-1158.

Toth, B., G. Saadat, A. Geller, C. Scholz, S. Schulze, K. Friese and U. Jeschke (2008). "Human umbilical vascular endothelial cells express estrogen receptor beta (ERbeta) and progesterone receptor A (PR-A), but not ERalpha and PR-B." Histochem Cell Biol **130**(2): 399-405.

Tozzi-Ciancarelli, M. G., M. Penco and C. Di Massimo (2002). "Influence of acute exercise on human platelet responsiveness:

possible involvement of exercise-induced oxidative stress." Eur J Appl Physiol **86**(3): 266-272.

Van Keulen, H. V., A. S. Gomes, M. C. Toffolo, E. E. Oliveira, L. C. Silva, C. C. Alves, C. S. Almeida, S. C. Dutra, A. S. Aguiar and A. P. Ferreira (2017). "Serum levels of nitric oxide and cytokines in smokers at the beginning and after 4months of treatment for smoking cessation." Int J Cardiol **230**: 327-331.

Vilas-Boas, W. W., A. Ribeiro-Oliveira, Jr., R. M. Pereira, C. Ribeiro Rda, J. Almeida, A. P. Nadu, A. C. Simoes e Silva and R. A. dos Santos (2009). "Relationship between angiotensin-(1-7) and angiotensin II correlates with hemodynamic changes in human liver cirrhosis." World J Gastroenterol **15**(20): 2512-2519.

Villalobos, J., Figueira, L., and VL Colina. (2009). Sistema Renina Angiotensina Renal: El papel de la Angiotensina 1-7 y la Enzima Convertidora de Angiotensina 2 en el riñón. Thesis/Dissertation Thesis/Dissertation.

Villard, E., A. Alonso, M. Agrapart, M. Challah and F. Soubrier (1998). "Induction of angiotensin I-converting enzyme transcription by a protein kinase C-dependent mechanism in human endothelial cells." J Biol Chem **273**(39): 25191-25197.

Villela, D., J. Leonhardt, N. Patel, J. Joseph, S. Kirsch, A. Hallberg, T. Unger, M. Bader, R. A. Santos, C. Sumners and U.

M. Steckelings (2015). "Angiotensin type 2 receptor (AT2R) and receptor Mas: a complex liaison." Clin Sci (Lond) **128**(4): 227-234.

Wagner, C. K., J. L. Pfau, G. J. De Vries and I. J. Merchenthaler (2001). "Sex differences in progesterone receptor immunoreactivity in neonatal mouse brain depend on estrogen receptor alpha expression." J Neurobiol **47**(3): 176-182.

Wakasugi, M., T. Noguchi, Y. I. Kazama, Y. Kanemaru and T. Onaya (1989). "The effects of sex hormones on the synthesis of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) by vascular tissues." Prostaglandins **37**(4): 401-410.

Wakeling, A. E., M. Dukes and J. Bowler (1991). "A potent specific pure antiestrogen with clinical potential." Cancer Res **51**(15): 3867-3873.

Wingrove, C. S., E. Garr, J. H. Pickar, M. Dey and J. C. Stevenson (1999). "Effects of equine oestrogens on markers of vasoactive function in human coronary artery endothelial cells." Mol Cell Endocrinol **150**(1-2): 33-37.

Wu, Z., W. Zheng and K. Sandberg (2003). "Estrogen regulates adrenal angiotensin type 1 receptors by modulating adrenal angiotensin levels." Endocrinology **144**(4): 1350-1356.

Xu, X., J. C. Xiao, L. F. Luo, S. Wang, J. P. Zhang, J. J. Huang, M. L. Liu, C. G. Liu, K. Q. Xu, Y. J. Li and H. P. Song (2008). "Effects of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on the renin-angiotensin system, blood pressure, and endothelial ultrastructure." Int J Cardiol **130**(2): 196-204.

Xue, B., Z. Zhang, T. G. Beltz, F. Guo, M. Hay and A. K. Johnson (2014). "Estrogen regulation of the brain renin-angiotensin system in protection against angiotensin II-induced sensitization of hypertension." Am J Physiol Heart Circ Physiol **307**(2): H191-198.

Yamaleyeva, L. M., S. Gilliam-Davis, I. Almeida, K. B. Brosnihan, S. H. Lindsey and M. C. Chappell (2012). "Differential regulation of circulating and renal ACE2 and ACE in hypertensive mRen2.Lewis rats with early-onset diabetes." Am J Physiol Renal Physiol **302**(11): F1374-1384.

Yang, J., N. Matsukawa, H. Rakugi, M. Imai, I. Kida, M. Nagai, J. Ohta, K. Fukuo, Y. Nabeshima and T. Ogihara (2003). "Upregulation of cAMP is a new functional signal pathway of Klotho in endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **301**(2): 424-429.

Yang, R. F., J. X. Yin, Y. L. Li, M. C. Zimmerman and H. D. Schultz (2011). "Angiotensin-(1-7) increases neuronal potassium current via a nitric oxide-dependent mechanism." Am J Physiol Cell Physiol **300**(1): C58-64.

Yayama, K., N. Kunimatsu, Y. Teranishi, M. Takano and H. Okamoto (2003). "Tissue kallikrein is synthesized and secreted by human vascular endothelial cells." Biochim Biophys Acta **1593**(2-3): 231-238.

Young, D., G. Waitches, C. Birchmeier, O. Fasano and M. Wigler (1986). "Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains." Cell **45**(5): 711-719.

Yung, L. M., W. T. Wong, X. Y. Tian, F. P. Leung, L. H. Yung, Z. Y. Chen, X. Yao, C. W. Lau and Y. Huang (2011). "Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats." PLoS One **6**(3): e17437.

Zapater, P., J. Novalbos, S. Gallego-Sandin, F. T. Hernandez and F. Abad-Santos (2004). "Gender differences in angiotensin-converting enzyme (ACE) activity and inhibition by enalaprilat in healthy volunteers." J Cardiovasc Pharmacol **43**(5): 737-744.

Zhang, F., J. Liu, S. F. Li, J. X. Song, J. Y. Ren and H. Chen (2015). "Angiotensin-(1-7): new perspectives in atherosclerosis treatment." J Geriatr Cardiol **12**(6): 676-682.

Zhao, L., K. O'Neill and R. D. Brinton (2006). "Estrogenic agonist activity of ICI 182,780 (Faslodex) in hippocampal neurons: implications for basic science understanding of

estrogen signaling and development of estrogen modulators with a dual therapeutic profile." J Pharmacol Exp Ther **319**(3): 1124-1132.

Zheng, J. L., G. Z. Li, S. Z. Chen, J. J. Wang, J. E. Olson, H. J. Xia, E. Lazartigues, Y. L. Zhu and Y. F. Chen (2014). "Angiotensin converting enzyme 2/Ang-(1-7)/mas axis protects brain from ischemic injury with a tendency of age-dependence." CNS Neurosci Ther **20**(5): 452-459.

Zimmerman, M. A., R. A. Budish, S. Kashyap and S. H. Lindsey (2016). "GPER-novel membrane oestrogen receptor." Clin Sci (Lond) **130**(12): 1005-1016.

## **9. ANEXO**







Contents lists available at ScienceDirect

## Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mce](http://www.elsevier.com/locate/mce)Estradiol, acting through ER $\alpha$ , induces endothelial non-classic renin-angiotensin system increasing angiotensin 1–7 production

Ana Mompeón<sup>a</sup>, Macarena Lázaro-Franco<sup>a</sup>, Carlos Bueno-Betí<sup>a</sup>, Daniel Pérez-Cremades<sup>a</sup>, Xavier Vidal-Gómez<sup>a</sup>, Elena Monsalve<sup>a</sup>, Mariela M. Gironacci<sup>b</sup>, Carlos Hermenegildo<sup>a,\*</sup>, Susana Novella<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Physiology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Valencia and INCLIVA Biomedical Research Institute, Valencia, Spain

<sup>b</sup> Departament de Química Biològica, IQUIFIB-CONICET, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 April 2015

Received in revised form

29 September 2015

Accepted 2 November 2015

Available online 11 November 2015

## Keywords:

Angiotensin converting enzymes

Endothelial cell

Estrogen

Estrogen receptor

Renin angiotensin system

## ABSTRACT

Intracellular renin-angiotensin system (RAS) can operate independently of the circulating RAS. Estrogens provide protective effects by modulating the RAS. Our aim was to investigate the effect of estradiol (E2) on angiotensin converting enzymes (ACE) 1 and ACE2 expression and activities in human endothelial cells (HUVEC), and the role of estrogen receptors (ER). The results confirmed the presence of active intracellular RAS in HUVEC. Physiological concentrations of E2 induced a concentration-dependent increase of ACE1 and ACE2 mRNA expression and ACE1, but not ACE2, protein levels. ACE1 and ACE2 enzymatic activities were also induced with E2. These effects were mediated through ER $\alpha$  activation, since ER antagonists ICI 182780 and MPP completely abolished the effect of E2. Moreover, the ER $\alpha$  agonist PPT mirrored the E2 effects on ACE1 and ACE2 protein expression and activity. Exposure of endothelial cells to E2 significantly increased Ang-(1–7) production. In conclusion, E2 increases Ang-(1–7) production, through ER $\alpha$ , involving increased ACE1 and ACE2 mRNA expression and activity and ACE1 protein levels.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Renin-angiotensin system (RAS) is a signaling pathway responsible for regulation of extracellular fluid homeostasis and therefore, for the maintaining of blood pressure. The substrate of the circulating system, angiotensinogen, is secreted by the liver and is enzymatically cleaved to angiotensin I (Ang I) by kidney-derived renin. Ang I is then cleaved by angiotensin converting enzyme 1 (ACE1) to the main effector peptide Angiotensin II (Ang II) (Griendling et al., 1993). Ang II effects are mediated through receptor type 1 (AT1R), which is involved in the classical vasoconstrictor and remodeling effects, and Ang II receptor type 2 (AT2R) with opposing effects (Dinh et al., 2001; Montezano et al., 2014). In addition to these classical RAS components, Ang II can also be degraded by angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) to the biologically active vasodilator peptide Angiotensin 1–7 (Ang-(1–7))

(Chappel and Ferrario, 2006). Thus, ACE2 counteracts the classical RAS activity towards vasodilator pathway (Crackower et al., 2002; Lovren et al., 2008).

In addition to this circulating RAS, their components are also synthesized and act locally in multiple organs and tissues, some of which are directly involved in cardiovascular regulation, like heart and vessels (Nguyen Dinh Cat and Touyz, 2011). All the RAS components are expressed in the vascular wall, except renin which is taken up from the circulation (te Riet et al., 2015). Therefore tissue RAS can operate independently of the circulating RAS, contributing to a fine-tuning of vascular tone and arterial structure. Also, tissue RAS may amplify the vascular effects of the circulating RAS in disease states such as hypertension (Nguyen Dinh Cat and Touyz, 2011).

Several studies have demonstrated an interaction between the RAS and sex hormones in regulating cardiovascular function and blood pressure (Maric-Bilkan and Manigrasso, 2012). This interaction has been described mainly at the endothelial level, where the classical types of estrogen receptors (ER), ER $\alpha$ , ER $\beta$  are expressed (Kim et al., 2014; Mendelsohn, 2002). Estrogens provide vascular protective effects as promotes vasodilation and decreases

\* Corresponding author. Department of Physiology, Faculty of Medicine and Odontology, Av. Blasco Ibañez, 15, E 46010, Valencia, Spain.

E-mail address: [carlos.hermenegildo@uv.es](mailto:carlos.hermenegildo@uv.es) (C. Hermenegildo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.11.004>

0303-7207/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

inflammation and atherosclerosis. The estrogenic effect in the vasculature is so far postulated as one of the main drivers behind the beneficial cardiovascular profile of pre-menopausal women (Prabhushankar et al., 2014).

Wealth of evidence shows that estrogens provide protective effects by modulating the RAS. In addition, sex differences in the expression of RAS components have been identified (Sullivan, 2008; Xue et al., 2014).

Our group previously reported estradiol (E2) effects on the endothelial gene expression profile (Sobrinho et al., 2009), demonstrating a significant increase in ACE1 mRNA expression in E2 treated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). We hypothesized that estradiol may modify local RAS through modification of the endothelial expression and activity of ACE1 and/or ACE2. Therefore, the aims of the present work were to determine the effect of physiological E2 concentrations on ACE1 and ACE2 expression and activities, and on Ang II and Ang-(1–7) production in HUVEC, delving also in the role of classical ER on the observed effects.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell culture and experimental design

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were isolated from umbilical cord veins by means of collagenase digestion procedure as previously described (Sobrinho et al., 2010). HUVEC were grown in Medium 199 (Sigma–Aldrich, Tres Cantos, Madrid, Spain) supplemented with 20% fetal bovine serum (GIBCO, Invitrogen, Barcelona, Spain), endothelial cell growth supplement from bovine neural tissue (ECGS, Sigma–Aldrich) and heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa (Sigma–Aldrich). Cells were routinely grown in an incubator at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>.

When cells from passages 3 to 5 were at 90% confluence, culture medium was exchanged for a phenol red-free Medium 199 (GIBCO) supplemented with 2% charcoal/dextran-treated fetal bovine serum (GIBCO), ECGS, pyruvic acid and antibiotics (“hormone free medium”) to avoid any estrogenic activity and maintained for 24 h.

Cells were exposed for 24 h to 1–10 nmol/l of 17β-estradiol (Sigma–Aldrich), the selective ER $\alpha$  agonist 4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trispheanol (PPT, 10 nmol/l; Tocris Bioscience, Ellisville, MI, USA), or the selective ER $\beta$  agonist 2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile (DPN, 10 nmol/l; Tocris Bioscience). In another set of experiments, the ER unspecific antagonist ICI 162780 (1  $\mu$ mol/l; Biogen, Madrid, Spain) or the specific ER $\alpha$  antagonist methyl-piperidino-pyrazole (MPP) (1  $\mu$ mol/l; Tocris Bioscience), were added 30 min before E2 to evaluate whether the observed effects elicited by E2 were mediated by ER.

This investigation conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki, was approved by the Ethical Committee of Clinical Research of the INCLIVA, Hospital Clínico de Valencia, Spain, and written informed consent was obtained from all donors.

### 2.2. RNA isolation and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) assay

Total RNA was extracted by using TRIzol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Reverse transcription was carried out using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) by using a personal Mastercycler Eppendorf Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). One microgram of total RNA was reverse transcribed to cDNA following the manufacturer's instructions. The qRT-PCR data for ACE1, ACE2 and GAPDH (endogenous control) were obtained with TaqMan assays (Hs00174179\_m1, Hs01085333\_m1 and Hs99999905\_m1 respectively) performed with TaqMan Universal

Mastermix (Applied Biosystems). Data were analyzed with the SDS 2.2.2 software (Applied Biosystems).

### 2.3. Immunoblotting

Treated HUVEC were collected in RIPA buffer (Sigma–Aldrich) containing protease inhibitors (complete ULTRA Tablets, Roche Diagnostics, Madrid, Spain). Protein content was measured and samples were frozen at –20 °C until assay. Equal amounts of protein were then separated by 7.5% of SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis. Protein was then transferred to nitrocellulose membranes (Whatman, GE Healthcare Life Sciences). Immunostaining was achieved using specific antibodies anti-ACE1 (ab11734; Abcam, Cambridge, United Kingdom), and anti-ACE2 (sc-20998; Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Germany). Development was performed with anti-mouse and anti-rabbit peroxidase-linked antibodies (Santa Cruz Biotechnology), followed with Supersignal Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific Inc.). Signal density was analyzed with ImageJ software (NIH Image, NIH, Bethesda, USA). Beta-actin (Sigma–Aldrich) was used as internal control of the amount of protein.

### 2.4. ACE1 activity assay

Treated HUVEC were suspended in ACE1 reaction buffer (K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mmol/l, NaCl 300 mmol/l) plus 0.5% Triton X-100. Suspensions were sonicated on ice, maintained for 15 min in ice and then centrifuged at 16000 $\times$  g for 5 min at 4 °C, using the cell lysate supernatant. ACE1 activity was measured by a modification of the method described earlier (Schwager et al., 2006). Briefly, ACE1 activity was assayed by measuring the hydrolysis of ACE1 substrate N-Hippuryl-His-Leu hydrate (Sigma–Aldrich) after 2 h of incubation at 37 °C. The reaction was stopped with 0.28 mol/l NaOH. The absorbance readings of different His-Leu (Sigma–Aldrich) concentrations, used as standard, were plotted as linear regression graph. ACE1 activity of the samples was obtained by interpolation the absorbance readings of samples with the standards. Lisinopril (100  $\mu$ mol/l, Sigma–Aldrich) was used as a negative control for ACE1 activity. The substrate hydrolysis was measured (excitation wavelength 360 nm and emission 485 nm) in a spectrofluorimeter SpectraMax Gemini XPS with Softmax Pro 6.2.2 software (Molecular Devices, Wokingham, UK). Results were expressed as nmol per minute and per mg of sample.

### 2.5. ACE2 activity assay

Treated HUVEC were collected in ACE2 reaction buffer (NaCl 1 mol/l, ZnCl<sub>2</sub> 0.5 mmol/l, TrisHCl 75 mmol/l) plus 0.5% Triton X-100. Suspensions were sonicated on ice, maintained for 15 min in ice and then centrifuged at 16000 $\times$  g for 5 min at 4 °C. ACE2 activity was measured in the supernatant by a modification of the method described earlier (Guy et al., 2003). Briefly, the assay is based on the use of the fluorogenic peptide substrate Mca-APK(Dnp) (Enzo Life Sciences, New York, USA). ACE2 removes the Dnp group that quenches the Mca fluorescence resulting in an increase in fluorescence in the presence of ACE2 activity at excitation and emission wavelengths of 328 and 393 nm, respectively. The change in fluorescence was monitored continuously for 4 h using a spectrofluorimeter SpectraMax Gemini XPS with Softmax Pro 6.2.2 software (Molecular Devices). Specific ACE2 activity was calculated by subtracting the activity in the presence of 1  $\mu$ mol/l DX600 (Phoenix Pharmaceuticals, Karlsruhe, Germany), a specific ACE2 inhibitor (Huang et al., 2003), from the total activity. Specific ACE2 activity was expressed as nmol of substrate converted to product per minute and per mg of sample. Standard curves are generated using

0–50  $\mu\text{mol/l}$  of the fluorogenic substrate OmnimMP (Enzo Life Sciences).

### 2.6. Ang II and Ang-(1–7) detection by immunofluorescence

Treated HUVEC were fixed by incubating in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min. To block nonspecific reactions, 1% BSA in phosphate-buffered saline containing 0.2% Triton was added for 30 min. Cells were incubated with anti-Ang-(1–7) polyclonal antibody developed as previously described (Lopez Verrilli et al., 2009), and anti-Ang II (Bachem, Saint Helens, UK) overnight at 4 °C. Cells were then incubated with IgG FITC conjugate (Sigma–Aldrich) and IgG Texas Red conjugate (Abcam) for 1 h at room temperature. In both cases, negative controls were obtained after exposure to secondary antibodies, without anti-Ang-(1–7) or anti-Ang II antibodies. DAPI (BioLegend, San Diego, CA, USA) was used for DNA specific nuclear staining. Microscopic observation was performed with spectral confocal microscope Leica TCS SP2. Pictures were taken with a 40 $\times$  objective and shown at  $\times$ 400 magnification. Confocal images were quantified with ImageJ software.

### 2.7. Statistical analysis

Values shown in the text and figures are mean  $\pm$  Standard Error of Mean (SEM) from data obtained in 6–9 independent experiments. ANOVA test was applied for comparisons of mean, and then Bonferroni's test was performed. P values < 0.05 were considered significant. The statistical analysis was carried out using the Prism 6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 3. Results

### 3.1. E2 increased ACE1 and ACE2 mRNA expression through ER $\alpha$

To study the role of E2 on endothelial intracellular RAS, we first checked the effect of E2 on ACE1 and ACE2 mRNA expression in HUVEC. Exposure of endothelial cells to two different, physiological and near-physiological concentrations of E2 (1 and 10 nmol/l respectively) for 24 h, resulted in a concentration-dependent increase of both ACE1 (Fig. 1A) and ACE2 (Fig. 1B) mRNA expression, with a maximum of expression for 10 nmol/l of E2 in both cases.

To test whether the increased ACE1 and ACE2 mRNA expression induced by E2 was mediated through ER, HUVEC were exposed to the unspecific ER antagonist ICI 182780 (1  $\mu\text{mol/l}$ ) and specific ER $\alpha$  antagonist MPP (1  $\mu\text{mol/l}$ ). Blockade of ER completely abolished the increment in ACE1 and ACE2 mRNA induced by estradiol (Fig. 1A and B), suggesting a role of ER $\alpha$  in mediating responses of estradiol in endothelial RAS. Neither ICI 182780 nor MPP had effects on gene expression of ACE1 and ACE2.

### 3.2. Estradiol increased ACE1 but not ACE2 protein expression

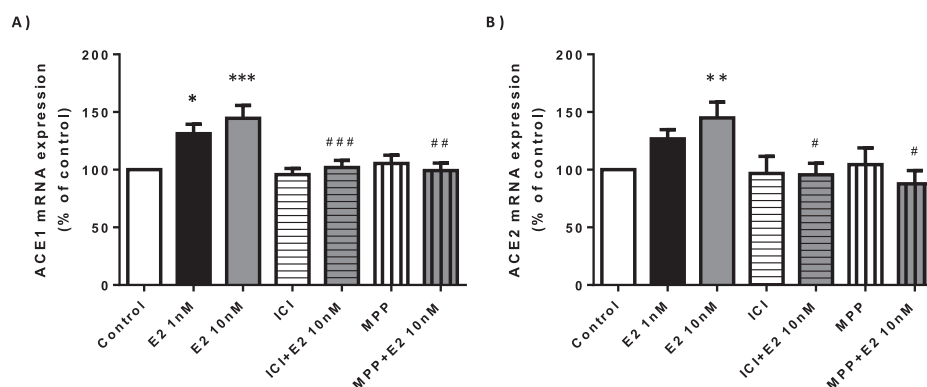
HUVEC expressed both ACE1 and ACE2 proteins, as demonstrated by western blot analysis (Fig. 2). However, only the increase in mRNA ACE1 was accompanied by an increment in the amount of ACE1 protein. Exposure to 10 nmol/l E2 increased ACE1 protein expression by 25% above control values (\*p < 0.05 vs. control, Fig. 2A). These effects were mediated through ER activation, specifically through ER $\alpha$ , since the treatment of cells with ICI 182780 and MPP completely reverted the effect of E2 (Fig. 2A). On the contrary, ACE2 protein expression remained unaltered after E2 exposure and/or treatment with ER antagonists (Fig. 2B).

### 3.3. E2 increased ACE1 and ACE2 enzymatic activity through selective ER $\alpha$ activation

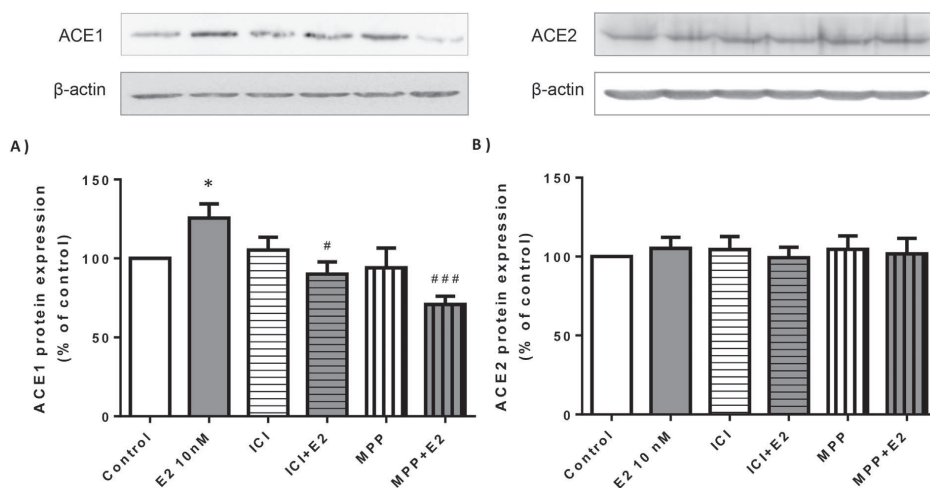
Since E2-treated HUVEC presented an increased ACE1 and ACE2 expression, we further investigated whether ACEs activity was also modified by E2 treatment. In control conditions, HUVEC enzymatic activities for ACE1 and ACE2 were  $0.66 \pm 0.15$  and  $0.014 \pm 0.002$  nmol/min  $\times$  mg protein, respectively. Treatment with E2 (1 and 10 nmol/l) for 24 h, resulted in a concentration-dependent increase of ACE1 and ACE2 enzymatic activities up to  $203 \pm 26$  and  $180 \pm 19$  of control values respectively (\*\*p < 0.01 vs. control) (Fig. 3). The increase in ACE1 and ACE2 activities induced by E2 was completely prevented by ICI 182780 and MPP, suggesting the involvement of ER $\alpha$  in the effect elicited by E2.

### 3.4. The ER $\alpha$ selective agonist mimics the E2 effects on ACE1 and ACE2 protein expression and enzymatic activity

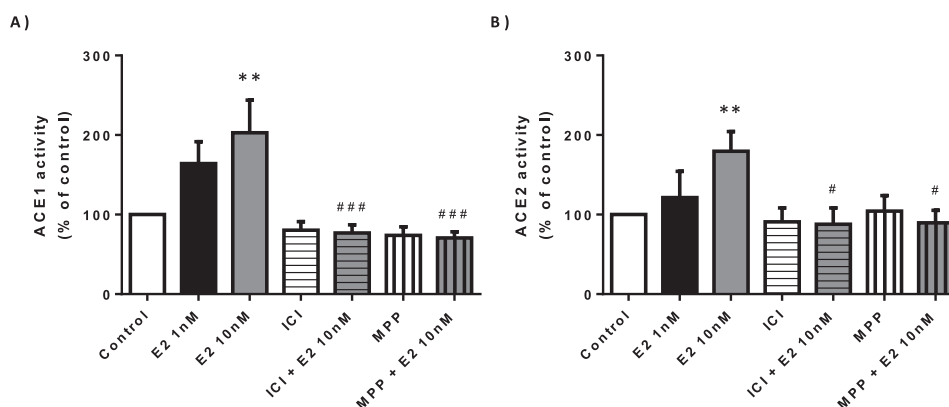
To reinforce the role of ER $\alpha$  on the E2-induced effects, a set of experiments were performed with the selective ER $\alpha$  agonist, PPT,



**Fig. 1.** ACE1 and ACE2 mRNA expression. HUVEC were exposed to 1–10 nmol/l E2, ER antagonist ICI (1  $\mu\text{mol/l}$ ) and/or ER $\alpha$  antagonist MPP (1  $\mu\text{mol/l}$ ) for 24 h. ACE1 (A) and ACE2 (B) mRNA levels were assessed by qRT-PCR. Data are expressed as the percentage of the control values and presented as mean  $\pm$  SEM of n = 6–8 from 3 to 4 independent experiments. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001 vs. control; #p < 0.05, ##p < 0.01 and ###p < 0.001 vs. E2 10 nmol/l alone.



**Fig. 2.** ACE1 and ACE2 protein expression in HUVEC. Cells were exposed to 10 nmol/l E2, ER antagonist ICI (1  $\mu$ mol/l) and ER $\alpha$  antagonist MPP (1  $\mu$ mol/l) for 24 h, and protein expression of ACE1 (A) and ACE2 (B) was measured by immunoblotting. A typical immunoblotting image and relative levels assessed by densitometry of bands of 160 kDa (ACE1) or 90 kDa (ACE2) are presented. Data are expressed as the percentage of the control values and presented as mean  $\pm$  SEM of  $n = 6-8$ . \* $p < 0.05$  vs. control; # $p < 0.05$  and ### $p < 0.001$  vs. E2 10 nmol/l alone.



**Fig. 3.** ACE1 and ACE2 enzymatic activity in HUVEC. Cells were exposed to 1–10 nmol/l E2, ER antagonist ICI (1  $\mu$ mol/l) and/or ER $\alpha$  antagonist MPP (1  $\mu$ mol/l) for 24 h. ACE1 (A) and ACE2 (B) specific activity was measured by spectrofluorimetry as described in [Materials and methods](#). Data are expressed as the percentage of the control values and presented as mean  $\pm$  SEM of  $n = 6-9$  from 3 to 4 independent experiments. \*\* $p < 0.01$  vs. control; # $p < 0.05$  and ### $p < 0.001$  vs. E2 10 nmol/l alone.

and the selective ER $\beta$  agonist, DPN. Exposure to 10 nM PPT, but not 10 nM DPN, stimulate ACE1 protein expression to the same extent than E2, without changes on ACE2 protein expression (Fig. 4A and B). PPT also reproduce the effect of E2 on ACE1 and ACE2 activities, whereas DPN did not change these enzymatic activities (Fig. 4C and D). These results strengthen the role of ER $\alpha$  on the increased ACE1 protein expression and the enhanced ACE1 and ACE2 enzymatic activities induced by E2.

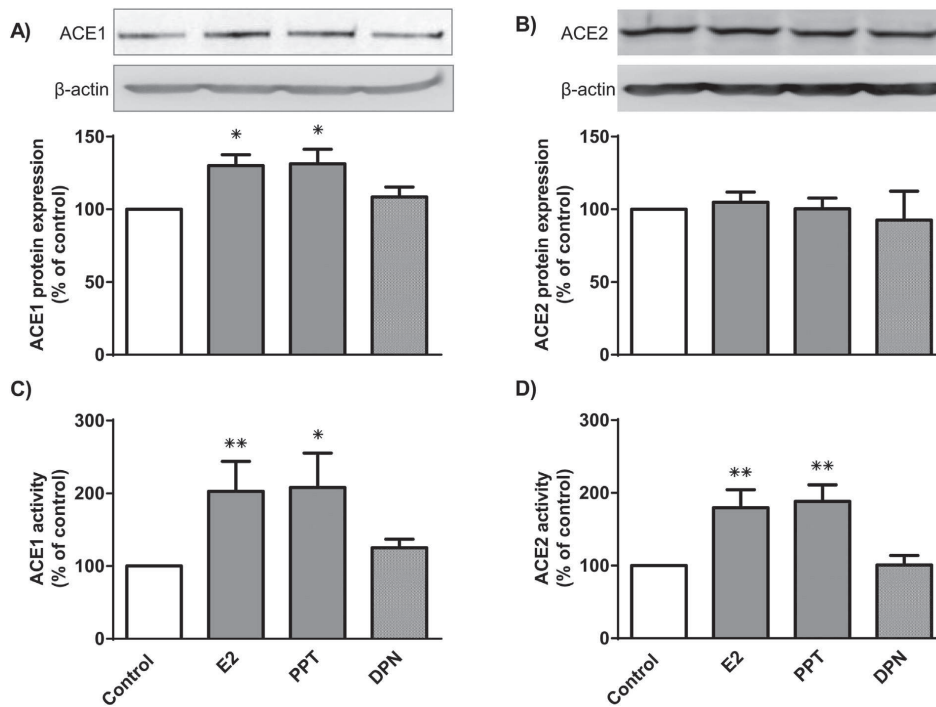
### 3.5. E2 increased Ang-(1–7) production in HUVEC

We next evaluated the E2 treatment on Ang II and Ang-(1–7)

levels in HUVEC. Although Ang II levels were detected in HUVEC (Fig. 5A), and were above the negative control, quantification demonstrated there were no differences on Ang II production between E2-treated and control cells (Fig. 5B). The exposure to ICI or MPP, alone or in the presence of E2, did not modify the Ang II levels.

Exposure of endothelial cells to E2 10 nmol/l significantly increased Ang-(1–7) production (Fig. 6A and B). Since the treatment of endothelial cells with ICI 182780 and MPP completely reverted the effect of E2, the E2 increased Ang-(1–7) production was mediated through ER $\alpha$ .

The presence of an ACE1 inhibitor (Lisinopril) prevented the increase in Ang-(1–7) levels induced by E2 treatment. These results



**Fig. 4.** ER $\alpha$  and ER $\beta$  agonists effects on ACE1 and ACE2 protein expression and enzymatic activity in HUVEC. Cells were exposed to 10 nmol/l E2, ER $\alpha$  agonist PPT (10 nmol/l) or the ER $\beta$  agonist DPN (10 nmol/l) for 24 h. The protein expression of ACE1 (A) and ACE2 (B) was measured by immunoblotting. A typical immunoblotting image and relative levels assessed by densitometry of bands of 160 kDa (ACE1) or 90 kDa (ACE2) are presented. The ACE1 (C) and ACE2 (D) specific activity was measured by spectrofluorimetry as described in [Materials and methods](#). Data are expressed as the percentage of the control values and presented as mean  $\pm$  SEM of  $n = 3-6$ . \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  vs. control.

suggest that in response to E2 in endothelial cells, RAS is shifted towards an Ang-(1–7) production, and depends on both ACE1 and ACE2 activities.

#### 4. Discussion

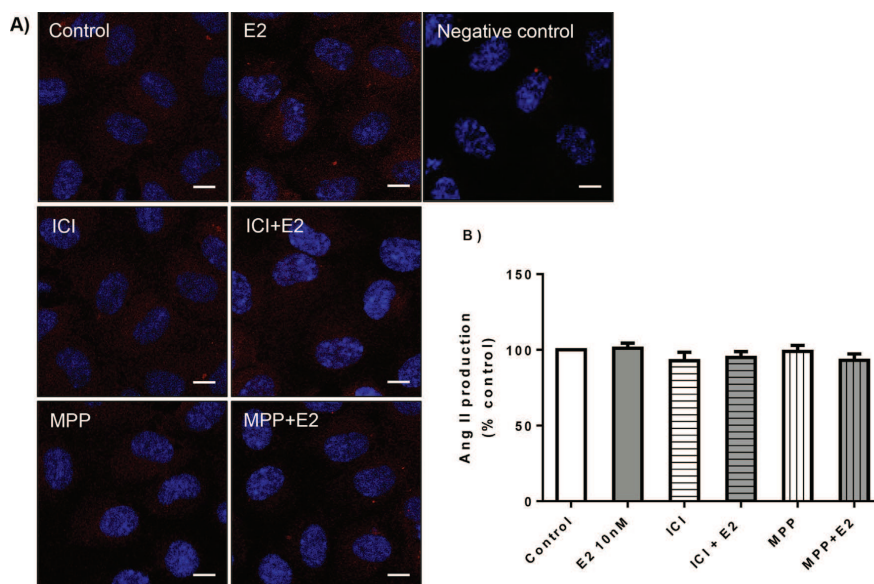
In the present study, we demonstrated that physiological concentrations of E2 increase Ang-(1–7) levels through ER $\alpha$  stimulation in HUVEC. Furthermore, E2 treatment rises ACE1 and ACE2 mRNA levels and activities, increases ACE1 but not ACE2 protein expression, and these facts may explain the increased Ang-(1–7) levels in these cells. The main results obtained in the present study are schematized in [Fig. 7](#).

The results confirm the active presence of intracellular RAS in endothelial cells, confirming the vascular wall not only as an effector organ for the circulating RAS, but as a local RAS operating independently ([Paul et al., 2006](#)).

E2 increased ACE1 mRNA expression and activity in a concentration-dependent manner. In addition, E2 augmented ACE1 protein expression. These results confirm our previous studies showing gene expression analysis of E2-estimated human endothelial cells ([Sobrinho et al., 2009](#)). In that study, ACE1 mRNA expression was significantly increased by E2, without changes in other RAS proteins, such as angiotensinogen, cathepsin, or chymase 1. Moreover, angiotensin receptor 1 and 2 or Mas receptor expressions remained also unaltered ([Sobrinho et al., 2009](#)). In spite of

the lack of studies in endothelial cells, several studies on vascular and systemic RAS suggest that estrogens decrease ACE1 activity. Plasma ACE1 activity is higher in males, both in humans ([Zapater et al., 2004](#)) and mice ([Lim et al., 2002](#)). Moreover, estrogen replacement therapy decrease circulating ACE1 activity in healthy postmenopausal women ([Prouder et al., 2003](#)) and in ovariectomized rats ([Gallagher et al., 1999](#)). In the vascular wall, experimental studies demonstrated an increased ACE1 expression in ovariectomized rats, which was prevented after estrogen administration ([Gallagher et al., 1999](#); [Yung et al., 2011](#)). In other tissues, however, ACE1 expression activity was higher in females, as in rat renal cortex ([Bhatia et al., 2013](#)). Differences between male and female could be attributed to a higher stimulation of ACE1 activity due to androgens, as it has been demonstrated in men, in which testosterone increases ACE1 activity ([Pingili et al., 2015](#)) or even in women suffering polycystic ovary syndrome, in which high androgens are related to high ACE1 activity ([Arefi et al., 2013](#)). Discrepancies between our data on E2-exposed HUVEC and data obtained from estrogen replacement therapy experiments could be explained by a counterbalance between circulating and local RAS, or even between a different regulation of smooth muscle cells and endothelium physiology by E2.

In our study, E2 also increased ACE2 mRNA expression and stimulated its activity in a concentration-dependent manner. Surprisingly, the ACE2 protein expression did not appear increased in immunoblotting analysis. 24 h is enough time to translation, but



**Fig. 5.** Ang II levels in HUVEC. (A) Representative confocal images of Ang II production in HUVEC. Cells were exposed to E2 (10 nmol/l) alone or in combination with ER antagonist ICI (1  $\mu$ mol/l), ER $\alpha$  antagonist MPP (1  $\mu$ mol/l) for 24 h. DNA specific nuclear staining (DAPI) is shown in blue. Red color (Texas Red) represents Ang II production. Negative control represents the background of secondary antibody. (B) Ang II expression quantification of confocal images in HUVEC. Data are expressed as the percentage of the control values and presented as mean  $\pm$  SEM. The experiment was performed in 4–6 duplicate experiments. Scale bar represents 10  $\mu$ m (original magnification  $\times$ 400). (For interpretation of the references to color in this figure caption, the reader is referred to the web version of this article.)

a longer time of analysis could be resulted in increased ACE2 protein expression. Alternatively, the translation of ACE2 mRNA on protein could be down-regulated by E2, directly due to increased ACE2 activity of increased Ang-(1–7) production. The increased activity of ACE2 without increased protein expression could be due to a direct E2-induced ACE2 activity, but an indirect activation could not be discarded.

It has been hypothesized that ACE2 might protect against increases in blood pressure and that ACE2 deficiency leads to hypertension (Crackower et al., 2002). There are not studies on the effect of E2 on ACE2 activity in endothelial cells, but experimental data from rats suggest an up-regulation of ACE2 by estrogens. For instance, female rats have significantly greater ACE2 kidney expression compared with male, demonstrating an enhanced vasodilator arm of the RAS in female kidneys (Sampson et al., 2012). Moreover, ACE2 activity increased in the renal cortex and the medulla in pregnant rats, which is correlated with increased E2 in serum (Joyner et al., 2007). In ovariectomized rats, ACE2 activity and protein expression were decreased in the renal cortex and normalized after estrogen replacement (Ji et al., 2008). Furthermore, rat cardiac ACE2 protein was increased after exposure to E2 therapy in rats (Shenoy et al., 2009). Nevertheless, data from mice partially disagree, since male mice have greater renal ACE2 activity, whereas no sex differences were detected in the heart and lung (Liu et al., 2010).

As stated, the majority of reports on E2-induced effects on circulating and even in local RAS are dual, by reducing ACE1 and increasing ACE2. In HUVEC, the activity of both enzymes was increased by E2, and therefore ACE1 provides Ang II to ACE2 to produce Ang-(1–7), as demonstrated by the abolishment of E2-increased Ang-(1–7) production in the presence of lisinopril, a

selective inhibitor of ACE1 not acting on ACE2 activity (Donoghue et al., 2000). Therefore, the E2-induced RAS activity resulted in increased Ang-(1–7) concentration, and may prevent the accumulation of Ang II.

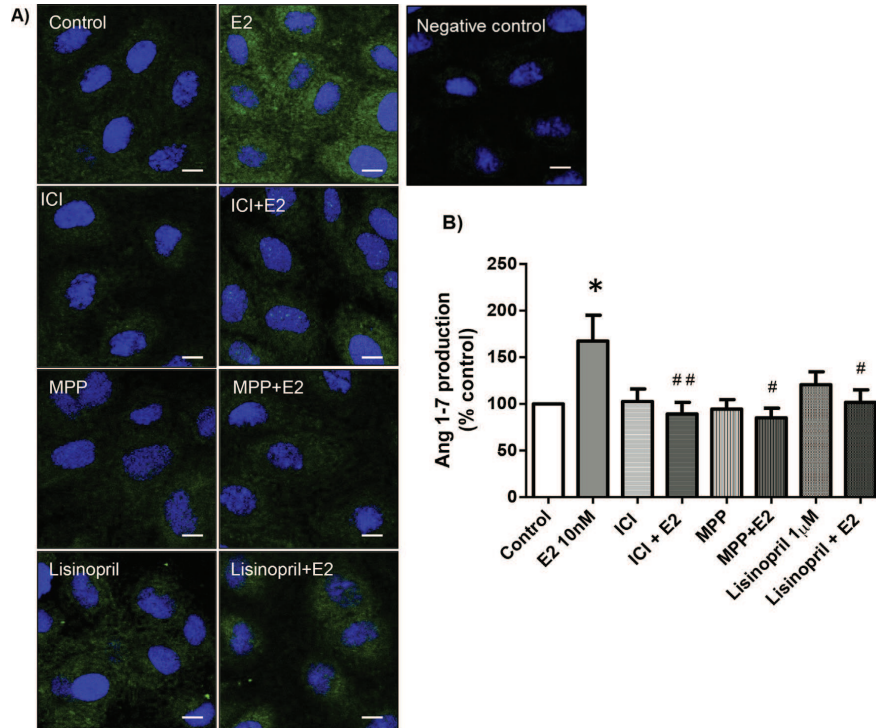
Our results are in agreement with several experimental studies describing a relationship between estrogens and elevated local Ang-(1–7). For instance, female rats exhibit higher renal Ang-(1–7) levels than do males, whereas plasma Ang II levels were greater in male than in female WKY rats (Bhatia et al., 2013). Sex differences on plasma and renal Ang II or Ang-(1–7) were not demonstrated in normotensive Lewis rat strain, but in hypertensive mRen2.Lewis rats, male plasma Ang II were higher and Ang-(1–7) lower than in females (Pendergrass et al., 2008; Yamaleyeva et al., 2012).

Ang II/Ang-(1–7) balance is regulated differently in male and female mice with diet induced obesity (Gupte et al., 2012). In this model, low-fat fed females exhibited lower plasma Ang-(1–7) levels whereas high-fat fed decreased plasma Ang II and increased Ang-(1–7) levels in females. Moreover, ovariectomy of high-fat female mice reduced plasma Ang-(1–7) levels, thus supporting a role for E2 on maintenance of Ang-(1–7) levels.

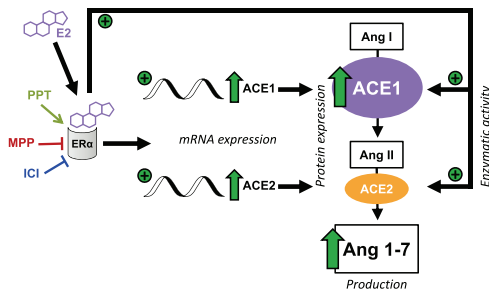
Estrogen modulates cardiovascular function and physiology acting through its classic receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , both expressed in HUVEC (Mendelsohn, 2002; Sobrino et al., 2009; Wagner et al., 2001) and also in endothelial cells from arterial origin (Novella et al., 2013). Molecular, cellular and animal studies have demonstrated beneficial estrogen effects on vascular cells, most of them mediated by ER $\alpha$  (Arnal et al., 2010; Novella et al., 2012). ER $\alpha$  and ER $\beta$  protein expression remained unaltered when HUVEC were exposed to E2 and ER antagonists in the same conditions than in the present work (Sobrino et al., 2009, 2010).

The effects induced by E2 on ACE1 and ACE2 mRNA and protein





**Fig. 6.** Ang-(1–7) levels in HUVEC. (A) Representative confocal images of Ang-(1–7) in HUVEC. Cells were exposed to E2 (10 nmol/l) alone or in combination with ER antagonist ICI (1 μmol/l), ER $\alpha$  antagonist MPP (1 μmol/l) or ACE1 inhibitor (Lisinopril; 1 μmol/l) for 24 h. Green color (FITC) represents Ang-(1–7) production. Negative control represents the background of secondary antibody. (B) Ang-(1–7) expression quantification of confocal images in HUVEC. Data are expressed as the percentage of the control values and presented as mean  $\pm$  SEM. The experiment was performed in 6 duplicate experiments. \*p < 0.05 vs. control; #p < 0.05 and ##p < 0.01 vs. E2 10 nmol/l alone. Scale bar represents 10 μm (original magnification  $\times$ 400). (For interpretation of the references to color in this figure caption, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 7.** Schema illustrating the E2-induced effects on HUVEC. E2, acting through ER $\alpha$ , increases ACE1 and ACE2 mRNA expression and activities and ACE1 protein expression, resulting in increased Ang-(1–7) production. PPT is a specific ER $\alpha$  agonist, MPP is a specific ER $\alpha$  antagonist and ICI is an ER unspecific antagonist.

expressions and activities, and on Ang-(1–7) production were abolished by the competitive antagonist of ER $\alpha$  and ER $\beta$ , ICI 182780, and by the specific ER $\alpha$  antagonist MPP. Moreover, the ER $\alpha$  agonist PPT, but not the ER $\beta$  agonist DPN, mirrored the E2 effects. Taken together, these results demonstrate a selective involvement of ER $\alpha$

in the effect of E2 modulating RAS components in HUVEC.

Considering the cardiovascular beneficial effects of Ang-(1–7), the ACE2-mediated degradation of Ang II and the resulting formation of Ang-(1–7), might represent a protective mechanism. Thus, our results add new information that supports a role for ER $\alpha$  in E2-mediated vasodilatory effects and reinforce the central role of ER $\alpha$  on the estrogen beneficial effects on endothelial physiology (Arnal et al., 2010; Novella et al., 2012, 2013).

**Acknowledgments**

Supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III – FEDER-ERDF (grants FIS P110/00518, P113/00617, and RD12/0042/0052). A.M. is a “Formación de Profesorado Universitario” fellow (grant number FPU13/02235 Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte). D.P.-C. is an “Atracción de Talent” fellow (grant number PREDOC13-110541, University of Valencia).

**References**

Arefi, S., Mottaghi, S., Sharifi, A.M., 2013. Studying the correlation of renin-angiotensin-system (RAS) components and insulin resistance in polycystic ovary syndrome (PCOs). *Gynecol. Endocrinol.* 29, 470–473.  
 Arnal, J.F., Fontaine, C., Billon-Gales, A., Favre, J., Laurell, H., Lenfant, F., Gourdy, P.,



2010. Estrogen receptors and endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1506–1512.
- Bhatia, K., Zimmerman, M.A., Sullivan, J.C., 2013. Sex differences in angiotensin-converting enzyme modulation of ang (1–7) levels in normotensive WKY rats. *Am. J. Hypertens.* 26, 591–598.
- Crackower, M.A., Sarao, R., Oudit, G.Y., Yagil, C., Koziaradzki, I., Scanga, S.E., Oliveiras-Santos, A.J., da Costa, J., Zhang, L., Pei, Y., Scholey, J., Ferrario, C.M., Manoukian, A.S., Chappell, M.C., Backx, P.H., Yagil, Y., Penninger, J.M., 2002. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 417, 822–828.
- Chappell, M.C., Ferrario, C.M., 2006. ACE and ACE2: their role to balance the expression of angiotensin II and angiotensin-(1–7). *Kidney Int.* 70, 8–10.
- Dinh, D.T., Frauman, A.G., Johnston, C.I., Fabiani, M.E., 2001. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. *Clin. Sci. (Lond)* 100, 481–492.
- Donoghue, M., Hsieh, F., Baronas, E., Godbout, K., Gosselin, M., Stagliano, N., Donovan, M., Woolf, B., Robison, K., Jeyaseelan, R., Breitbart, R.E., Acton, S., 2000. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1–9. *Circ. Res.* 87, e1–e9.
- Gallagher, P.E., Li, P., Lenhart, J.R., Chappell, M.C., Brosnihan, K.B., 1999. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension* 33, 323–328.
- Griendling, K.K., Murphy, T.J., Alexander, R.W., 1993. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation* 87, 1816–1828.
- Gupte, M., Thatcher, S.E., Boustany-Kari, C.M., Shoemaker, R., Yiannikouris, F., Zhang, X., Karounos, M., Cassis, L.A., 2012. Angiotensin converting enzyme 2 contributes to sex differences in the development of obesity hypertension in C57BL/6 mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1392–1399.
- Guy, J.L., Jackson, R.M., Acharya, K.R., Sturrock, E.D., Hooper, N.M., Turner, A.J., 2003. Angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2): comparative modeling of the active site, specificity requirements, and chloride dependence. *Biochemistry* 42, 13185–13192.
- Huang, L., Sexton, D.J., Skogerson, K., Devlin, M., Smith, R., Sanyal, I., Parry, T., Kent, R., Enright, J., Wu, Q.L., Conley, G., DeOliveira, D., Morganelli, L., Ducar, M., Westcott, C.R., Ladner, R.C., 2003. Novel peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2. *J. Biol. Chem.* 278, 15532–15540.
- Ji, H., Menini, S., Zheng, W., Pesce, C., Wu, X., Sandberg, K., 2008. Role of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin(1–7) in 17beta-oestradiol regulation of renal pathology in renal wrap hypertension in rats. *Exp. Physiol.* 93, 648–657.
- Joyner, J., Neves, L.A., Granger, J.P., Alexander, B.T., Merrill, D.C., Chappell, M.C., Ferrario, C.M., Davis, W.P., Brosnihan, K.B., 2007. Temporal-spatial expression of ANG-(1–7) and angiotensin-converting enzyme 2 in the kidney of normal and hypertensive pregnant rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R169–R177.
- Kim, K.H., Young, B.D., Bender, J.R., 2014. Endothelial estrogen receptor isoforms and cardiovascular disease. *Mol. Cell Endocrinol.* 389, 65–70.
- Lim, Y.K., Retnam, L., Bhagavath, B., Sethi, S.K., bin Ali, A., Lim, S.K., 2002. Gonadal effects on plasma ACE activity in mice. *Atherosclerosis* 160, 311–316.
- Liu, J., Ji, H., Zheng, W., Wu, X., Zhu, J., Arnold, A., Sandberg, K., 2010. Sex differences in renal angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) activity are 17beta-oestradiol-dependent and sex chromosome-independent. *Biol. Sex. Differ.* 1, 6.
- Lopez Verrilli, M.A., Pirola, C.J., Pascual, M.M., Dominici, F.P., Turyn, D., Gironacci, M.M., 2009. Angiotensin-(1–7) through AT receptors mediates tyrosine hydroxylase degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Neurochem.* 109, 326–335.
- Lovren, F., Pan, Y., Quan, A., Teoh, H., Wang, G., Shukla, P.C., Levitt, K.S., Oudit, G.Y., Al-Omran, M., Stewart, D.J., Slutsky, A.S., Peterson, M.D., Backx, P.H., Penninger, J.M., Verma, S., 2008. Angiotensin converting enzyme-2 confers endothelial protection and attenuates atherosclerosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H1377–H1384.
- Maric-Bilkan, C., Manigrasso, M.B., 2012. Sex differences in hypertension: contribution of the renin-angiotensin system. *Gen. Med.* 9, 287–291.
- Mendelsohn, M.E., 2002. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am. J. Cardiol.* 89, 12E–18E.
- Montezano, A.C., Nguyen Dinh Cat, A., Rios, F.J., Touyz, R.M., 2014. Angiotensin II and vascular injury. *Curr. Hypertens. Rep.* 16, 431.
- Nguyen Dinh Cat, A., Touyz, R.M., 2011. A new look at the renin–angiotensin system—focusing on the vascular system. *Peptides* 32, 2141–2150.
- Novella, S., Heras, M., Hermenegildo, C., Dantas, A.P., 2012. Effects of estrogen on vascular inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 2035–2042.
- Novella, S., Laguna-Fernandez, A., Lazaro-Franco, M., Sobrino, A., Bueno-Beti, C., Tarin, J.J., Monsalve, E., Sanchis, J., Hermenegildo, C., 2013. Estradiol, acting through estrogen receptor alpha, restores dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and nitric oxide production in oxLDL-treated human arterial endothelial cells. *Mol. Cell Endocrinol.* 365 (1), 11–16.
- Paul, M., Poyan Mehr, A., Kreutz, R., 2006. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol. Rev.* 86, 747–803.
- Pendergrass, K.D., Pirro, N.T., Westwood, B.M., Ferrario, C.M., Brosnihan, K.B., Chappell, M.C., 2008. Sex differences in circulating and renal angiotensins of hypertensive mRen2/Lewis rats but not normotensive Lewis rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H10–H20.
- Pingili, A.K., Kara, M., Khan, N.S., Estes, A.M., Lin, Z., Li, W., Gonzalez, F.J., Malik, K.U., 2015. 6β-Hydroxytestosterone, a cytochrome P450 1B1 metabolite of testosterone, contributes to angiotensin II-induced hypertension and its pathogenesis in male mice. *Hypertension* 65, 1279–1287.
- Prabhushankar, R., Krueger, C., Manrique, C., 2014. Membrane estrogen receptors: their role in blood pressure regulation and cardiovascular disease. *Curr. Hypertens. Rep.* 16, 408.
- Prouder, A.J., Cooper, A., Whitehead, M., Stevenson, J.C., 2003. Effects of oestrogen-only and oestrogen-progesterone replacement therapy upon circulating angiotensin I-converting enzyme activity in postmenopausal women. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 58, 30–35.
- Sampson, A.K., Moritz, K.M., Denton, K.M., 2012. Postnatal ontogeny of angiotensin receptors and ACE2 in male and female rats. *Gen. Med.* 9, 21–32.
- Schwager, S.L., Carmona, A.K., Sturrock, E.D., 2006. A high-throughput fluorimetric assay for angiotensin I-converting enzyme. *Nat. Protoc.* 1, 1961–1964.
- Shenoy, V., Grobe, J.L., Qi, Y., Ferreira, A.J., Fraga-Silva, R.A., Collamat, G., Bruce, E., Katovich, M.J., 2009. 17beta-Estradiol modulates local cardiac renin-angiotensin system to prevent cardiac remodeling in the DOCA-salt model of hypertension in rats. *Peptides* 30, 2309–2315.
- Sobrino, A., Mata, M., Laguna-Fernandez, A., Novella, S., Oviedo, P.J., Garcia-Perez, M.A., Tarin, J.J., Cano, A., Hermenegildo, C., 2009. Estradiol stimulates vasodilatory and metabolic pathways in cultured human endothelial cells. *PLoS One* 4, e8242.
- Sobrino, A., Oviedo, P.J., Novella, S., Laguna-Fernandez, A., Bueno, C., Garcia-Perez, M.A., Tarin, J.J., Cano, A., Hermenegildo, C., 2010. Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor alpha. *J. Mol. Endocrinol.* 44, 237–246.
- Sullivan, J.C., 2008. Sex and the renin-angiotensin system: inequality between the sexes in response to RAS stimulation and inhibition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, R1220–R1226.
- te Riet, L., van Esch, J.H.M., Roks, A.J.M., van den Meiracker, A.H., Danser, A.H.J., 2015. Hypertension: renin–angiotensin–aldosterone system alterations. *Cir. Res.* 116, 960–975.
- Wagner, A.H., Schroeter, M.R., Hecker, M., 2001. 17beta-Estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells. *FASEB J.* 15, 2121–2130.
- Xue, B., Zhang, Z., Beltz, T.G., Guo, F., Hay, M., Johnson, A.K., 2014. Estrogen regulation of the brain renin-angiotensin system in protection against angiotensin II-induced sensitization of hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 307, H191–H198.
- Yamaleyeva, L.M., Gilliam-Davis, S., Almeida, I., Brosnihan, K.B., Lindsey, S.H., Chappell, M.C., 2012. Differential regulation of circulating and renal ACE2 and ACE in hypertensive mRen2/Lewis rats with early-onset diabetes. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 302, F1374–F1384.
- Yung, L.M., Wong, W.T., Tian, X.Y., Leung, F.P., Yung, L.H., Chen, Z.Y., Yao, X., Lau, C.W., Huang, Y., 2011. Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats. *PLoS One* 6, e17437.
- Zapater, P., Novalbos, J., Gallego-Sandin, S., Hernandez, F.T., Abad-Santos, F., 2004. Gender differences in angiotensin-converting enzyme (ACE) activity and inhibition by enalaprilat in healthy volunteers. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 43, 737–744.



Contents lists available at ScienceDirect

## Biochemical Pharmacology

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

## Mas receptor is involved in the estrogen-receptor induced nitric oxide-dependent vasorelaxation



Agua Sobrino<sup>a</sup>, Susana Vallejo<sup>b</sup>, Susana Novella<sup>a</sup>, Macarena Lázaro-Franco<sup>a</sup>, Ana Mompeón<sup>a</sup>, Carlos Bueno-Betí<sup>a</sup>, Thomas Walther<sup>c</sup>, Carlos Sánchez-Ferrer<sup>b</sup>, Concepción Peiró<sup>b</sup>, Carlos Hermenegildo<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> INCLIVA Biomedical Research Institute, Hospital Clínico de Valencia, and Department of Physiology, University of Valencia, Spain

<sup>b</sup> Department of Pharmacology, University Autonoma of Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Pharmacology and Therapeutics, School of Medicine & School of Pharmacy, University College Cork, Cork, Ireland

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 November 2016

Accepted 20 January 2017

Available online 25 January 2017

#### Keywords:

Endothelial cells

Estradiol

Estrogen receptor

Mas receptor

Nitric oxide

### ABSTRACT

The Mas receptor is involved in the angiotensin (Ang)-(1–7) vasodilatory actions by increasing nitric oxide production (NO). We have previously demonstrated an increased production of Ang-(1–7) in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) exposed to estradiol (E2), suggesting a potential cross-talk between E2 and the Ang-(1–7)/Mas receptor axis. Here, we explored whether the vasoactive response and NO-related signalling exerted by E2 are influenced by Mas. HUVEC were exposed to 10 nM E2 for 24 h in the presence or absence of the selective Mas receptor antagonist A779, and the estrogen receptor (ER) antagonist ICI182780 (ICI). E2 increased Akt and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA and protein expression, measured by RT-PCR and Western blot, respectively. Furthermore, E2 increased Akt activity (determined by the levels of phospho-Ser<sup>473</sup>) and eNOS activity (by the enhanced phosphorylation of Ser<sup>1177</sup>, the activated form), resulting in increased NO production, which was measured by the fluorescence probe DAF-2-FM. These signalling events were dependent on ER and Mas receptor activation, since they were abolished in the presence of ICI or A779. In *ex-vivo* functional experiments performed with a small-vessel myograph in isolated mesenteric vessels from wild-type mice pre-contracted with noradrenaline, the relaxant response to physiological concentrations of E2 was blocked by ICI and A779, to the same extent to that obtained in the vessels isolated from Mas-deficient. In conclusion, E2 induces NO production and vasodilation through mechanisms that require Mas receptor activation.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Estradiol (E2) exerts a wide range of vascular actions by interacting with estrogen receptors (ER), which are expressed by both endothelial and smooth muscle cells [1]. Microarray analysis performed by our group in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) revealed that E2 regulates relevant vasoactive pathways, including the nitric oxide (NO) or the renin–angiotensin system (RAS) by interacting with ER [2,3].

NO is a major regulator of the vascular tone generated by endothelial NO synthase (eNOS) whose activity is tightly regulated through different intracellular events, including protein phosphorylation. Two main regulatory sites of eNOS phosphorylation are

Ser<sup>1177</sup> and Thr<sup>495</sup>, which result in increased or diminished enzymatic activity, respectively [4]. In endothelial cells, the PI3K/Akt pathway is involved in prototypical endothelial functions such as the regulation of vascular tone, angiogenesis, control of adhesion, and recruitment of leucocytes to the vessel wall [5]. Indeed, eNOS phosphorylation by PI3K/Akt is associated with enhanced NO production and release [5].

The RAS is a key systemic regulator of blood pressure and electrolytic homeostasis, but it also exerts paracrine inflammatory, trophic and vasoactive effects within the vasculature. While angiotensin (Ang) II is the main biologically active compound of the RAS, a number of other active Ang peptides have been identified during the last years. Among them, Ang-(1–7) is a heptapeptide generated from Ang I and Ang II by different enzymatic pathways involving neprilysin (NEP; neutral endopeptidase) and angiotensin-converting enzyme (ACE) 2, among others [6]. Ang-(1–7) binds to

\* Corresponding author at: Dept. Physiology, Faculty of Medicine and Odontology, Av. Blasco Ibañez, 15, E 46010 Valencia, Spain.

E-mail address: [carlos.hermenegildo@uv.es](mailto:carlos.hermenegildo@uv.es) (C. Hermenegildo).

the G protein-coupled receptor Mas and is considered nowadays a physiological antagonist of Ang II [7].

In previous studies, we have described that, even in the absence of Ang-(1–7), the inactivation of Mas receptors by genetic deletion or pharmacological blockade deregulates the vasoactive responses elicited by several endothelium-dependent vasodilators [8]. Hence, Mas blockade blunts the NO-dependent vasorelaxation elicited by acetylcholine or bradykinin in isolated microvessels [9].

Recently, we have demonstrated that E2 stimulates production of Ang-(1–7) in HUVEC by increasing the expression and activity of angiotensin converting enzymes via ER [3]. This suggests the existence of a cross-talk between E2 and the Ang-(1–7)/Mas receptor arm of the RAS.

Since E2 shares common vasodilatory mechanisms with bradykinin and acetylcholine based on endothelial NO production and release, we aimed to investigate whether Mas receptors were also required for E2 to properly exert its vasorelaxant actions. For this purpose, we have studied the influence of Mas blockade on Akt levels, eNOS expression, and NO production, as well as on microvascular reactivity using both human endothelial cell cultures and isolated murine mesenteric arteries stimulated with E2.

## 2. Material and methods

### 2.1. Cell culture and experimental design

Primary HUVEC were isolated by collagenase (GIBCO, Invitrogen, Paisley, UK) treatment of human umbilical veins as described earlier [2]. Briefly, HUVEC were grown in 75-cm<sup>2</sup> flasks (Orange Scientific, Waterloo, Belgium) in human endothelial cell specific Medium EBM-2, (Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with EGM-2 (Lonza), in an incubator at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>.

Cells were identified as endothelial by their characteristic cobblestone morphology and the presence of von Willebrand factor by immunocytochemistry using a specific antibody (F-3520; Sigma, Madrid, Spain) as previously described [10]. Cells from passages 4–6 were seeded onto 6-well plates with fibronectin-treated coverslips for immunocytochemistry, onto 6-well plates for NO measurement and onto 25 cm<sup>2</sup> flasks for Western blot and mRNA isolation. When cells reached 75% of confluence, culture medium was exchanged for a phenol red-free Medium 199 (GIBCO) supplemented with steroid-deprived (by charcoal/dextran treatment) 20% fetal bovine serum (GIBCO) and maintained for 24 h. Then, culture medium was eliminated and immediately replaced with phenol red-free Medium 199. The desired concentrations of E2 (Sigma) were obtained by successive dilutions of a stock solution with ethanol. The desired concentrations of the ER antagonist ICI182780 (ICI; Tocris Bioscience, Ellisville, MI, USA), and A779 (Bachem, Bubendorf, Switzerland), were obtained by successive dilutions of a stock solution with DMSO and phosphate buffered saline (PBS), respectively. Control cells were exposed to the same vehicles (less than 0.1% ethanol, 0.1% DMSO or 0.1% PBS, respectively).

### 2.2. RNA isolation and quantitative real time PCR (RT-PCR) assay

HUVEC were treated in 25-cm<sup>2</sup> flasks with the desired products. After 24 hours, total cellular RNA was extracted by using TRIzol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Reverse transcription (RT) was carried out using SuperScript<sup>™</sup> First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). One microgram of total RNA was reverse transcribed to cDNA following the manufacturer's instructions. Taqman probes for eNOS, Akt and GAPDH (endogenous control) were Hs00167166\_m1, Hs00178289\_m1 and 4326317E, respectively and were from Applied Biosystems (Fosters City, CA,

USA). PCR was performed with TaqMan Universal Mastermix (Applied Biosystems) in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Each sample was amplified in triplicate for each gene. Data were analyzed with the ABI PRISM 1.7 analysis software (Applied Biosystems).

### 2.3. Immunoblotting

Treated HUVEC were collected in RIPA buffer (Sigma) containing protease inhibitors (complete ULTRA Tablets, Roche Diagnostics, Madrid, Spain) and phosphatase inhibitors (PhosStop Tablets, Roche Diagnostics). Protein content was measured by the BCA method (Thermo Scientific Inc., Rockford, IL, USA) and samples were frozen at –20 °C until assayed.

Equal amounts of protein (ranging 15–50 µg) were then separated by NuPAGE<sup>®</sup>Noves 4–12% Bis Tris midi gel, 20-well (Invitrogen), and protein was then transferred to PVDF sheets (PVDF Transfer Membrane, Bio-Rad, Madrid, Spain). Immunostaining was achieved using the following specific antibodies: anti-eNOS (#9570), anti-eNOS phosphorylated at Ser<sup>1177</sup> (#9571), anti-eNOS phosphorylated at Thr<sup>495</sup> (#9574), anti-Akt (#9272) and anti-Akt phosphorylated at Ser<sup>473</sup> (#4058) (all from Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Development was performed with horse rabbit peroxidase-linked antibodies (Sigma), followed with Super-signal Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific Inc.). Signal density was analyzed with ImageGauge 4.0 software. Equivalent protein loading and transfer efficiency were verified by staining for β-actin (Sigma).

### 2.4. Nitric oxide production

Intracellular NO was monitored with the fluorescence probe DAF-2, as described earlier [9]. Briefly, HUVEC were seeded on 24-well plates, and at 80% confluence, cells were exposed to the desired treatments. Then, cells were loaded with 2.5 µmol/l 4-amino-5-methylamino-2,7-difluorofluorescein diacetate (DAF-2-FM diacetate; Molecular Probes, Invitrogen) for 30 min. After loading, cells were rinsed three times with culture medium. To quantitate the DAF-related fluorescence, the cells were observed under an inverted fluorescence Nikon Eclipse Ti-S microscope. Fluorescence from five different fields per well was measured (excitation wavelength: 488 nm; emission wavelength: 515 nm). Fluorescence signals were quantified using NIS-Elements 3.0 software (Nikon Izasa S.A, Barcelona, Spain). NO synthase inhibitor N<sup>o</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME, 100 µM; Sigma) was used to confirm and validate that the fluorescent signal to DAF was originated by NO.

### 2.5. Cell viability measurement

The possible toxic effect of the used compounds on HUVEC was discarded by the measurement of cell respiration, an indicator of cell viability, that was assessed by mitochondrial dependent reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide to formazan [11]. Cell viability after all treatments was the same as control cells maintained without treatments (data not shown).

### 2.6. Microvascular reactivity

Six-month-old male C57Bl/6 mice or Mas-deficient mice on a C57Bl/6 background [12] were used in the experiments. Animals were maintained under standardized conditions with an artificial 12-h dark-light cycle, with free access to food and water. All animal studies were performed according to national guidelines and approved by the institutional animal care committees.

Prior to experiments, the animals were briefly exposed to a chamber filled with carbon dioxide until they fell unconscious and then immediately culled by cervical dislocation. The mesentery was removed, and placed in a Petri dish containing Krebs-Henseleit solution (KHS) at 4 °C. The second branch mesenteric arteries (mean internal diameter ranged between 150 and 250  $\mu\text{m}$  with non-significant differences observed among the different groups of mice) were mounted as ring preparations on a small-vessel myograph to measure isometric tension [8,9]. Arteries were contracted with 125 mM K (KKHS, equimolar substitution of KCl for NaCl in KHS). The bath was then washed three times with KHS and a further period of 30 min washout period allowed before the arteries were contracted with the concentration of norepinephrine (NA, 3  $\mu\text{M}$ ) required to produce approximately 80% of the maximum response to KKHS, and then vasoactive responses to E2 (0.1 nM to 1  $\mu\text{M}$ ) was tested by adding increasing concentration of the steroid. In some cases, mesenteric segments were pre-incubated for 20 min with A779 (1  $\mu\text{M}$ ), L-NAME (100 nM) or 1  $\mu\text{M}$  ICI (1  $\mu\text{M}$ ). The composition of KHS (mM) was: NaCl 115, CaCl<sub>2</sub> 25, KCl 4.6, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, glucose 11.1 and Na<sub>2</sub> EDTA 0.03. NA was prepared in saline (0.9% NaCl)-ascorbic acid (0.01% w/v).

### 2.7. Statistical analysis

Values shown in the text, table and figures are mean  $\pm$  SEM. ANOVA test was applied for comparisons of mean, and then Newman-Keuls's test was performed. Concentration-dependent curves were statistically analyzed using two-factor ANOVA. *P* values < 0.05 were considered significant. The statistical analyses were carried out using the Prism 5 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 3. Results

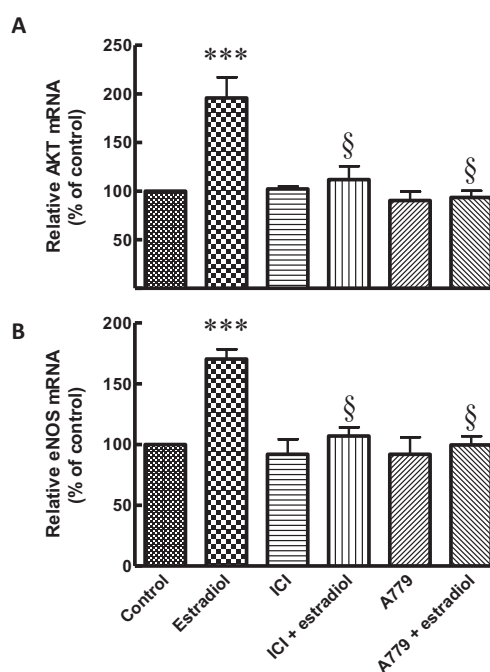
### 3.1. E2 stimulates the Akt/eNOS/NO pathway in human endothelial cells through ER and mechanisms that involve Mas receptor

As shown in Fig. 1A and B, E2 (10 nM) increased the levels of Akt and eNOS mRNA after 24 h. The increased mRNA expression was paralleled by an enhancement in total Akt and eNOS protein content in HUVEC (Fig. 2A). Moreover, E2 increased Akt activity, as determined by the levels of phospho-Ser<sup>473</sup> (Fig. 2A and B). The activation of eNOS was also promoted by E2, as revealed by the enhanced phosphorylation of Ser<sup>1177</sup> (more activate form) together with the decreased levels of phospho-Thr<sup>495</sup> (less active form) (Fig. 2A, C and D). The activation of the Akt/eNOS pathway by E2 stimulated the production of NO by HUVEC (Fig. 3A and B).

As expected, the observed effects of E2 on Akt and eNOS were mediated through the ER, since they were prevented by the ER antagonist ICI (1  $\mu\text{M}$ ) (Figs. 1 and 2).

Interestingly, the effect of ICI was mimicked by the Mas receptor selective blocker A779 (1  $\mu\text{M}$ ). Hence, A779 prevented the over-expression and activation of Akt by E2 (Figs. 1A, 2A and B). Similarly, A779 avoided the effect of E2 on eNOS expression and activation (Figs. 1B, 2A, C and D). ICI and A779 by themselves did not influence the different parameters determined except for the eNOS phosphorylation in Thr<sup>495</sup> that was enhanced by A779 (Figs. 1 and 2).

The production of NO by E2 was equally blunted by both ER and Mas receptor antagonism (Fig. 3A and B) after 24 h. Since E2 also exerts rapid actions on NO production, we next explored the involvement of Mas receptors on the production of NO at shorter times of stimulation. As shown in Fig. 3C, E2 promoted the production of NO from 15 min to 4 h, which was also blunted by A779.

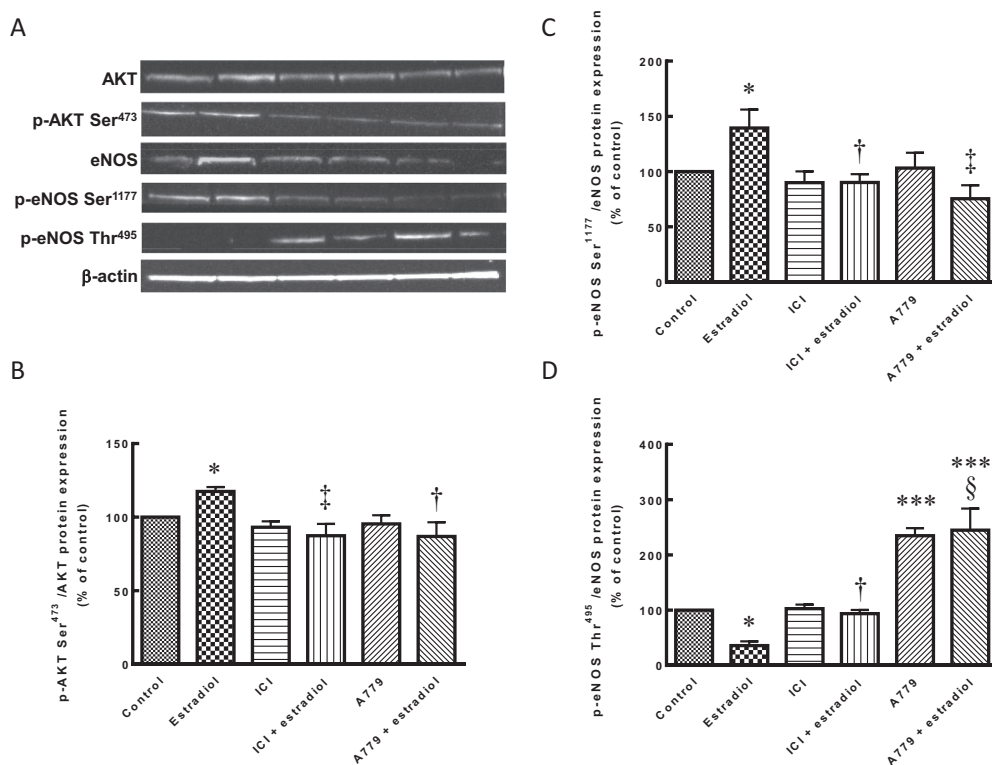


**Fig. 1.** Estradiol increases Akt and eNOS mRNA through ER and Mas receptor. HUVEC were exposed to different combinations of 10 nM E2 with 1  $\mu\text{M}$  ICI or 1  $\mu\text{M}$  A779 for 24 h. For mRNA expression, total RNA was extracted and the relative expression of (A) Akt and (B) eNOS was quantified by RT-PCR, as described in Section 2. Data are expressed as a percentage of control values, and are mean  $\pm$  SEM of 7–12 values corresponding to 4 independent experiments. \*\*\**P* < 0.001 vs. control, §*P* < 0.001 vs. E2 alone.

### 3.2. The NO-mediated vasodilation induced by E2 in mesenteric murine microvessels requires ER and Mas receptors

We next assessed whether the short-term inhibition of NO release by Mas blockade could have a functional relevance on the vasoactive responses induced by E2. Fig. 4A shows that E2 (0.1 nM to 1  $\mu\text{M}$ ) evoked a concentration-dependent vasorelaxant response. At 10 nM E2, the concentration used in cell experiments, the vasodilation was dependent on NO release, since it was blunted with the eNOS inhibitor L-NAME (10  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 4A and Table 1). The incubation with either ICI or A779 also abolished the vasorelaxant response at this concentration range (Fig. 4B and Table 1). At concentrations higher than 30 nM, ICI or A779 prevented the vasodilatory action of E2 and the co-incubation with ICI and A779 did not add any further blockade (Fig. 4B), thus suggesting that both drugs interfered with common pathways.

The involvement of Mas in the vasodilatory effect of E2 was further confirmed by experiments performed in mice with a genetic deletion in the Mas receptor. In the isolated microvessels from these knock-out animals, the vasodilation evoked by E2 was impaired to an extent similar to that observed in wild type microvessels incubated with A779 or ICI (Fig. 4A and B). At physiological concentrations up to 10 nM, the absence of Mas blunted the vasodilatory action of E2 (Fig. 4 and Table 1). Indeed, at this concentration range of E2, Mas-deficient microvessels did not exhibit NO-dependent relaxation, as shown by the co-incubation with L-NAME (Fig. 4A).



**Fig. 2.** Estradiol promotes increased levels and activates Akt and eNOS in HUVEC through ER and Mas receptor. HUVEC were exposed to different combinations of 10 nM E2 with 1  $\mu$ M ICI or 1  $\mu$ M A779 for 24 h, and cells were collected and immunoblotted with specific antibodies, as described in Section 2. (A) Representative images showing the levels of Akt and eNOS proteins, and the phosphorylated form of Akt in Ser<sup>473</sup>, and eNOS in Ser<sup>1177</sup> and Thr<sup>495</sup> are presented.  $\beta$ -Actin was analyzed as control. Relative expressions of p-Akt Ser<sup>473</sup> vs. total Akt (B), p-eNOS Ser<sup>1177</sup> vs. total eNOS (C) and p-eNOS Thr<sup>495</sup> vs. total eNOS (D) are expressed as percentage of control values and represent the mean  $\pm$  SEM of 5–7 values corresponding to 4 independent experiments. \* $P$  < 0.05 or † $P$  < 0.001 vs. control, and ‡ $P$  < 0.05, § $P$  < 0.01 or ¶ $P$  < 0.001 vs. E2 alone.

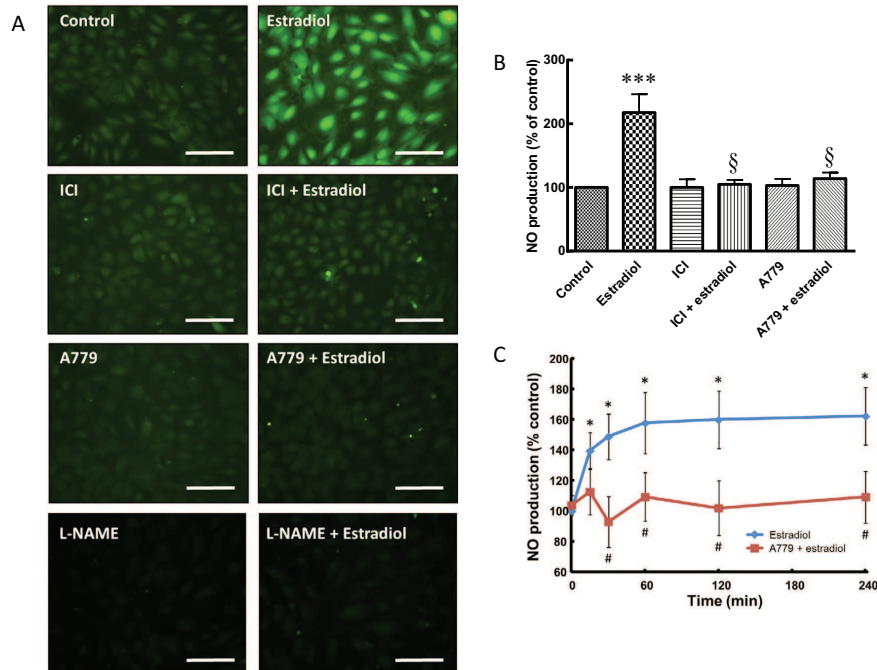
#### 4. Discussion

We have recently reported in HUVEC that E2 stimulates via ER the production of Ang-(1–7) by increasing the expression and activity of angiotensin converting enzymes [3], indicating a cross-talk between E2 and the Ang-(1–7)/Mas axis. In the present study, we demonstrate that the Mas receptor plays an essential role in the NO-dependent vasodilatation mediated by E2. It is worth to remark that the blockade of Mas receptors was equal to that of ER blockade in preventing the effects of E2. Indeed, a functional Mas receptor seems to be necessary for the activation of NO production and the subsequent vasodilatation mediated by E2.

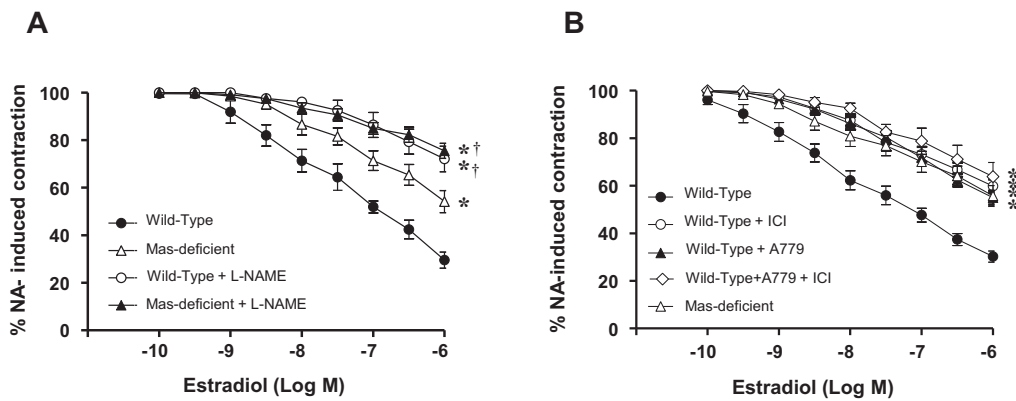
The endothelium plays a major role in vascular tone control by releasing both relaxing and contractile factors, with NO being a main mediator of the endothelium-dependent relaxation activity. E2 has been reported to up-regulate the production of endothelial NO [1,2]. Here, we show that E2 promotes a sustained release of NO by endothelial cells over a period from 15 min to 24 h, which is in line with previous reports showing that E2 can exert vasodilatory effects at short term, but also at longer time periods [13]. These effects were obtained with physiological concentrations of E2, similar to that achieved in plasma of premenopausal women during the periovulatory phase of the menstrual cycle [14].

In endothelial cells, the release of NO by E2 is related to increased levels and phosphorylation of eNOS at Ser<sup>1177</sup>, together with decreased phosphorylation at Thr<sup>495</sup>, as a main mechanism of eNOS regulation [4]. This effect is likely driven by the upstream activation of the Akt pathway, as a result of its phosphorylation at Ser<sup>473</sup> [15]. This signalling pathway leading to the release of NO is dependent on ER receptors, and, more strikingly, on Mas receptors. In the absence of E2, the respective ER and Mas blockers, ICI and A779, did not affect the mechanisms regulating the production of NO. Only A779 did increase by itself the phosphorylation of eNOS at Thr<sup>495</sup>. This observation suggests that a constitutive activation of Mas receptors may be repressing to some extent the inactivation of eNOS. Indeed, a strong constitutive activity of Mas receptors has been previously reported [16–18]. Moreover, it is worth to mention that Mas receptor expression remained unaltered in HUVEC exposed to E2 in the same experimental conditions [2].

The relevance of Mas receptors for NO production is further highlighted in functional assays performed in mesenteric arteries. Thus, E2 induces a concentration-dependent relaxation in murine resistance arteries, which is in accordance with previous reports [19,20]. At a physiological range of 1–10 nM E2, the observed relaxation was completely mediated by NO, while at higher concentrations other vasoactive compounds were likely participating



**Fig. 3.** Estradiol increases NO production in HUVEC through ER and mechanisms that involve Mas receptor. HUVEC were exposed to different combinations of 10 nM E2 with 1  $\mu$ M ICI or 1  $\mu$ M A779, and NO production was measured by using the fluorescence probe DAF-2-FM, as described in Section 2. The cell exposure to 100  $\mu$ M L-NAME (eNOS inhibitor) significantly blunted the fluorescent signal of NO production. (A) Representative images. Scale bars: 100  $\mu$ m. (B) Quantification of fluorescence at 24 h. Data are expressed as percentage of control values and are mean  $\pm$  SEM of 4–7 values corresponding to 4 independent experiments. \*\*\* $P$  < 0.001 vs. control,  $^{\#}P$  < 0.001 vs. E2 alone. (C) The effect of short-term exposure to 10 nM E2 with 1  $\mu$ M A779 was studied over 240 min of stimulation. Data are expressed as percentage of control values and are mean  $\pm$  SEM of 4–7 values corresponding to 4 independent experiments. \* $P$  < 0.05 vs. time 0,  $^{\#}P$  < 0.05 vs. E2 alone at the same time-point.



**Fig. 4.** Vasorelaxant responses to estradiol in isolated murine mesenteric arteries. Microvascular segments from murine mesenteric arteries were exposed to cumulative concentrations of E2 (0.1 nM to 1  $\mu$ M) after an initial contraction with noradrenaline (NA; 3  $\mu$ M). (A) Impact of the NO inhibitor L-NAME (100  $\mu$ M) on the vasorelaxant responses of wild-type and Mas-deficient microvessels to E2. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of 25 segments obtained from 12 animals. (B) In some experiments, the microvessels were pre-incubated with the Mas antagonist A779 (1  $\mu$ M), the ER antagonist ICI (1  $\mu$ M), or a combination of both compounds. The vasorelaxant responses to E2 of microvessels from matched Mas-deficient mice were also analyzed. Results are mean  $\pm$  SEM from 63 segments obtained from 25 animals. \* $P$  < 0.05 vs. wild-type and  $^{\#}P$  < 0.05 vs. Mas-deficient.



**Table 1**  
Relaxation of microvascular segments at 1 and 10 nM E2.

	% of relaxation to NA	
	1 nM E2	10 nM E2
Wild type	17.32 ± 3.96	37.72 ± 3.97
Wild type + A779	3.50 ± 1.46 <sup>†</sup>	13.78 ± 2.71 <sup>†</sup>
Wild type + ICI	2.60 ± 1.36 <sup>†</sup>	12.43 ± 2.26 <sup>†</sup>
Wild type + A779 + ICI	1.67 ± 0.55 <sup>†</sup>	7.38 ± 2.19 <sup>†</sup>
Wild type + L-NAME	0.29 ± 0.19 <sup>†</sup>	3.88 ± 1.77 <sup>†</sup>
Mas-deficient	5.58 ± 1.84 <sup>†</sup>	19.10 ± 4.33 <sup>†</sup>
Mas-deficient + L-NAME	0.91 ± 0.90 <sup>†</sup>	6.51 ± 2.17 <sup>†</sup>

The segments were pre-contracted with NA (3 μM) and subsequently exposed to E2 (1–10 nM) alone or combined with A779 (1 μM), ICI (1 μM) or L-NAME (100 μM). Each data is mean ± SEM of 5–20 microvascular segments obtained from 4 to 15 animals <sup>†</sup> P < 0.05 vs. wild type.

in the responses to E2. The pharmacological blockade of and genetic deficiency in the Mas receptor dampen the NO-dependent effects of physiological concentrations of E2. Moreover, the absence of Mas receptors does dramatically impair the microvascular relaxation elicited by E2, thus confirming the crucial role of the Mas receptor.

More than a decade ago, Mas was identified as the main receptor mediating the biological actions of Ang-(1–7) [7]. Mas is a 7 transmembrane domain protein exhibiting features of G-protein coupled receptors. Ang-(1–7) causes vasorelaxation in a number of vascular beds [21–23], and this relaxation is lost in Mas-receptor-deficient mice [7,8]. However, over the last years, Mas has also been identified as key player in the vasodilatory responses elicited by a series of compounds not related to the RAS. Thus, the presence of functional Mas receptors appears to be a critical factor for the microvessels to properly respond to a series of endothelium-dependent vasodilators, including bradykinin or acetylcholine [8,9]. Similar to E2, these vasodilators are mainly NO-dependent. Overall, beyond acting as a receptor for Ang-(1–7), Mas seems to play a critical and broader role in the regulation of the Akt/eNOS/NO pathway and the subsequent vasodilation.

The molecular mechanisms underlying the present results remain to be unveiled. On one hand, E2 increases the production of the Mas agonist Ang-(1–7) [3], which in turn favours Akt and eNOS activation and thus vasorelaxation. Nevertheless, the impact of Mas receptor on the rapid and acute actions of E2 in vitro or ex vivo (Figs. 3C and 4A) does not support a key role for Ang-(1–7). Another possibility to explain the cross-talk between ER and Mas receptor is a potential heteromerization between both receptors. Such kind of interaction has been recently described for the bradykinin B2 receptor and Mas receptor [24], and future studies will confirm whether this also applies for ER-Mas receptor interactions.

Although the impact of the Ang-(1–7)/Mas receptor axis on endothelial-dependent relaxation needs to be understood in more depth, Mas agonists might represent valuable and promising tools to ameliorate the endothelial dysfunction that characterizes a number of vascular diseases.

#### Conflict of interest

None declared.

#### Acknowledgements

Supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (grants FIS PI10/00518 and PI13/00617, SAF-2014-52762-R, PRI-AIBDE-2011-0855 and Red Cardiovascular RD12/0042/0052) and DAAD Project 54367988.

#### References

- [1] M.E. Mendelsohn, R.H. Karas, Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences, *Science* 308 (5728) (2005) 1583–1587.
- [2] A. Sobrino, M. Mata, A. Laguna-Fernandez, S. Novella, P.J. Oviedo, M.A. Garcia-Perez, J.J. Tarin, A. Cano, C. Hermenegildo, Estradiol stimulates vasodilatory and metabolic pathways in cultured human endothelial cells, *PLoS ONE* 4 (12) (2009) e8242.
- [3] A. Mompeón, M. Lázaro-Franco, C. Bueno-Betí, D. Pérez-Cremades, X. Vidal-Gómez, E. Monsalve, M.M. Gironacci, C. Hermenegildo, S. Novella, Estradiol, acting through ER $\alpha$ , induces endothelial non-classic renin-angiotensin system increasing angiotensin 1–7 production, *Mol. Cell. Endocrinol.* 422 (2016) 1–8.
- [4] I. Fleming, Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS, *Pflügers Arch – Eur. J. Physiol.* 459 (6) (2009) 793–806.
- [5] F. Morello, A. Perino, E. Hirsch, Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system, *Cardiovasc. Res.* 82 (2) (2009) 261–271.
- [6] R.A. Santos, Angiotensin-(1–7), *Hypertension* 63 (6) (2014) 1138–1147.
- [7] R.A. Santos, A.C. Simoes e Silva, C. Maric, D.M. Silva, R.P. Machado, I. de Bühr, S. Heringer-Walther, S.V. Pinheiro, M.T. Lopes, M. Bader, E.P. Mendes, V.S. Lemos, M.J. Campagnole-Santos, H.P. Schultheiss, R. Speth, T. Walthers, Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (14) (2003) 8258–8263.
- [8] C. Peiró, S. Vallejo, F. Gembardt, V. Azcutia, S. Heringer-Walther, L. Rodriguez-Manas, H.P. Schultheiss, C.F. Sanchez-Ferrer, T. Walthers, Endothelial dysfunction through genetic deletion or inhibition of the G protein-coupled receptor Mas: a new target to improve endothelial function, *J. Hypertens.* 25 (12) (2007) 2421–2425.
- [9] C. Peiró, S. Vallejo, F. Gembardt, E. Palacios, S. Novella, V. Azcutia, L. Rodriguez-Manas, C. Hermenegildo, C.F. Sanchez-Ferrer, T. Walthers, Complete blockade of the vasorelaxant effects of angiotensin-(1–7) and bradykinin in murine microvessels by antagonists of the receptor Mas, *J. Physiol.* 591 (Pt 9) (2013) 2275–2285.
- [10] A. Sobrino, P.J. Oviedo, S. Novella, A. Laguna-Fernandez, C. Bueno, M.A. Garcia-Perez, J.J. Tarin, A. Cano, C. Hermenegildo, Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor  $\alpha$ , *J. Mol. Endocrinol.* 44 (4) (2010) 237–246.
- [11] P.J. Oviedo, C. Hermenegildo, A. Cano, Raloxifene increases the capacity of serum to promote prostacyclin release in human endothelial cells: implication of COX-1 and COX-2, *Menopause* 11 (4) (2004) 430–437.
- [12] V. Esteban, S. Heringer-Walther, A. Sterner-Kock, B.R. de, E.S. van den, Y. Wang, S. Mezzano, J. Egido, H.P. Schultheiss, M. Ruiz-Ortega, T. Walthers, Angiotensin-(1–7) and the g protein-coupled receptor MAS are key players in renal inflammation, *PLoS ONE* 4 (4) (2009) e5406.
- [13] R.A. Khalil, Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease, *Biochem. Pharmacol.* 86 (12) (2013) 1627–1642.
- [14] C. Hermenegildo, M.C. Garcia-Martinez, J.J. Tarin, A. Cano, Estradiol reduces F2alpha-isoprostane production in cultured human endothelial cells, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283 (6) (2002) H2644–H2649.
- [15] D.R. Alessi, M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen, B.A. Hemmings, Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1, *EMBO J.* 15 (23) (1996) 6541–6551.
- [16] M. Canals, L. Jenkins, E. Kellelt, G. Milligan, Up-regulation of the angiotensin II type 1 receptor by the MAS proto-oncogene is due to constitutive activation of Gq/G11 by MAS, *J. Biol. Chem.* 281 (24) (2006) 16757–16767.
- [17] K.C. Tirupula, R. Desnoyer, R.C. Speth, S.S. Karnik, Atypical signaling and functional desensitization response of MAS receptor to peptide ligands, *PLoS ONE* 9 (7) (2014) e103520.
- [18] F. Gembardt, T. Wieland, J. Zhang, A. Heiss, T. Walthers, The G protein-coupled receptor Mas encoded by the mas proto-oncogene shows mitogenic properties through a constitutive activation of Rho, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 370 (2005).
- [19] G. Douglas, M. Natalia Cruz, L. Poston, J.-Å. Gustafsson, K. Kublickiene, Functional characterization and sex differences in small mesenteric arteries of the estrogen receptor- $\beta$  knockout mouse, *Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol.* 294 (1) (2008) R112–R120.
- [20] K. Zhou, Q. Gao, S. Zheng, S. Pan, P. Li, K. Suo, T. Simoncini, T. Wang, X. Fu, 17 $\beta$ -estradiol induces vasorelaxation by stimulating endothelial hydrogen sulfide release, *Mol. Human Reprod.* 19 (3) (2013) 169–176.
- [21] W.O. Sampaio, A.A.S. Nascimento, R.A.S. Santos, Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1–7) in rats, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284 (6) (2003) H1985–H1994.
- [22] G.A. Botelho-Santos, W.O. Sampaio, T.L. Reudelhuber, M. Bader, M.J. Campagnole-Santos, R.A. Souza dos Santos, Expression of an angiotensin-(1–7)-producing fusion protein in rats induced marked changes in regional vascular resistance, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292 (5) (2007) H2485–H2490.
- [23] G.A. Botelho-Santos, M. Bader, N. Alenina, R.A.S. Santos, Altered regional blood flow distribution in Mas-deficient mice, *Ther. Adv. Cardiovasc. Dis.* 6 (5) (2012) 201–211.
- [24] B.D. Cerrato, O.A. Carretero, B. Janic, H.E. Grecco, M.M. Gironacci, Heteromerization between the Bradykinin B2 receptor and the angiotensin-(1–7) Mas receptor: functional consequences, *Hypertension* 68 (4) (2016) 1039–1048.