

PROYECTO FINAL DE BIOTECNOLOGÍA

**ROL DE LA GALECTINA-1 EN LA PATOGÉNESIS DE
LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL Y EL DAÑO DEL
ÓRGANO BLANCO EN RATONES**

Fleischer, Juan Ignacio – LU: 1101731

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Dra. Miksztowicz, Verónica, BIOMED UCA-CONICET

Co-Tutor:

Sanchis, Pablo Antonio, UADE

18/12/2024

UADE

**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Índice

Índice.....	2
Agradecimientos	4
Resumen.....	5
Abstract	6
1. Introducción.....	7
1.1 Hipertensión Arterial (HTA).....	7
1.2 Fisiopatología de la Hipertensión Arterial	8
1.3 Hipertensión Arterial y Lesión del órgano blanco (corazón y riñón)	10
1.4 Galectina-1	14
1.5 Hipertensión y Estrés Oxidativo	17
1.6 Remodelamiento de la matriz extracelular.....	19
2. Hipótesis.....	21
3. Objetivos	21
4. Objetivo General	21
5. Objetivos específicos.....	21
6. Metodología.....	22
6.1 Modelo Animal	22
6.2 Genotipificación de los animales	23
6.3 Medición de la presión arterial	25
6.4 Evaluación de daño renal	26
6.5 Obtención de muestras	26
6.6 Evaluación de parámetros circulantes y urinarios.....	26
6.7 Evaluación histopatológica y morfometría.	27
6.8 Medición de proteínas por método de Lowry	27
6.9 Evaluación de estrés oxidativo.....	27
6.10 Medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)	28
6.11 Evaluación de la capacidad antioxidante mediante determinación de niveles de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT).	29
6.12 Determinación de la actividad de Superóxido Dismutasa (SOD).....	29
6.13 Determinación de la actividad de Catalasa (CAT).....	30
6.14 Determinación de colágeno mediante cuantificación de hidroxiprolina.	30
6.15 Zimografía gelatinolítica para la determinación de actividad de metaloproteasas MMP-2 y MMP-9	32
7. Análisis estadístico	33

8.	Resultados	34
8.1	Caracterización y puesta a punto del modelo de HTA.....	34
8.2	Seguimiento de la presión arterial.....	35
8.3	Evaluación de la Función Renal	36
8.4	Evaluación de los niveles séricos y urinarios de Urea	36
8.5	Evaluación de la relación de los niveles urinarios de proteínas y creatinina.	37
8.6	Evaluación de niveles de Proteinuria	39
8.7	Evaluación de la Hipertrofia Cardíaca	39
8.8	Determinación del área de los Cardiomiocitos	40
8.9	Determinación del porcentaje de Fibrosis Miocárdica.....	42
8.10	Evaluación del Estrés Oxidativo	44
8.11	Cuantificación de actividad de MMP9.....	44
9.	Discusión.....	45
10.	Conclusión.....	48
11.	Financiamientos.....	49
12.	Referencias	50

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer especialmente a mi tutora, la Dra. Verónica Miksztowicz, de quien aprendí muchísimo a lo largo de este proyecto y quien, junto con el Dr. Germán González, me abrió las puertas de su laboratorio y me dio la posibilidad de llevarlo a cabo. Sin ellos, nada de esto habría sido posible.

También me gustaría agradecerle a Vanessa Touceda, quien nunca dudó en darme una mano y, con paciencia, me mostró las mejores formas de hacer las cosas. Ella, junto a Nacho Moglie y Francisco Alvarado, fue mi compañía y apoyo durante largas tardes en las que los resultados se resistían a aparecer. Definitivamente, fueron una parte fundamental del proyecto.

A mis amigos: tanto a los de la infancia como a los que hice en el camino. Especialmente a Catalina, Julieta y Sol, a quienes conocí al principio de la carrera y de quienes nunca más me quise separar. También a Milagros, los Guidos, Rama, Marce, Mery, Flor y Franquito, con quienes compartí los últimos años de la carrera y a quienes llegué a querer mucho. A Tomy, quien, aunque es mi amigo, cada día lo siento más como un hermano.

Por último, a mi familia, quienes me escucharon quejarse y frustrarme, y supieron apoyarme y acompañarme en cada alegría de mi vida.

Resumen

La hipertensión arterial (HTA) representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel global. Se caracteriza por una elevación sostenida de la presión arterial que, de no ser tratada, puede conducir a complicaciones cardiovasculares graves, como el infarto de miocardio, el accidente cerebrovascular, la insuficiencia cardíaca y el daño renal crónico. Su etiología es multifactorial, influenciada por factores genéticos, ambientales y relacionados con el estilo de vida.

En años recientes, la investigación científica ha resaltado el papel de los procesos inflamatorios y el remodelado vascular en el desarrollo y progresión de la HTA. Dentro de este contexto, la galectina-1 (Gal-1), una lectina de unión a beta-galactósidos, ha surgido como un mediador potencialmente relevante en las enfermedades cardiovasculares. Gal-1 cumple funciones biológicas clave, como la modulación de la respuesta inmune, la regulación de la angiogénesis y el control del crecimiento celular.

Evidencias recientes sugieren que Gal-1 podría estar implicada en el remodelado del tejido vascular y en los procesos inflamatorios asociados a la HTA, así como también en el remodelado del tejido cardíaco. Además, su expresión parece estar regulada por condiciones de estrés oxidativo y daño endotelial, dos características centrales de esta patología.

En el presente proyecto proponemos estudiar si la HTA inducida por Angiotensina II se asocia a una reducción en la expresión de Gal-1, a hipertrofia y fibrosis miocárdica, así como también a mecanismos de estrés oxidativo alterados.

Abstract

Arterial hypertension (HTN) represents one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. It is characterized by a sustained elevation of blood pressure that, if untreated, can lead to severe cardiovascular complications such as myocardial infarction, stroke, heart failure, and chronic kidney damage. Its etiology is multifactorial, influenced by genetic, environmental, and lifestyle-related factors.

In recent years, scientific research has highlighted the role of inflammatory processes and vascular remodeling in the development and progression of HTN. In this context, galectin-1 (Gal-1), a beta-galactoside-binding lectin, has emerged as a potentially relevant mediator in cardiovascular diseases. Gal-1 plays key biological roles, such as modulating the immune response, regulating angiogenesis, and controlling cell growth.

Recent evidence suggests that Gal-1 may be involved in vascular tissue remodeling and inflammatory processes associated with HTN, as well as in cardiac tissue remodeling. Additionally, its expression appears to be regulated by oxidative stress and endothelial damage, two central features of this pathology.

In the present project, we propose to study whether Angiotensin II-induced HTN is associated with a reduction in Gal-1 expression, myocardial hypertrophy and fibrosis, as well as altered oxidative stress mechanisms.

1. Introducción

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el número de adultos de entre 30 y 79 años con hipertensión arterial (HTA) ha aumentado de 650 millones a 1280 millones en los últimos treinta años (World Health Organization, 2021; ZHOU *et al.*, 2021). De ellos, se estima que más del 50% nunca han sido diagnosticados y/o tratados, aun teniendo en cuenta la sencillez de su diagnóstico y el bajo costo de los tratamientos modernos, lo que representa un motivo de preocupación a nivel mundial.

1.1 Hipertensión Arterial (HTA)

La presión arterial (PA) es la fuerza que ejerce la sangre sobre las paredes de los vasos sanguíneos al circular por el organismo, la misma puede ser medida a través de la utilización de distintas herramientas tales como tensiómetros, considerándose normales los valores de 120 mmHg para la presión sistólica y 80 mmHg para la presión diastólica.

Aquellos pacientes cuyos valores de presión, tanto sistólica como diastólica, oscilan por encima de los rangos considerados normales son a los que se los cataloga como pacientes hipertensos.

La HTA es un trastorno en el que los vasos sanguíneos soportan una tensión persistentemente alta pudiendo producir lesiones crónicas en la propia pared vascular como así también en la estructura y función de diferentes órganos. En el siguiente cuadro, se muestran los rangos de presión arterial considerados normales y aquellos asociados a un cuadro hipertensivo:

CLASIFICACION	PRESIÓN SISTOLICA	PRESIÓN DIASTOLICA
NORMAL	<120 mmHg	<80 mmHg
ELEVADA	120-129 mmHg	<80 mmHg
HIPERTENSIÓN GRADO 1	130-139 mmHg	80-89 mmHg
HIPERTENSIÓN GRADO 2	>=140 mmHg	>= 90 mmHg

Tabla 1: Clasificación de la presión arterial.

La HTA es un síndrome o cuadro clínico que constituye un factor de riesgo independiente para las enfermedades cardiovasculares (ECV), como la cardiomiopatía hipertensiva (HC, *hypertensive cardiomyopathy*), insuficiencia cardíaca (CI, *cardiac insufficiency*), cardiopatía coronaria (CHD, *coronary heart disease*), insuficiencia congestiva cardíaca (CHF, *congestive heart failure*), enfermedad cerebrovascular isquémica y hemorrágica, insuficiencia renal y arteriopatía periférica (PAD, *peripheral arterial disease*), entre otras (JAMESON *et al.*, 2018).

Tradicionalmente, estas patologías han sido vinculadas únicamente a factores hemodinámicos, siendo estos los principales enfoques de los tratamientos con fármacos antihipertensivos. Sin embargo, en los últimos años, numerosas evidencias han propuesto que el sistema inmune puede tener un rol clave en la patogénesis de la enfermedad y en la lesión de órgano blanco que acompaña a la hipertensión crónica, promoviendo la inflamación y la fibrosis de los mismos (SEROPIAN *et al.*, 2013).

1.2 Fisiopatología de la Hipertensión Arterial

Para plantear datos básicos que permitan entender la patogenia de la HTA, es de utilidad conocer los factores que intervienen en la regulación normal y elevada de la presión arterial. Los factores determinantes de la presión arterial son el gasto cardíaco y la resistencia periférica. El primer factor (gasto cardíaco) depende del volumen sistólico y la frecuencia cardíaca; el volumen sistólico depende de la contractilidad del miocardio, es decir, la fuerza de eyección o fuerza de bombeo que tiene el corazón para impulsar la sangre hacia el organismo a través de la arteria aorta. Ante el aumento de la poscarga, consecuencia de una presión arterial elevada, el ventrículo izquierdo se hipertrofia de manera gradual provocando en una primera instancia disfunción diastólica y

seguidamente disfunción sistólica. El segundo (resistencia periférica) es regido por los cambios funcionales y anatómicos en las arterias de fino calibre (diámetro interior, 100-400 μm) y arteriolas. Estos cambios de diámetro, tanto de vasoconstricción como de vasodilatación, están regulados a través del sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (RAA). El sistema RAA contribuye a regular la presión arterial principalmente por medio de las propiedades vasoconstrictoras de la Angiotensina II (ANGII) y las propiedades de retención de sodio de la aldosterona. Dicho sistema se activa en condiciones de baja presión arterial, disminución del filtrado glomerular o con un aumento de las catecolaminas producto de un estímulo simpático. En estas condiciones habrá una activación y liberación de la Renina, la cual se encargará de escindir al Angiotensinógeno plasmático, dando lugar a la formación de Angiotensina I (ANGI) y posteriormente a la formación de Angiotensina II (mediante la intervención de la enzima convertidora de Angiotensina presente en la circulación pulmonar) (**Figura 1**).

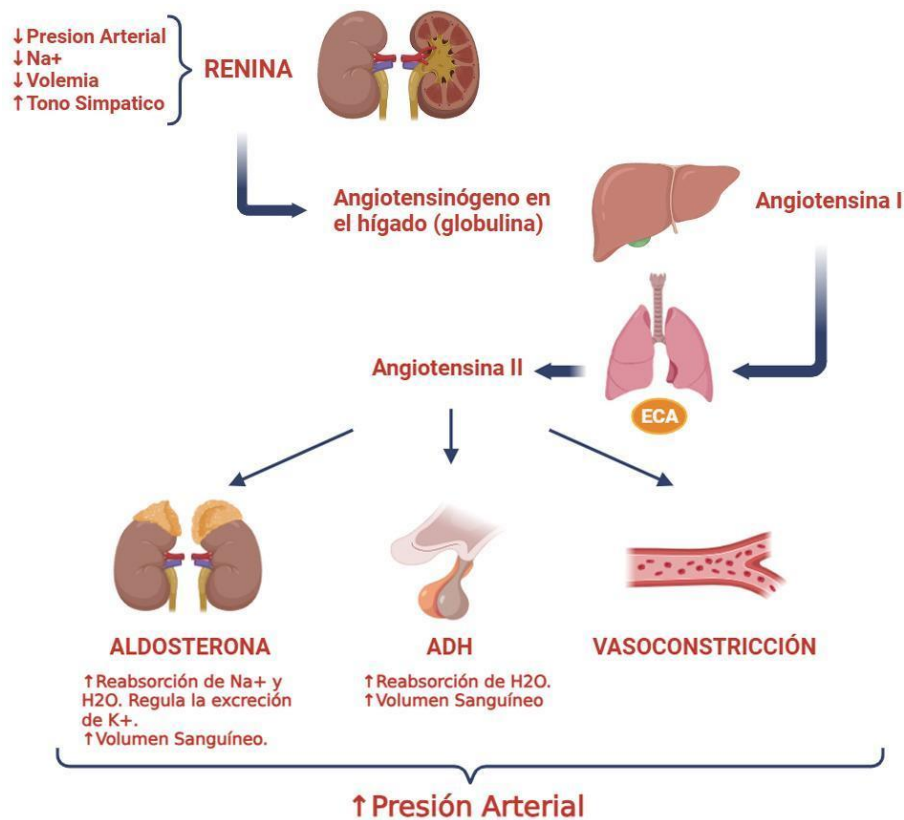


Figura 1. Esquema del Sistema RAA. ECA, Enzima Convertidora de Angiotensina; ADH, Antidiuretic Hormone.

La ANGII tiene entre sus funciones principales inducir la contracción vascular, estimular la secreción de aldosterona y aumentar la tasa de reabsorción tubular. Esto en conjunto aumentará la presión arterial ya que la secreción de aldosterona promueve la recaptación de moléculas de Na^+ en los túbulos contorneados del riñón, efecto que resulta en una mayor retención de agua, lo que produce un aumento en el volumen sanguíneo.

Debido a la vasoconstricción de los vasos sanguíneos producto de una sobreestimulación del sistema RAA (por lo tanto, un aumento en la resistencia vascular), las paredes de los vasos sanguíneos sufrirán un engrosamiento producto del remodelamiento de las mismas. Esto puede ser mediante la hipertrofia, en el caso de que aumente el tamaño de las células, o de una hiperplasia, en el caso de que aumente el número de las mismas, dando como resultado en ambos casos arterias con un diámetro interior menor lo que en consecuencia produciría un flujo inadecuado de la sangre y un aumento en la presión arterial (JAMESON *et al.*, 2018; BAKRIS *et al.*, 2023; WAGNER-GRAU *et al.*, 2010).

De esta manera, un aumento artificial de ANGII produciría un cuadro hipertensivo previsible en el sujeto de estudio, en función a la dosis aplicada.

1.3 Hipertensión Arterial y Lesión del órgano blanco (corazón y riñón)

La ANGII se ha reconocido como un potente agente vasoconstrictor tanto a nivel local como sistémico, desempeñando un rol clave en la reabsorción de agua y sodio en los segmentos tubulares distales de la nefrona con el fin de aumentar la presión arterial. Sin embargo, se ha observado que las consecuencias de la exposición a ANGII se presentan de forma temprana y tardía en los distintos órganos involucrados.

La ANGII interactúa con las células a través de receptores de membrana específicos llamados AT1 y AT2 (entre otros), los cuales se acoplan a proteínas G transmembrana, produciendo así respuestas diferenciadas en función del tipo de receptor activado. Esta hormona, a través del receptor AT1, desempeña su efecto vasopresor,

estimula el sistema nervioso simpático, promueve la reabsorción de Na^+ y H_2O en los riñones y regula el crecimiento, la proliferación celular y la fibrosis mediante la activación de diversos factores de transcripción nuclear, entre ellos STAT, CREB y AP-1 (MARRERO *et al.*, 1995; STANLEY NAHMAN *et al.*, 1996). Dado que esta hormona estimula la proliferación de músculo liso, engrosa la capa media de los vasos sanguíneos, los cuales con el tiempo se irán fibrosando, disminuyendo la luz del vaso y perpetuando así la HTA consecuencia de un aumento en la resistencia vascular periférica. A su vez, influirá en el remodelado cardíaco estimulando la deposición de matriz extracelular intersticial y produciendo así rigidez y pérdida de contractilidad en el órgano. En contraposición, el receptor AT2, se encarga de ejercer una función opuesta al del AT1, produciendo vasodilatación, natriuresis, inhibición del sistema nervioso simpático e inhibición de la producción de renina (CAREY *et al.*, 2016).

Por otro lado, se ha demostrado que estos receptores comparten un mismo efecto ya que ambos desencadenan la activación del factor de transcripción NF-KB en células mesangiales y en células del músculo liso (RUIZ-ORTEGA *et al.*, 2000, 2001), el cual ejerce un rol fundamental en el control de genes involucrados en la inflamación y en el daño vascular y renal, tales como citoquinas, angiotensinógeno, NO sintetasa, entre otros (RUIZ-ORTEGA *et al.* 2001).

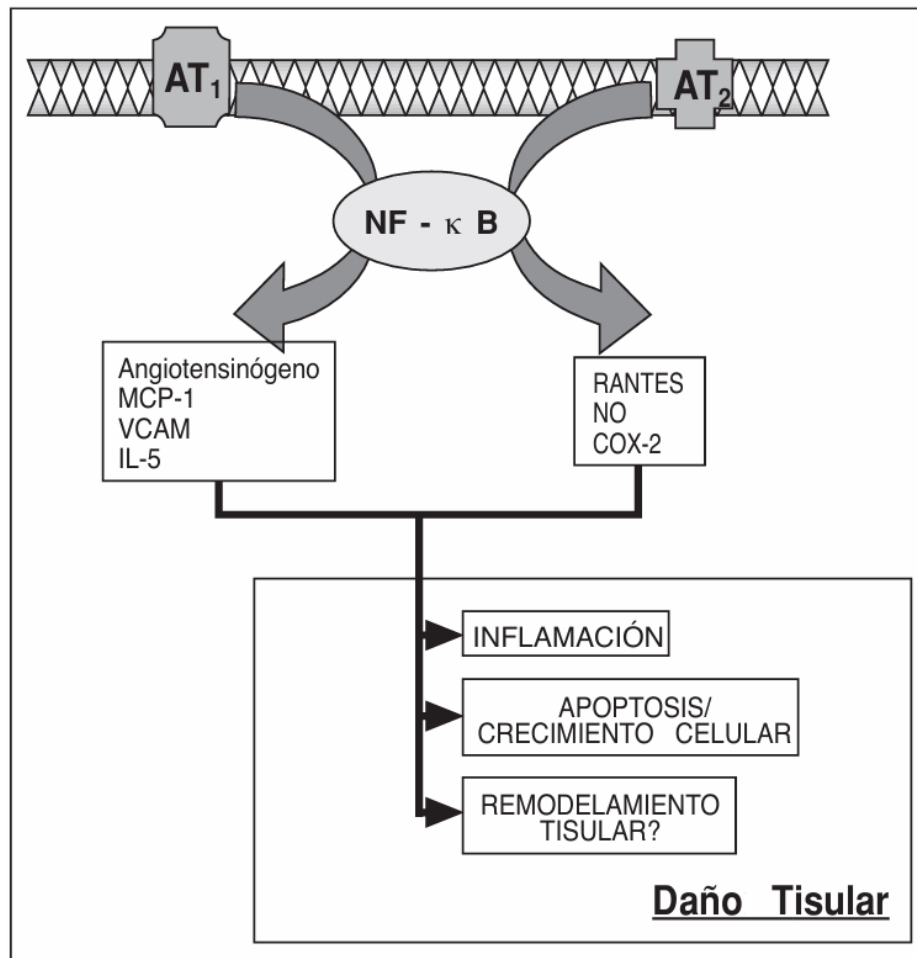


Figura 2. Participación del factor de transcripción NF-KB en el daño tisular mediado por ANGII. Imagen extraída de la publicación de *Egido, J. et al. Revista Nefrología, 2003.*

Dada la fisiopatología de la HTA el corazón debe bombear con mayor fuerza de lo normal provocando no solo daño y fibrosis al órgano en cuestión, sino también a los vasos sanguíneos de todo el cuerpo. Si los vasos sanguíneos de los riñones se ven afectados o dañados, es posible que se vea disminuida la función de eliminación de desechos y de exceso de líquido en el cuerpo provocando, a su vez, que dicho líquido aumente el volumen intravascular subiendo aún más la presión arterial y el gasto cardíaco (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2014).

La tasa de filtrado glomerular (TFG) es un parámetro esencial para la evaluación de la función renal, que refleja el volumen de sangre filtrado por los glomérulos por

minuto. Los glomérulos, estructuras especializadas formadas por redes capilares, desempeñan un papel fundamental en la filtración de la sangre y la excreción de productos de desecho a través de la orina.

Dado que la medición directa de la TFG resulta técnicamente compleja, se recurre a su estimación mediante marcadores biológicos, como los niveles séricos de creatinina y urea, entre otros. Adicionalmente, el daño renal puede ser detectado de manera sencilla a través de la relación proteína/creatinina en orina. En condiciones fisiológicas, la excreción urinaria de proteínas es mínima; por lo tanto, un incremento en esta relación es indicativo de alteraciones en la barrera de filtrado glomerular, lo que sugiere un daño estructural en los glomérulos.

La evaluación combinada de la TFG estimada y la relación proteína/creatinina en orina proporciona un enfoque integral para la valoración de la función renal y la detección temprana de patologías renales, siendo herramientas fundamentales en la práctica clínica y en la investigación nefrológica.

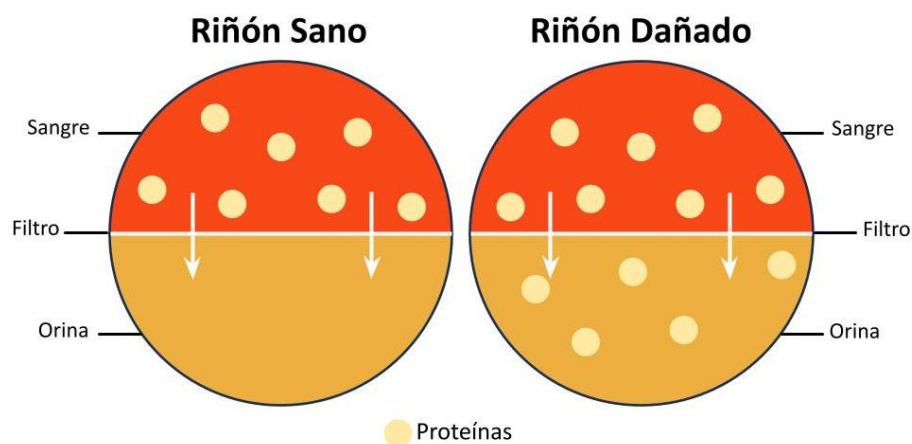


Figura 3. Esquema de pérdida de la función renal.

La creatinina es un producto de desecho fruto del metabolismo muscular. A su vez, la urea es producida en el hígado como resultado del catabolismo proteico. Ambas sustancias son filtradas y excretadas por los riñones, por lo tanto, en un paciente con una enfermedad renal producto de una HTA sostenida, sería esperable que los niveles de

creatinina y urea séricos se vean incrementados, mientras que los niveles de dichas moléculas se vean disminuidos en la orina (LEGUIZAMÓN *et al.*, 2014; SEIJAS *et al.*, 2014).

1.4 Galectina-1

La galectina-1 (Gal-1) es una proteína de 14 kDa de expresión ubicua que pertenece a la familia de las lectinas, proteínas altamente conservadas evolutivamente. Estas lectinas se encuentran expresadas en distintos tipos celulares y ejercen su función mediante la unión a β -galactósidos, traduciendo el reconocimiento de glicoconjugados en función biológica (LAAF *et al.*, 2019). Gal-1 actúa controlando la homeostasis de células inmunitarias, promoviendo la expansión de células T reguladoras (Treg) y moderando la inflamación aguda y crónica, atenuando la producción de citoquinas proinflamatorias, entre otros mecanismos, por lo que se le ha asociado principalmente con procesos antiinflamatorios (RABINOVICH *et al.*, 2000; SEROPIAN *et al.*, 2018).

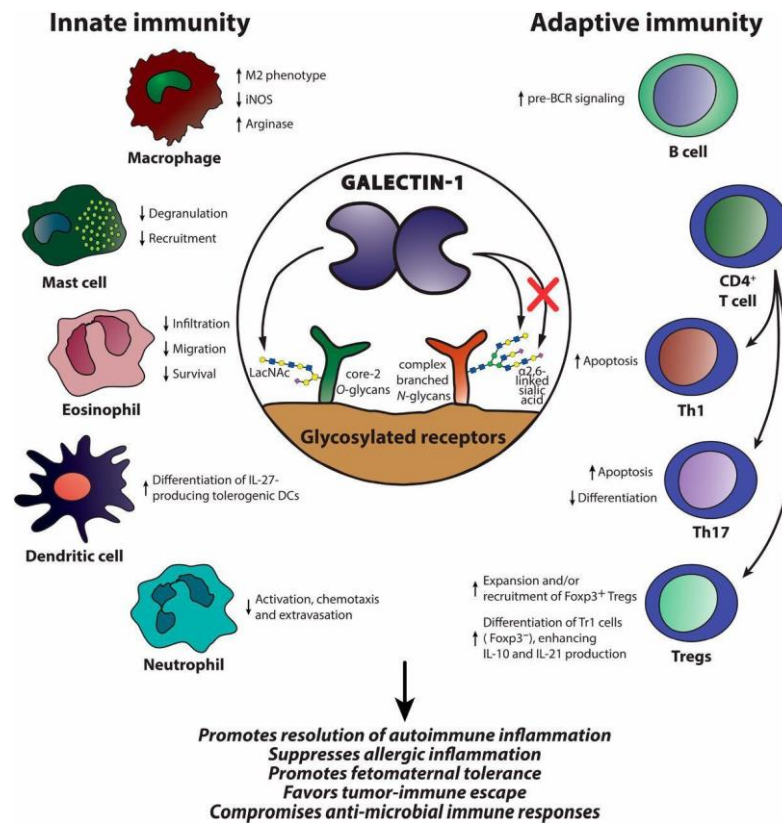


Figura 4. Participación de Gal-1 en procesos inmunes. Imagen extraída de la publicación de Sundblad, V. et al, 2017.

A través de la interacción con glicoconjugados de la matriz extracelular, Gal-1 es capaz de modular procesos biológicos tales como la activación celular, proliferación, migración y supervivencia, por lo que se le ha atribuido principalmente un rol crítico en la resolución de la inflamación crónica y aguda (BRINCHMANN *et al.*, 2018; CEDENO-LAURENT *et al.*, 2012; SMETANA *et al.*, 2013; SUNDBLAD *et al.*, 2017). Adicionalmente, se ha observado que Gal-1 promueve la neovascularización a través de la señalización mediante el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-2) (CROCI *et al.*, 2012, 2014). Debido a su marcado rol antiinflamatorio, la Gal-1 se ha propuesto como mediador clave en la homeostasis cardiovascular (SEROPIAN *et al.*, 2013).

A su vez, se sabe que el desarrollo de la hipertensión arterial está estrechamente relacionado con la inflamación. La interacción entre las células vasculares y las células

proinflamatorias al inicio de la enfermedad desempeña un papel clave en su evolución. Los linfocitos T efectores, que forman parte del sistema inmune adaptativo, tienen un rol en la constricción de los vasos sanguíneos en la hipertensión. Estos linfocitos son activados mediante señales del sistema nervioso central y de las células presentadoras de antígeno, lo que acelera su diferenciación hacia linfocitos proinflamatorios T helpers (Th-1) y Th-17. Estas células efectoras, producto de mediadores proinflamatorios, participan en la inflamación que conduce al incremento de la presión arterial y al daño de los órganos blanco (IDRIS-KHODJA *et al.*, 2014).

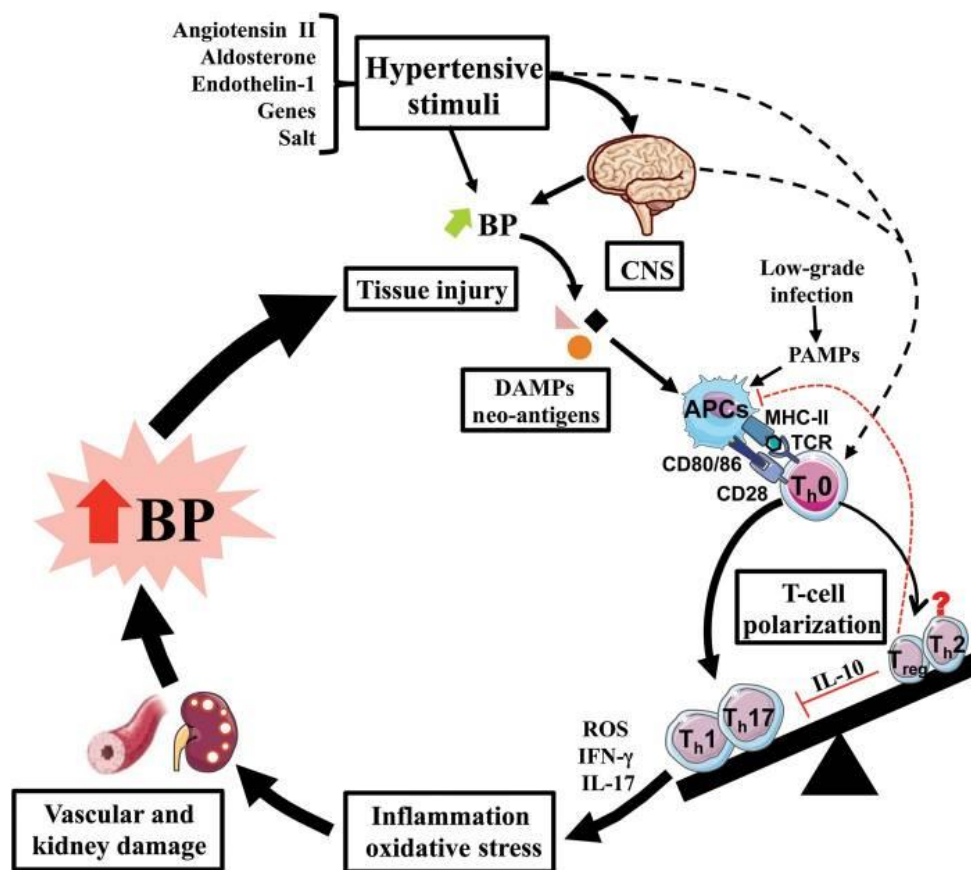


Figura 5. Rol de los linfocitos T efectores y reguladores en el desarrollo de la hipertensión arterial. BP, Blood Pressure; CNS, central nervous system; DAMP, Danger Associated Molecular Pattern; PAMP, Pathogen-associated molecular patterns; APC, Antigen-Presenting Cells. Imagen extraída de la publicación de *Idris-Khodja, N. et al. European heart journal, 2014.*

Por último, estudios previos se han propuesto para investigar el rol de Gal-1 en la mediación de la inflamación cardíaca, encontrando que la expresión de dicha proteína se incrementa en pacientes con infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca y miocardiopatía chagásica. Asimismo, en ratones KO para el gen de Gal-1 se observó que presentaban una mayor susceptibilidad a enfermedades inflamatorias crónicas y desarrollaban miocarditis autoinmune y disfunción cardíaca, lo que reforzaría su rol fundamental y su función central en la homeostasis cardiovascular (SEROPIAN *et al.*, 2018).

1.5 Hipertensión y Estrés Oxidativo

Como ya se ha mencionado, la HTA es considerada un importante factor de riesgo para la salud cardiovascular y un agravante para las enfermedades cardiovasculares preexistentes. Durante el transcurso de esta enfermedad, se descompensan las vías regulatorias de la PA llevando al paciente, de no ser tratado, a una exposición prolongada a hormonas tales como la ANGII. A su vez, se ha observado que la exposición crónica a ANGII produce efectos aterogénicos no reproducibles con otras hormonas vasopresoras tales como la noradrenalina, lo que sugiere que este efecto es independiente del efecto aterógeno per se de la hipertensión arterial (WEISS *et al.*, 2001).

Esta acción aterogénica producida por la ANGII se da a través del estrés oxidativo (EO), el cual promueve inflamación crónica (IC) en los vasos sanguíneos, produciendo daño endotelial y rigidez vascular, siendo estos, dos importantes vehículos para el desarrollo de la HTA y otras enfermedades cardiovasculares (FRANCO *et al.*, 2022).

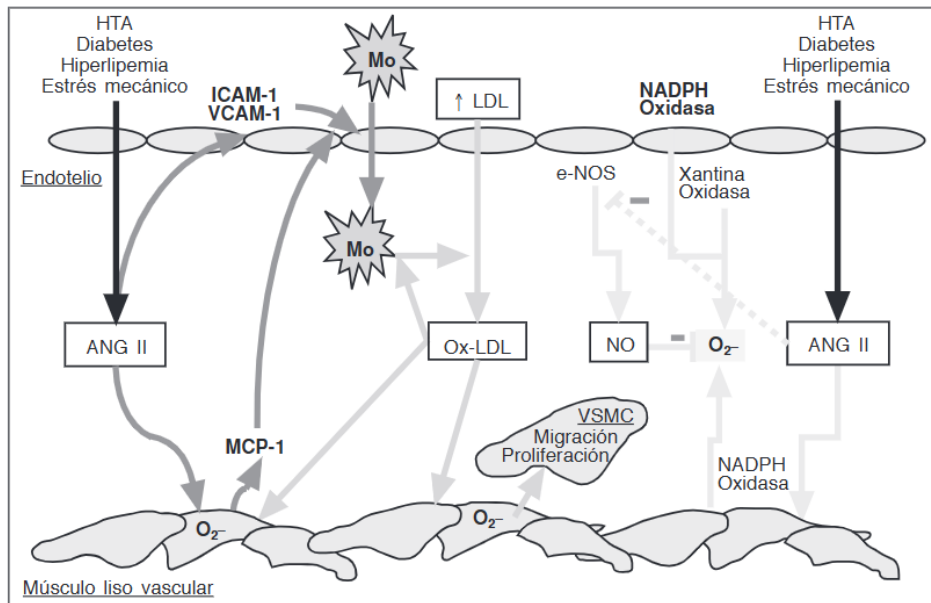


Figura 6. Participación de ANGII en el desarrollo de la arteriosclerosis. MCP-1, Proteína quimiotáctica de monocitos 1; ICAM-1, Proteína de adhesión molecular 1; VCAM-1, Proteína de adhesión celular vascular 1; Mo, Monocitos; LDL, Lipoproteína de baja densidad; VSMC, Células de la musculatura lisa vascular; NO, Óxido Nítrico; NOS, Óxido Nítrico Sintetasa. Imagen extraída de la publicación de *Egido, J. et al.*

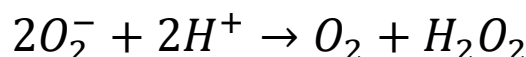
Revista Nefrología, 2003.

El EO consiste en un desbalance del equilibrio entre componentes antioxidantes/prooxidantes, que provoca la disrupción de los mecanismos de señalización y control celular, favoreciendo procesos prooxidativos y/u obstaculizando mecanismos antioxidantes.

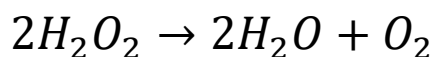
A través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial se producen una serie de procesos de oxido-reducción que generan especies reactivas del oxígeno (ERO), las cuales son capaces de oxidar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, afectando de esta forma su estructura y función. Sin embargo, existen agentes antioxidantes endógenos como la superóxido dismutasa (SOD) o la catalasa (CAT), entre otras, que se encargan de mantener concentraciones basales de ERO y con ello preservar adecuadamente las funciones biológicas del individuo. Por lo tanto, una baja concentración de antioxidantes o una baja actividad de los mismos puede significar mayor probabilidad de daño por

estrés oxidativo (DELGADO ROCHE *et al.*, 2009).

Como se ha mencionado, la SOD y la CAT son dos enzimas cruciales en la defensa antioxidante de los organismos vivos. La SOD se encarga de la dismutación del radical superóxido (O_2^-), un subproducto tóxico del metabolismo celular, convirtiéndolo en oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este peróxido de hidrógeno, aunque menos dañino que el superóxido, aún puede ser perjudicial para las células.



En este punto es donde entra en juego la catalasa, la cual cataliza la descomposición del H_2O_2 en agua (H_2O) y oxígeno molecular (O_2), mitigando así su potencial daño.



La acción conjunta de estas enzimas es fundamental para mantener el equilibrio redox en las células y protegerlas contra el estrés oxidativo, que está asociado con diversas enfermedades, entre ellas la HTA, el envejecimiento y deterioro de los tejidos.

A su vez, los lípidos, son moléculas susceptibles a la oxidación por radicales libres (entre los que se encuentran las ERO). Dichos radicales libres causan la peroxidación de las moléculas lipídicas, particularmente aquellas que componen la membrana celular. Estos peróxidos lipídicos pueden generar nuevos radicales capaces de estimular nuevamente la peroxidación lipídica o la formación de productos terminales del proceso oxidativo como malondialdehído, hidroxinonenal y hexanal, teniendo estos características y toxicidades diversas. Estos compuestos de bajo peso molecular son capaces de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico permitiendo así la cuantificación del nivel de peroxidación lipídica presente en el tejido (AGUILAR DIAZ DE LEON *et al.*, 2020; NIKI *et al.*, 2019; GAXIOLA-ROBLES *et al.*, 2013; MUÑIZ *et al.*, 2014).

1.6 Remodelamiento de la matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) es una red tridimensional compleja multimolecular constituida por colágeno, fibras de elastina, glicoproteínas estructurales como la

fibronectina y laminina, entre otras, que proporciona soporte estructural a las células.

Asimismo, la fibrosis se define como la acumulación excesiva de tejido conectivo fibroso, el cual se compone principalmente por los componentes de la MEC, en el tejido dañado o en sus alrededores, lo que puede derivar en una cicatriz permanente, mal funcionamiento del órgano y, en última instancia, la muerte por insuficiencia cardíaca en el caso del tejido cardíaco (BATALLER *et al.*, 2005; WYNN *et al.*, 2011, 2012).

La fibrosis, sin embargo, es el resultado fisiológico más común para muchas enfermedades inflamatorias. Este mecanismo de deposición de colágeno es típicamente reversible e indispensable para reparar tejido dañado y en la cicatrización de heridas. No obstante, en situaciones donde la lesión al tejido es severa o se ve inflamado de manera crónica, este mecanismo puede verse desregulado.

Aunque la fibrosis puede desencadenarse por diversos factores, entre ellos la ya mencionada inflamación crónica, una característica común de las condiciones fibrosantes es la activación de los miofibroblastos. Estas células representan una subpoblación de fibroblastos con un fenotipo similar al de las células del músculo liso, las cuales son fundamentales en los diferentes procesos de reparación y regeneración que ocurren en los distintos órganos, llevando a cabo la producción y secreción de los distintos componentes de la MEC (BOCHATON-PIALLAT *et al.*, 2016).

La MEC está continuamente en un estado de balance fisiológico entre la degradación y la síntesis de la misma, por ello, se pudo observar que las distintas patologías existentes se caracterizan por un remodelamiento particular de la MEC, donde diversos factores y enzimas proteolíticas se ven involucrados.

Las metaloproteinasas (MMPs, por sus siglas en inglés) son las principales enzimas involucradas en la degradación de los distintos componentes de la MEC, desempeñando así un papel crucial en el remodelamiento tisular. Las MMPs están involucradas en procesos fisiológicos normales, como la cicatrización de heridas y el desarrollo embrionario, pero también desempeñan un papel importante en distintas patologías como las enfermedades cardiovasculares (VALENZUELA *et al.*, 2000;

FLAMANT *et al.*, 2007).

Las MMP-2 y MMP-9, también conocidas como gelatinasas A y B, son gelatinasas zinc-calcio dependientes, ampliamente estudiadas en distintas patologías cardiovasculares dado su participación en el remodelamiento de la MEC tanto a nivel cardíaco como vascular. Estas enzimas están reguladas a nivel de la expresión génica, secreción y activación.

En condiciones de hipertensión, la expresión y actividad de estas enzimas puede contribuir al remodelamiento vascular y la hipertrofia del ventrículo izquierdo, producto de la acumulación de colágeno y otros componentes de la MEC en el espacio extracelular. Esta acumulación progresiva de colágeno intersticial contribuye a la rigidez miocárdica y en última instancia, a la disfunción ventricular e insuficiencia cardíaca.

2. Hipótesis

En un modelo animal de hipertensión arterial (HTA) inducida por Angiotensina II (ANGII) la ausencia de Galectina-1 (Gal-1) exacerba la hipertensión arterial, la fibrosis miocárdica e incrementa la disfunción ventricular.

3. Objetivos

4. Objetivo General

El objetivo general del presente trabajo de tesis es estudiar el rol de Gal-1 en la patogénesis de la HTA, la lesión de órgano blanco y la disfunción ventricular. A su vez, se propone evaluar si la delección de Gal-1 altera factores asociados al remodelamiento de la matriz extracelular, al estrés oxidativo y la fibrosis miocárdica.

5. Objetivos específicos

En ratones macho de las cepas C57BL/6 y con delección genética de Gal-1 (Gal-1 KO) con HTA inducida por ANGIOII evaluar:

1. Cambios en la presión arterial sistólica y marcadores de daño renal.

2. Modificaciones en el área de los cardiomiocitos y en el depósito de colágeno intersticial.
3. Marcadores de remodelamiento de la matriz extracelular y de estrés oxidativo en el tejido cardíaco.

6. Metodología

6.1 Modelo Animal

Se utilizaron ratones macho C57BL/6 (Wild-Type, n=10) y con delección genética de Gal-1 (Gal-1 KO, n=10), de 8 semanas de edad criados en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED UCA-CONICET) en condiciones controladas de temperatura (20-22°C) y flujo de aire, con un régimen de 12 h de luz/oscuridad con acceso a agua y alimento *ad libitum*. Todo el material en contacto con los animales (jaulas, botellas, etc.) fue previamente esterilizado por autoclave con el propósito de mantener las condiciones de asepsia y esterilidad y asegurar una zona libre de patógenos. Los animales fueron tratados siguiendo los lineamientos de ética y cuidado impartidos por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio o Experimentación (CICUAL) de BIOMED en lineamiento con el NIH's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Los animales fueron anestesiados con Ketamina (75 mg/kg) y Xilazina (0.75 mg/kg) de manera intraperitoneal (IP) y fueron divididos al azar en 4 grupos de tratamiento: C57BL/6+ANGII (WT+ANGII, n=5), Gal-1KO+ANGII (n=5), C57BL/6+Vehículo (WT+VH, n=5), Gal-1KO+Vehículo (Gal-1KO+VH, n=5). Los grupos control recibieron de manera continua, durante 4 semanas, únicamente el vehículo (VH) de la hormona ANGII siendo este ácido acético 0,01 N. A su vez, el grupo tratado con la hormona recibió de manera continua, durante 4 semanas, la ANGII resuspendida en el vehículo previamente mencionado.

Para llevar a cabo la perfusión, se implantó de manera subcutánea y en condiciones asépticas, una mini bomba osmótica (Alzet® 2004, Durect, Cupertino, CA)

la cual suministro, a los animales, en forma continua 3 µg/min/kg de ANGII al grupo expuesto a la misma o únicamente su vehículo a aquellos animales del grupo control, a lo largo del tratamiento (OLIVARES-SILVA *et al.*, 2021; GUAN *et al.*, 2017; LIN *et al.*, 2011; SRIRAMULA *et al.*, 2011).

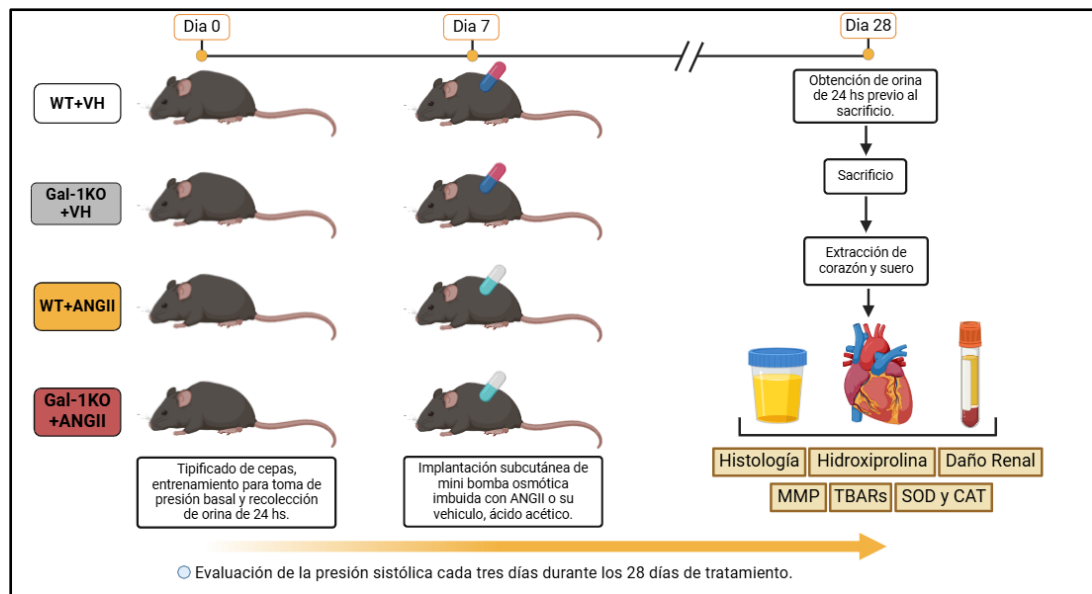


Figura 7. Diseño experimental. Diagrama a modo de resumen de los experimentos llevados a cabo con los animales en estudio.

Grupo	Tamaño de Grupo	Tratamiento
WT+VH	n=5	Vehículo
WT+ANGII	n=5	Angiotensina II
Gal-1KO+VH	n=5	Vehículo
Gal-1KO+ANGII	n=5	Angiotensina II

Tabla 2: Resumen de los grupos experimentales. Esta tabla indica el tamaño de cada grupo en estudio, así como también el tratamiento particular empleado en cada uno.

6.2 Genotipificación de los animales

Previo al desarrollo del modelo experimental, los animales fueron tipificados

mediante reacción de PCR utilizando primers específicos para Galectina-1, cuya secuencia se puede ver en la **Tabla 3**.

Para la obtención del ADN, se viviseccionaron aproximadamente 2 mm de la cola del animal y se colocó en un eppendorf con 300µl de NaOH 25 mM/ EDTA 0,2 mM, en un baño húmedo a 98°C por 60 min. Una vez transcurrido dicho tiempo se agregó 300µl de Tris – HCL 40 mM pH 5,5 y se centrifugó a 10 000 RPM por 10 min a 4°C, para luego conservar el sobrenadante. Para la máster mix se utilizó la GoTaq® green (M7122, Promega).

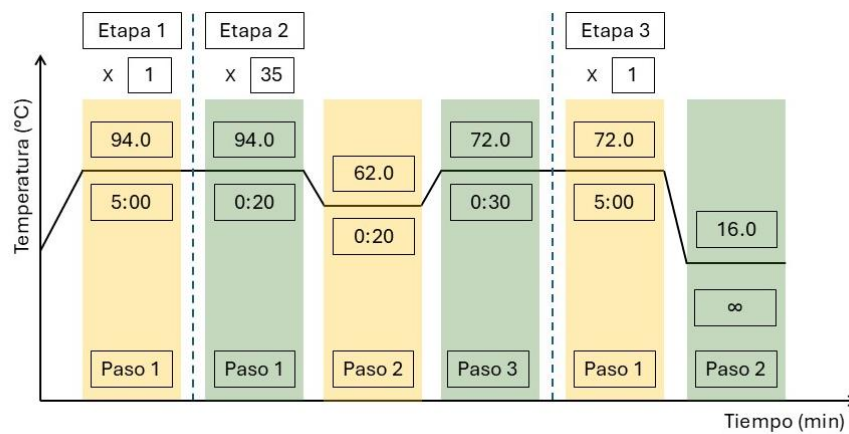


Figura 8. Ciclos de PCR. Ciclos de PCR punto final utilizados para la amplificación del gen de Gal-1.

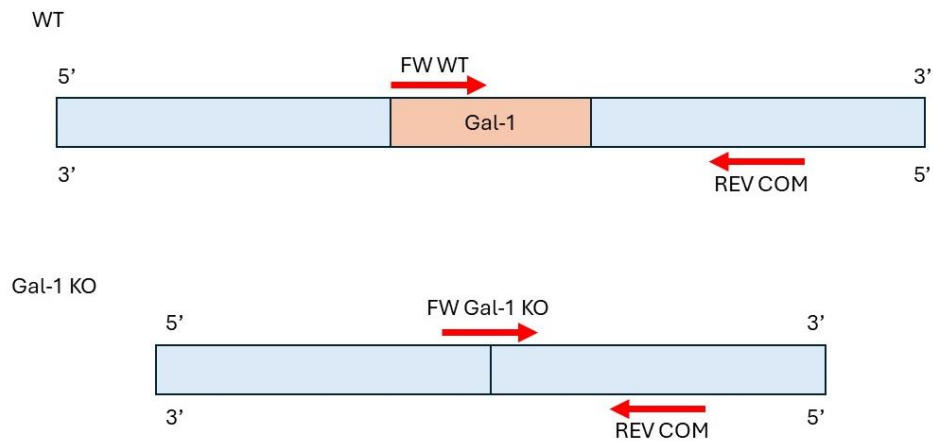


Figura 9. Gráfico de hibridación de primers. FW, Forward; WT, Wild Type; REV, Reverse; COM, Common; Gal-1 KO, Galectina-1 Knock-Out.

Los amplicones fueron corridos en una cuba de electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

Gen	Primer	Secuencia del primer
Galectina-1	Forward WT (5' a 3')	GACCCCATCCCTACACCCAG
	Forward Gal-1 KO (5' a 3')	CTATCAGGACATAGCGTTGG
	Reverse COMMONG (5'a 3')	AAACTTCAGCCGGGAGAAAGG

Tabla 3. Secuencias de primers utilizados. Secuencia de primers utilizados para la reacción de PCR específica para gen de Galectina-1.

6.3 Medición de la presión arterial

La medición de la presión arterial sistólica (PAS) se realizó con los animales conscientes tres veces por semana, previo a la colocación de las minibombas osmóticas para obtener la presión arterial basal y durante toda la experiencia a través de un pletismógrafo MP100 Pulse Transducer, PanLab (Quad Bridge Amp, ADInstruments), colocado en la cola y grabado con un polígrafo (Quad Bridge Amp, ADInstruments).

Durante la toma de presión, se registró 10 veces la presión del animal en un intervalo de 5 minutos. Dichas presiones fueron promediadas, siendo este el valor único considerado para cada día del registro de la PAS para cada animal. Los valores se

obtuvieron mediante un software (PowerLab 8/30 and Labchart, Australia).

6.4 Evaluación de daño renal

Para evaluar el daño renal se recolectó, al inicio y al final de la experiencia, orina de 24hs en jaulas metabólicas. Para ellos se colocaron los animales en jaulas metabólicas con acceso a agua y comida *ad libitum* durante 48 hs en un ambiente adecuado para el bienestar del animal con ciclo de luz/oscuridad y temperatura adecuada, para lograr el acostumbramiento. Posteriormente, al tercer día, se recolectó la orina de 24 hs y se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos para eliminar los residuos sólidos. La diuresis de 24 hs se determinó por gravimetría. En las muestras de orina se evaluaron los niveles de urea, creatinina y proteinuria, en un autoanalizador Cobas C-501.

6.5 Obtención de muestras

Una vez finalizada la experiencia los animales fueron anestesiados con Ketamina (90 mg/kg) y sacrificados por medio de dislocación cervical. De los mismos se extrajeron muestras de sangre de la vena cava inferior y se centrifugó a 3000 rpm, durante 10 min a 4°C para la obtención de suero. Posteriormente se extrajo el corazón y ambos riñones y se registró el peso de cada uno de ellos. Estos se fraccionaron y conservaron en N₂ líquido para los distintos procedimientos analíticos. Una fracción se guardó en formaldehído 4% para la caracterización histológica. Por último, se extrajeron las tibias y se midió su longitud como marcador de crecimiento y para la estandarización de los pesos de los órganos.

6.6 Evaluación de parámetros circulantes y urinarios

Mediante ensayos enzimáticos colorimétricos en autoanalizador Cobas C-501 (Laboratorio Central-sección química del Hospital de agudos Dr. Teodoro Álvarez del GCBA) se determinaron los niveles circulantes y urinarios de urea, creatinina y proteínas. La relación urinaria de proteínas/creatinina se calculó como marcador de función renal:

$$\text{Relación Pt/Cr (mg/g)} = \frac{\text{Proteinuria (mg/g)}}{\text{Creatinuria (g/dl)}}$$

6.7 Evaluación histopatológica y morfometría.

En cortes histológicos de corazón teñidos con hematoxilina y eosina se midió el área de sección transversal de los cardiomiocitos en los distintos grupos experimentales.

A su vez se llevó a cabo la tinción con picrosirius red, de las muestras pertenecientes a los grupos previamente descritos, para la medición del porcentaje de colágeno intersticial total de la muestra.

Se tomaron imágenes en 20 campos por muestra utilizando un microscopio óptico en un campo de alto poder a 400x.

Para la caracterización histológica de tejido cardiaco se utilizó el software ImageJ (National Institutes of Health) en el que se llevó a cabo la medición del área de los cardiomiocitos y la medición del porcentaje de colágeno para cada región, el cual se calculó mediante la suma de las áreas correspondientes al colágeno en función al área total de tejido. Dichas mediciones se realizaron por un mismo operador sin conocer la procedencia de las muestras analizadas.

6.8 Medición de proteínas por método de Lowry

Para todos los casos donde fue necesaria la determinación de proteínas totales en la muestra en estudio, se llevó a cabo el método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), utilizando una curva de calibración de albúmina (100 mg/dl) y una dilución 1/20 de los homogenatos.

Las absorbancias de la curva y las muestras se midieron a 750 nm utilizando un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Multiskan GO, Cat #51119200).

6.9 Evaluación de estrés oxidativo

Para llevar a cabo la evaluación del estrés oxidativo generado en los individuos en estudio, se determinaron los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

(TBARs) y actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT).

6.10 Medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs)

Para la cuantificar los niveles de TBARs se tomaron 12 mg de muestra de tejido cardíaco los cuales fueron homogeneizados en 15 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{PO}_4$, 60 mmol/L KCl pH 7,4 mediante un ultra-turrax Ika T8. Una vez homogeneizadas las muestras, se centrifugaron 10 min a 4°C a 6000 rpm. El sobrenadante se guardó a -20°C y se separaron 5 μl de la solución madre para realizar un ensayo de Lowry para cuantificación de proteínas totales en solución.

Una vez calculada las concentraciones de proteínas totales de las muestras se preparó la curva de calibración para TBARs, la cual se utilizó MDA 100 μM como estándar, en distintos volúmenes de buffer 15 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{PO}_4$, 60 mmol/L KCl pH 7,4 para construir los puntos de la curva. Para el preparado de las muestras se tomaron 100 μl de estas y, junto con los puntos de la curva, se le agregaron 25 μl de SDS 10% y 465 μl de solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) 8 mg/mL preparado en ácido acético 10% pH 3,5, para posteriormente ser incubados a 100°C durante 1 hora en baño húmedo. Pasado este tiempo se dejó enfriar y en una placa multi-well se cargaron 200 μl tanto de los puntos de la curva como de las muestras. La fluorescencia fue medida posterior a la excitación de las muestras a $\lambda_{\text{ex}} = 515 \text{ nm}$ y los resultados leídos a $\lambda_{\text{em}} = 555 \text{ nm}$ en un fluorómetro de placa (BMG Labtechnologies NOVOstar Microplate Fluorometer).

6.11 Evaluación de la capacidad antioxidante mediante determinación de niveles de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT).

Para la medición de la actividad antioxidante de las enzimas SOD y CAT se utilizó un ensayo colorimétrico. Para ello, se utilizaron aproximadamente 5 mg de tejido cardiaco obtenido durante la experiencia y se homogeneizó en 500 µl de buffer 50 mM NaH₂PO₄/Na₂PO₄ pH 7.4 utilizando un homogeneizador (IKA-Werke T8 Ultra-Turrax Disperser) y adicionando inhibidores de proteasa (P8340-1ML, Merck KGaA) a la mezcla a fin de prevenir la degradación enzimática.

Realizada la homogeneización, los homogenatos fueron centrifugados a 10.000 rpm por 10 min a 4°C. Los sobrenadantes fueron alicuotados para medición de proteínas totales por método de Lowry y para la determinación de la actividad enzimática.

6.12 Determinación de la actividad de Superóxido Dismutasa (SOD)

La enzima SOD pertenece a una familia de enzimas expresadas de manera ubicua en organismos aeróbicos, cuya función principal se basa en la neutralización de los radicales libres de las ERO, específicamente el radical superóxido.

Para determinar su actividad, se midió la capacidad de la misma de inhibir la oxidación del pyrogallol (1,2,3-trihidroxibenceno) a 25°C y pH alcalino, midiendo la formación de purpurogalina a 420 nm.

$$\xi(\mu\text{l mtra}) = \log \log \left(\frac{m \text{ mtra}}{m \text{ blanco}} \right)$$

$$V50\% = \frac{\log \log 0,5 - m}{b}$$

$$\frac{U \text{ SOD}}{mg \pi} = \frac{1000}{V50\% (\mu\text{l}) \times [\pi]}$$

$V_{50\%}$ = Cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50% de la autooxidación del pyrogallol

m = Pendiente del gráfico de ξ para cada muestra

m_{mtra} = Pendiente de la reacción de oxidación de cada muestra

m_{blanco} = Pendiente de la reacción de oxidación del blanco de pyrogallol

b = Ordenada al origen

$[\pi]$ = Concentración de proteínas en la muestra

6.13 Determinación de la actividad de Catalasa (CAT)

La CAT es una enzima oxidorreductasa presente en diversos tejidos y tipos celulares de organismos aeróbicos, la cual cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en oxígeno molecular y agua.

Para la determinación de la actividad enzimática de CAT, se midió el decaimiento de la absorbancia a 240 nm causada por la descomposición del peróxido de hidrógeno.

$$[CAT] \left(\frac{\text{mol}}{\text{mg } \pi} \right) = \frac{m \times Vf}{(\epsilon \times Vmtra \times 1000 \times [\pi])}$$

m = Pendiente de la Absorbancia en función del tiempo

Vf = Volumen final de la reacción

Absortividad molar del peróxido de hidrógeno a 240 nm (ϵ) = $4,6 \times 10^7 M^{-1} \times \text{seg}^{-1}$

$[\pi]$ = Concentración de proteínas en la muestra

$Vmtra$ = Volumen de muestra

6.14 Determinación de colágeno mediante cuantificación de hidroxiprolina.

La hidroxiprolina es un aminoácido no esencial que, en tejidos animales se encuentra casi completamente formando parte del colágeno. Por lo tanto, su determinación se utilizó para estimar la cantidad de esta proteína en el tejido cardíaco.

Para la medición de colágeno intersticial total, comúnmente presente en la fibrosis miocárdica hipertensiva, se determinó la concentración de hidroxiprolina presente en el tejido mediante una reacción colorimétrica utilizando cloramina T y reactivo de Ehrlich como se puede ver en la **Figura 10**. Dicha reacción fue cuantificada mediante espectrofotometría a 550 nm.

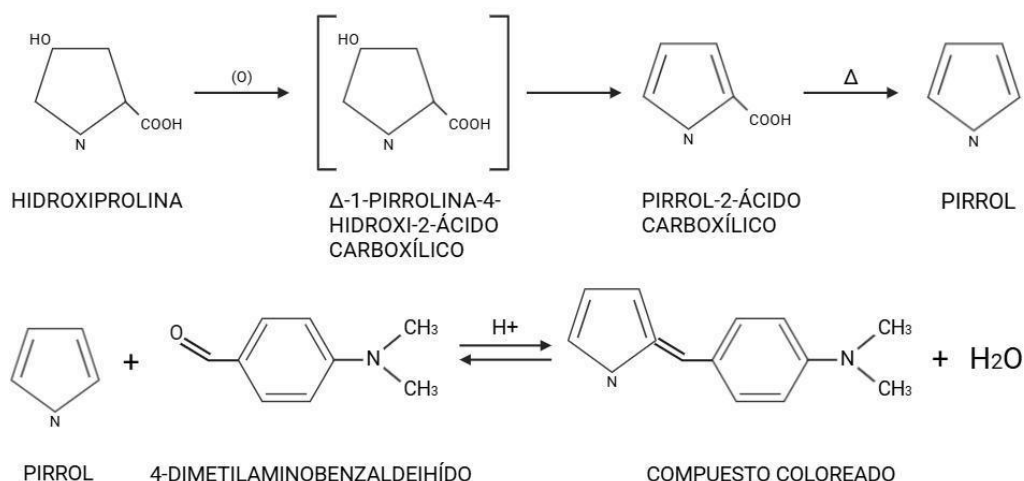


Figura 10. Reacción de Hidroxiprolina, cloramina T y reactivo de Ehrlich para formar un compuesto coloreado.

Para dicho proceso, 15 a 20 mg de muestra de tejido cardíaco fueron secadas a 35°C en una centrífuga de vacío (Thermo Fisher Scientific, Savant SPD121P SpeedVac Concentrator, Cat #SPD111V-220) y pesadas en intervalos de 2 hs hasta no obtener variaciones en el peso.

Una vez obtenido el tejido seco, se lo fraccionó y se lo incubó 15 min a 4°C en buffer NaCl 0,1M / NaHCO₃ mM. Luego se centrifugó a 3000 rpm por 10 min a 4°C. La incubación con buffer y el proceso de centrifugado se repitieron de 3-4 veces hasta obtener un sobrenadante límpido y sin restos de sangre.

Realizado el último lavado, se retiró el buffer para este fin y se le agregó 0,7 ml de HCl 6N. Esto se dejó incubar en un bloque térmico seco a 100°C durante 16 hs.

Finalizada la incubación se diluyó el HCl en 1 ml de H₂O destilada y se filtró el contenido utilizando filtros de jeringa de membrana de PES de 0,22 μm, Cat

#SLGPX13NL, Merck KGaA. Una vez obtenido el sobrenadante filtrado se realizó un segundo secado en centrífuga de vacío a 45°C durante 3-4 hs o hasta eliminar el agua previamente adicionada, para luego resuspender la muestra en 1 ml de H₂O miliQ ultrapura.

Para la reacción colorimétrica se utilizó una curva de calibración de estándar de hidroxiprolina (hydroxyproline commercial standard, Cat #H5534, Merck KGaA, concentración final 50µg/ml). En el caso de las muestras, se prepararon diluciones 1/40 en H₂O. Posteriormente a cada tubo de ensayo se le agregó 1 ml de reactivo cloramina T y se los incubó a 20°C por 20 min. Pasada dicha incubación se les agregó 1 ml de reactivo de Ehrlich, el cual se homogeneizó mediante agitación vigorosa, y se incubó en baño húmedo a 60°C por 15 min. Una vez finalizada esta incubación se dejó enfriar y al cromóforo formado se le midió su absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Multiskan GO, Cat #51119200).

6.15 Zimografía gelatinolítica para la determinación de actividad de metaloproteasas MMP-2 y MMP-9

Para la medición de la actividad enzimática de las MMP-2 y MMP-9 se homogeneizaron 25 mg de tejido cardiaco utilizando un homogeneizador (IKA-Werke T8 Ultra-Turrax Disperser) en 50 mmol/L Tris buffer, pH 7.4, conteniendo CaCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 5 mM y Tritón X-100 1%.

Una vez homogeneizada la muestra se centrifugó 10 min, 10 000 rpm a 4°C, y se conservó el sobrenadante, el cual se alicuotó para medición de proteínas totales por método de Lowry.

Las muestras fueron corridas en un gel de poliacrilamida 7,5% co-polimerizado con gelatina al 0,1% (G1890-100G, Merck KGaA) en condiciones no reductoras. Los geles fueron corridos a 110 V durante 1.40 hs en Tris 25 mM, glicina 192 mM, 0,1% buffer SDS pH 8.3 a 4°C, utilizando una Mini Protean® Tetra Cell (Cat #1658005, Bio-Rad Laboratories). Posteriormente, los geles fueron lavados utilizando Triton X-100 por 30 min e incubado en 0,15 mol/L NaCl, 10 mmol/L CaCl₂, Tris HCl, pH 7.4 a 37° C,

durante 18 hs.

Finalizada la incubación se tiñeron los geles con Coomassie Brilliant Blue R-250 0.25% (Cat #1610400, Bio-Rad Laboratories) y luego se decoloraron con ácido acético-metanol-H₂O (1:3:6). La actividad enzimática pudo ser visualizada como bandas sin color contrastando con el fondo teñido de azul del gel.

La identificación de las MMP-9 (84 kDa) y MMP-2 (67 kDa) se llevó a cabo utilizando un marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards (Cat #1610374, Bio-Rad Laboratories). El estándar de actividad gelatinolítica utilizado fue un medio condicionado proveniente de fibroblastos.

Las intensidades de las bandas observadas fueron analizadas y cuantificadas mediante análisis densitométrico utilizando el software FluorChem software (Alpha Innotech Corp), y la actividad relativa fue expresada en relación con el estándar.

7. Análisis estadístico

Para evaluar la distribución de las variables se utilizó el test de normalidad de Shapiro-Wilk. Para el análisis de diferencias de los resultados se utilizó el test de ANOVA (de los datos previamente logaritmizados cuando correspondiera) según el número de grupos a comparar, y test de Benjamini-Hochberg como test a posteriori. Los resultados se expresaron y/o graficaron como media \pm DE para aquellos datos con distribución normal y como mediana (rango) para los datos no paramétricos. Se utilizó el programa Graph Pad 8.0.1 y las diferencias se consideraron significativas con un p menor a 5%.

8. Resultados

8.1 Caracterización y puesta a punto del modelo de HTA

El modelo de HTA inducido por la infusión de ANGII, descrito en el punto 6.1 de la sección Metodología, fue puesto a punto y validado por primera vez en el marco del proyecto de la presente tesina para su uso en el laboratorio. En primer lugar, se genotipificaron los animales a utilizar mediante reacción de PCR empleando ADN extraído de la cola de los mismos, y posteriormente corridos en un gel de agarosa 1%. En la **Figura 11** se observa una imagen representativa de una corrida electroforética de los amplicones obtenidos.

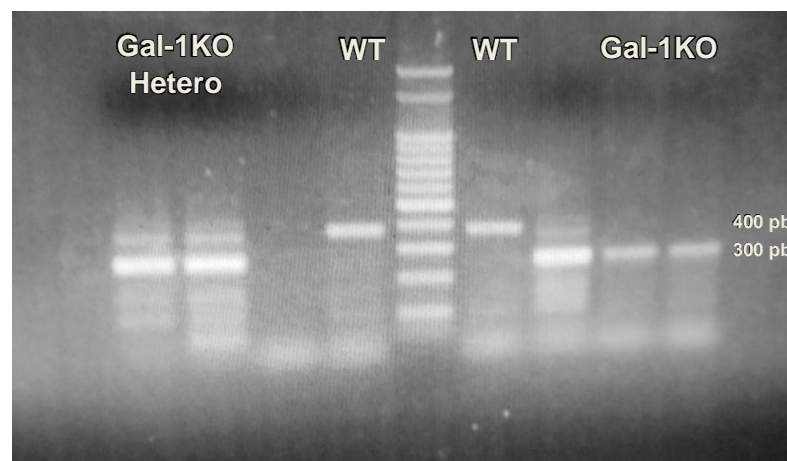


Figura 11. Corrida electroforética en gel de agarosa. WT, Wild-Type; Gal-1, galectina 1; KO, knockout. Corrida en gel de agarosa de muestras de PCR para animales Gal-1 KO en heterocigosis, Gal-1KO (300 pb) y C57BL/6 (379 pb aproximadamente).

En segundo lugar, tras la implantación de las bombas osmóticas infundidas con ANGII, se realizó el seguimiento de la presión arterial sistólica de los animales durante 4 semanas, como se puede observar en la **Figura 12A**. En esta figura, se visualiza el aumento de la presión arterial a lo largo del tiempo para cada grupo de estudio, tanto antes como después de la cirugía de implantación del dispositivo de perfusión de ANGII. Se observó un incremento notable de la PAS en el grupo WT (C57BL/6), así como un

incremento de similar magnitud en el grupo Gal-1 KO con respecto a la presión arterial basal de cada grupo. Asimismo, al final de la experiencia, no se hallaron diferencias significativas en el aumento de la presión arterial sistólica del grupo Gal-1 KO en contraste con el grupo WT. En la **Figura 12B**, se muestran las presiones arteriales de cada grupo de estudio antes y después del tratamiento con ANGII, observándose un incremento de la presión arterial sistólica en ambos grupos tratados con ANGII.

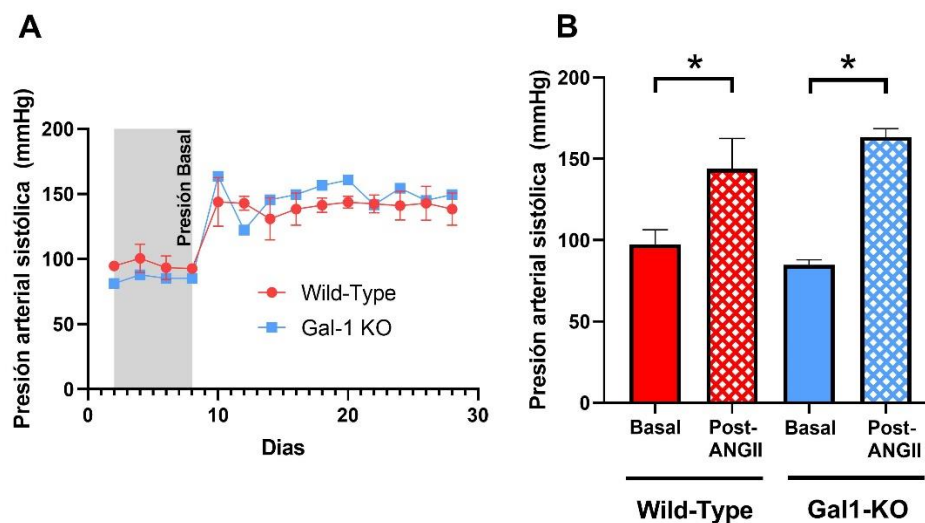


Figura 12. Seguimiento de presión arterial sistólica en mmHg de ratones tratados con ANGII o VH. VH, Vehículo; ANGII, angiotensina II; Gal1, galectina 1; KO, knockout. * $p < 0,05$. La **Figura 12A** fue analizada mediante la prueba estadística de Wilcoxon. La **Figura 12B** fue analizada mediante la prueba estadística ANOVA de una vía.

8.2 Seguimiento de la presión arterial

Una vez puesto a punto el modelo, se repitieron los procedimientos descritos en el apartado 8.1 de la puesta a punto en los grupos experimentales planteados en la metodología. De esta forma, se realizó el seguimiento de las presiones arteriales sistólicas de los cuatro grupos experimentales, antes y después de perfundir ANGII o su vehículo (VH). La **Figura 13A** detalla los promedios de las tres tomas de presión realizadas semanalmente, de cada grupo, a lo largo del periodo de estudio. En la **Figura**

13B se observan los resultados obtenidos de las presiones registradas antes y después de la implantación de las bombas osmóticas infundidas con ANGII o VH, hallándose un aumento significativo de la presión arterial sistólica en ambos grupos tratados con ANGII.

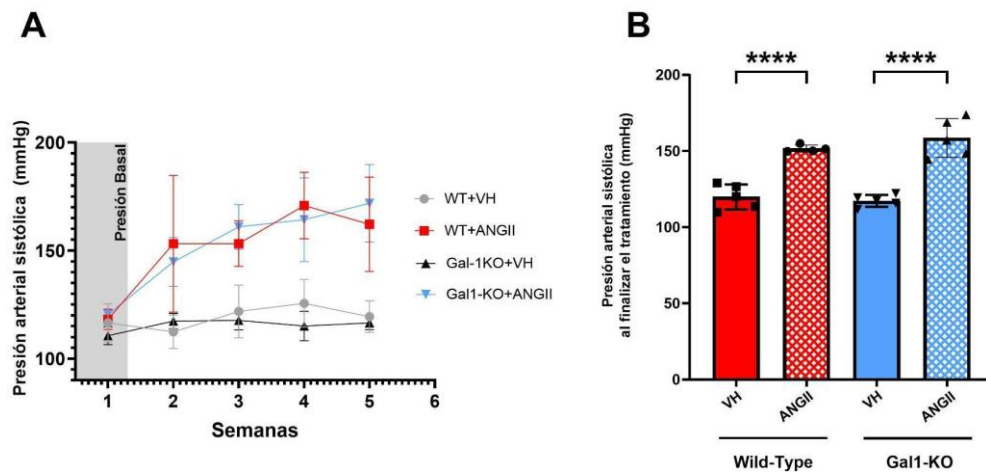


Figura 13. Seguimiento de presión arterial sistólica en mmHg de ratones tratados con ANGII o VH. VH, Vehículo; ANGII, angiotensina II; Gal1, galectina 1; KO, knockout. ****p<0,0001. Test de ANOVA de una vía y la diferencia de medias fue comparada por test de Benjamini and Hochberg.

8.3 Evaluación de la Función Renal

Para la evaluación de la función renal en las muestras de orina recolectadas al inicio y al final de la experiencia se determinaron los niveles de urea, creatinina y proteinuria, mientras que en el suero obtenido el día de la eutanasia se determinaron los niveles de urea y creatinina.

8.4 Evaluación de los niveles séricos y urinarios de Urea

Como se puede ver a continuación, la **Figura 14A** representa los niveles de urea basales en orina en los distintos grupos de estudio. En ella, no se aprecian diferencias significativas entre las concentraciones de urea en orina. En la **Figura 14B** se muestran los niveles de urea en orina una vez finalizadas las cuatro semanas de tratamiento de los

grupos de estudio.

En la **Figura 14C** se representan los niveles de urea presentes en muestras de suero recolectadas al momento del sacrificio de los animales en estudio. En esta figura, se ha encontrado un aumento altamente significativo en las concentraciones séricas de urea, tanto en los Wild-Type como en los Gal-1 KO. A su vez, se observaron diferencias significativas entre los grupos Wild-Type y Gal-1 KO expuestos a ANGII, siendo los niveles del grupo Wild-Type significativamente superiores a los del grupo Gal-1 KO.

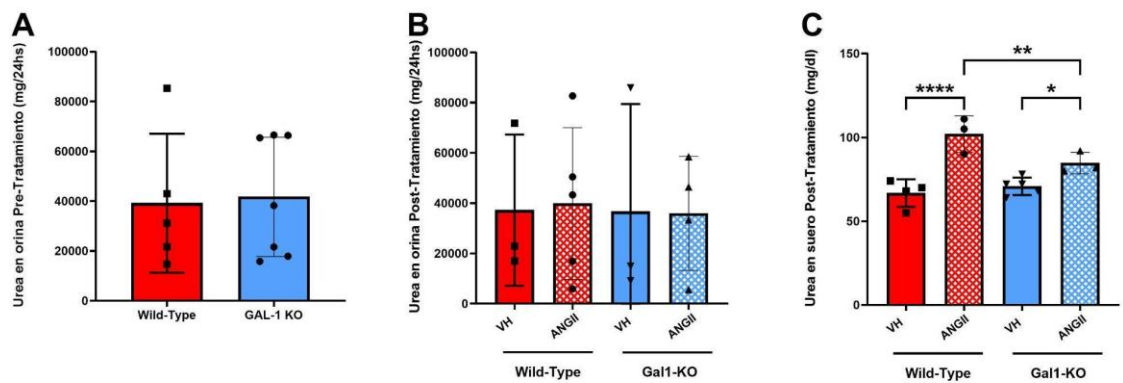


Figura 14. Cuantificación de los niveles séricos y urinarios de urea en los animales de estudio. VH, Vehículo; ANGII, angiotensina II; Gal1, galectina 1; KO, knockout. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. Para todas las pruebas se utilizó el test de ANOVA de una vía y la diferencia entre las medias fue analizada por método de Benjamini and Hochberg.

8.5 Evaluación de la relación de los niveles urinarios de proteínas y creatinina.

La **Figura 15** representa la relación proteínas/creatinina presente en la orina de los animales en estudio. En ella, se puede observar que se encontraron diferencias significativas entre los grupos WT y Gal-1 KO tratados con ANGII, siendo el grupo WT el mas afectado luego de las 4 semanas de exposición al mencionado tratamiento.

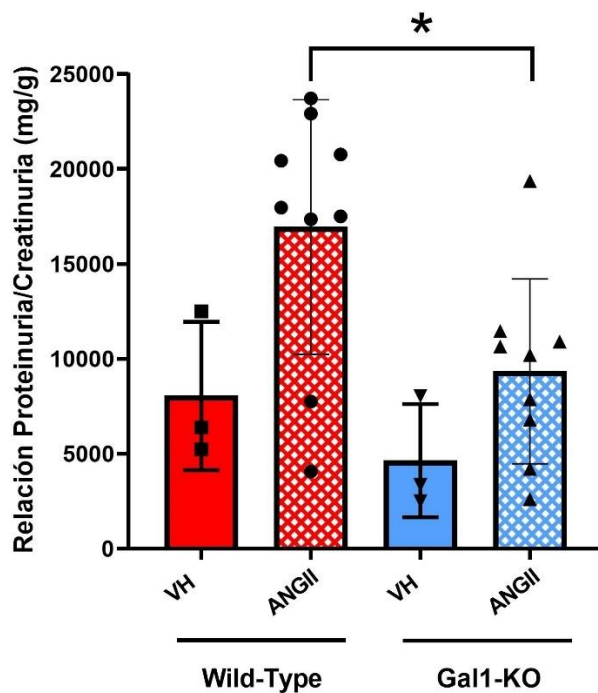


Figura 15. Cuantificación de la relación Proteinuria/Creatinuria. VH, Vehículo; ANGII, angiotensina II; Gal1, galectina 1; KO, knockout. * $p < 0,05$. Para todas las pruebas se utilizó el test de ANOVA de una vía y la diferencia entre las medias fue analizada por método de Benjamini and Hochberg.

8.6 Evaluación de niveles de Proteinuria

Utilizando los niveles de proteinuria basales y los registrados una vez finalizadas las cuatro semanas de exposición a ANGII respectivamente se calcularon los niveles de proteinuria de 24 horas, los cuales se pueden observar en la **Figura 16A** y la **Figura 16B**. Para dichos valores no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio.

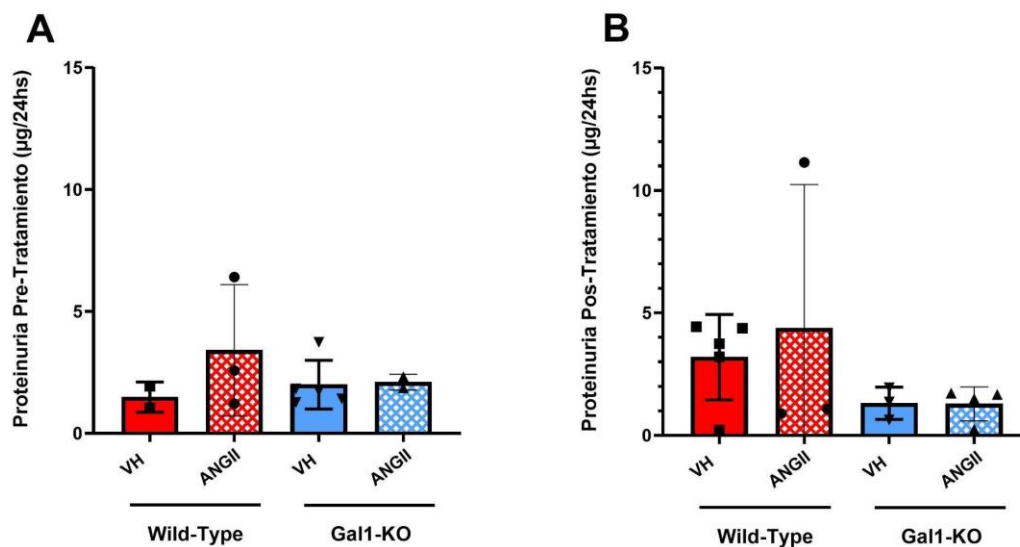


Figura 16. Evaluación de niveles de proteinuria. VH, Vehículo; ANGII, angiotensina II; Gal1, galectina 1; KO, knockout. Para todas las pruebas se utilizó el test de ANOVA de una vía y la diferencia entre las medias fue analizada por método de Benjamini and Hochberg.

8.7 Evaluación de la Hipertrofia Cardíaca

Con el propósito de evaluar la hipertrofia cardíaca resultado de la exposición crónica a ANGII se registró el peso de los corazones como se puede ver a continuación. La **Figura 17A** representa los pesos correspondientes a los corazones de los distintos grupos experimentales. En ella se observa un aumento significativo en el peso de los corazones de los grupos WT+ANGII y GAL-1KO+ANGII respecto a los grupos sin ANGII respectivamente. Las diferencias se mantuvieron significativas luego de corregir

por el peso de los animales (**Figura 17B**).

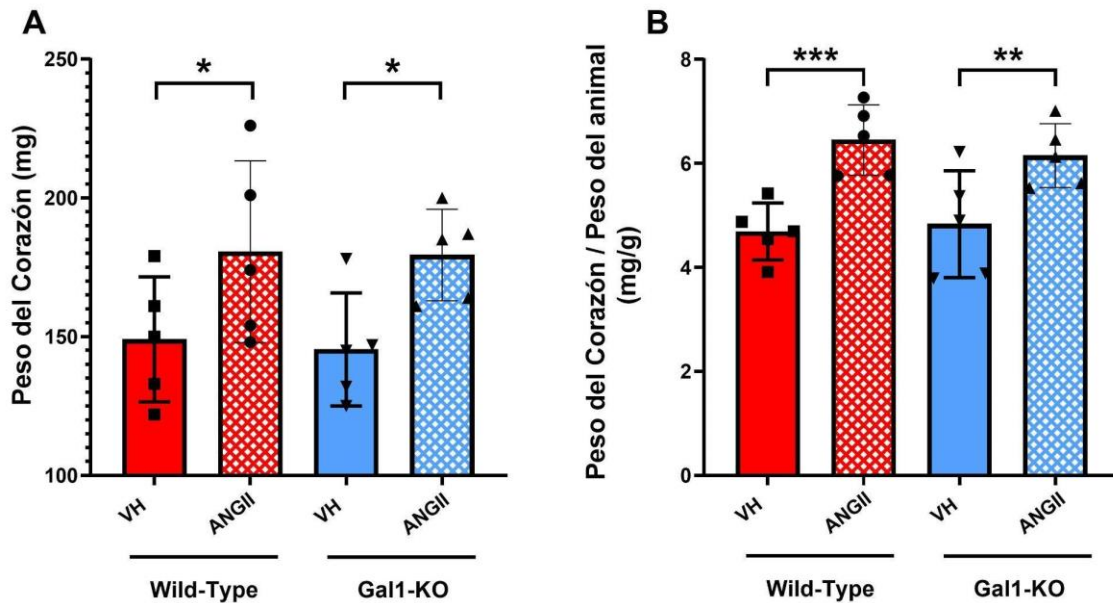


Figura 17. Peso de los corazones de los animales en estudio. VH, Vehículo; ANGII, angiotensina II; Gal1, galectina 1; KO, knockout. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Test de ANOVA de una vía y test a posteriori de Benjamini and Hochberg.

8.8 Determinación del área de los Cardiomiocitos

A fin de estudiar la respuesta del tejido cardíaco ante el aumento crónico de la presión arterial inducido por ANGII, se evaluó el área de los cardiomiocitos en cortes de tejidos teñidos con Hematoxilina y Eosina. En la **Figura 18** se pueden ver las imágenes tomadas por microscopía de los cardiomiocitos mencionados, los cuales fueron medidos utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health), tomando en cuenta únicamente aquellas células cortadas transversalmente.

En la **Figura 19** se pueden observar los valores registrados de las áreas de las células cardíacas de los animales estudiados. En ella se aprecia un aumento significativo en la circunferencia de los cardiomiocitos de aquellos animales tratados con ANGII, tanto en los WT como en los Gal-1 KO, en comparación con los animales de su misma

cepa expuestos al VH de la hormona. Además, en aquellos expuestos a ANGII, se observó que no hubo diferencias significativas en el aumento de tamaño de los cardiomiocitos entre las cepas WT y Gal-1 KO.

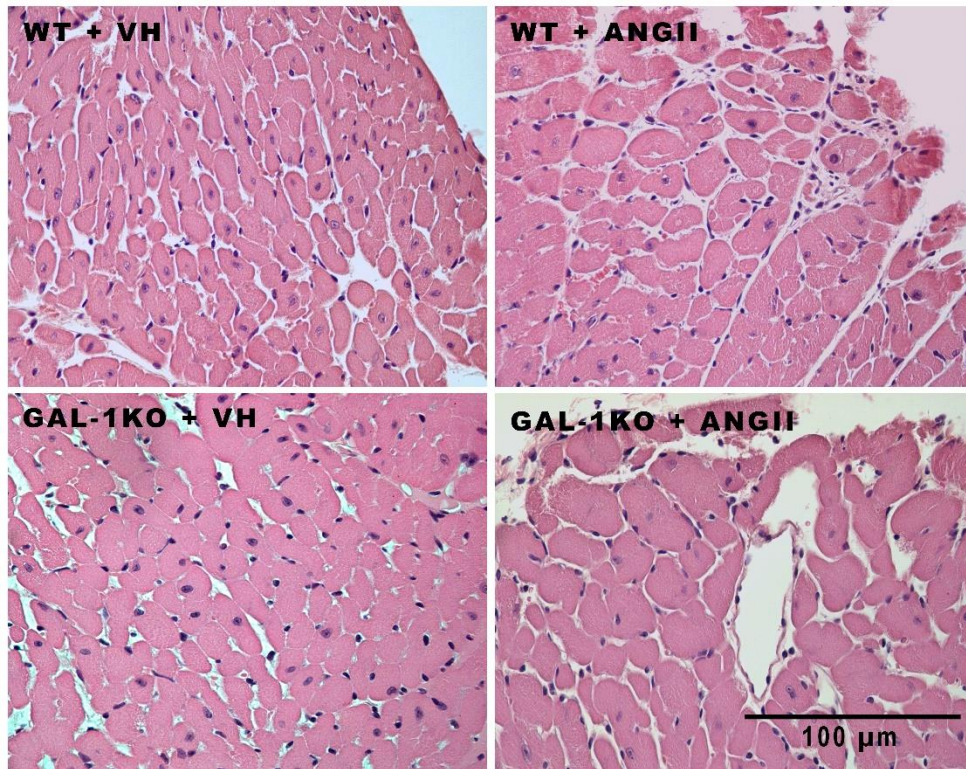


Figura 18. Tinción con Hematoxilina y Eosina de Cardiomiocitos. VH, Vehículo; ANGII, angiotensina II; Gal1, galectina 1; WT, Wild-Type; KO, knockout.

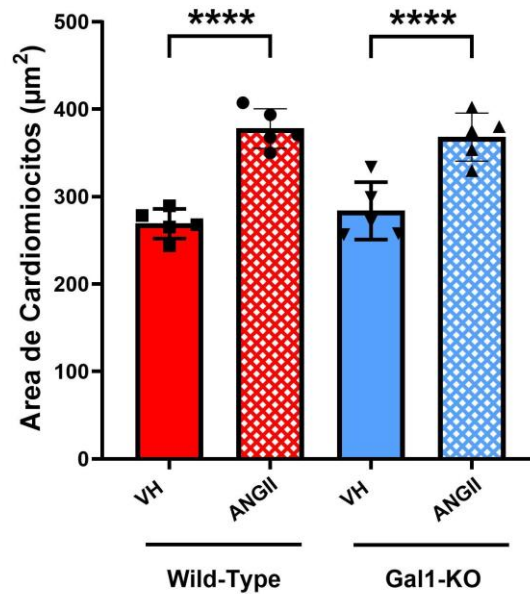


Figura 19. Áreas registradas de cardiomiocitos. VH, Vehículo; ANGII, angiotensina II; Gal1, galectina 1; WT, Wild-Type; KO, knockout. ****p<0,0001. Test de ANOVA de una vía y la diferencia de medias fue comparada por test de Benjamini and Hochberg.

8.9 Determinación del porcentaje de Fibrosis Miocárdica

El contenido de colágeno intersticial en el tejido cardíaco se evaluó en cortes histológicos teñidos con Picrosirius Red (**Figura 20**), así como también mediante la cuantificación de la hidroxiprolina total presente en las muestras. En ambos casos, se observó un aumento de colágeno intersticial en los grupos tratados con ANGII, lo cual indicaría la presencia de fibrosis cardíaca (**Figura 21A y 21B**). En la **Figura 21B** se presentan los resultados de la cuantificación de hidroxiprolina, expresados en % de colágeno en el tejido cardíaco.

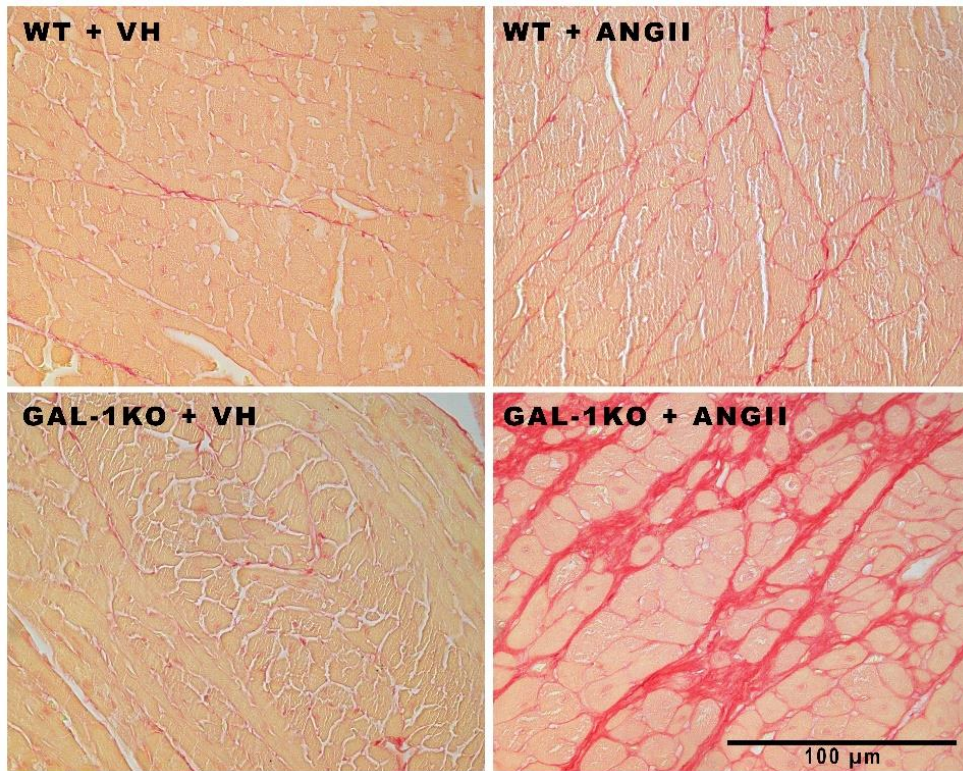


Figura 20. Tinción con Picrosirius Red de colágeno intersticial en tejido cardíaco. VH, Vehículo; ANGII, angiotensina II; Gal1, galectina 1; KO, knockout.

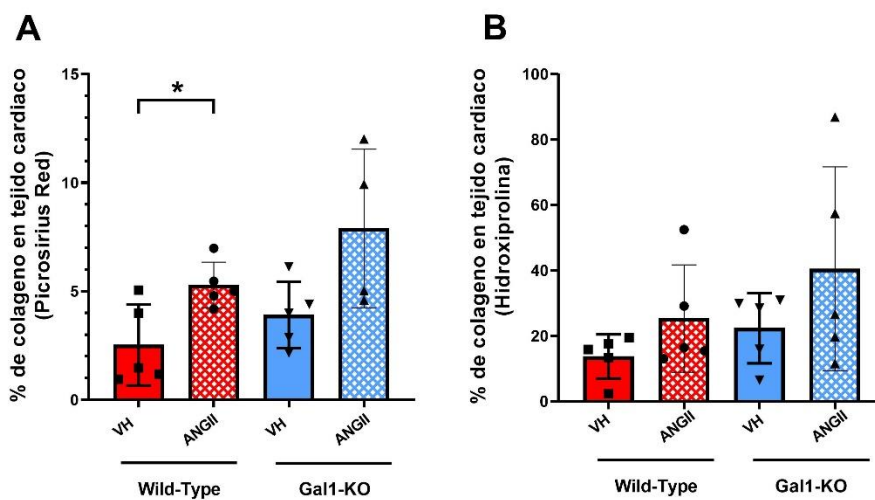


Figura 21. Determinación de colágeno intersticial en tejido cardíaco. VH, Vehículo; ANGII, angiotensina II; Gal1, galectina 1; KO, knockout. Para ambos estudios se utilizó la prueba estadística ANOVA de una vía y test a posteriori de

Benjamini and Hochberg.

8.10 Evaluación del Estrés Oxidativo

Con el fin de evaluar los niveles de estrés oxidativo presente en el tejido cardiaco de los grupos experimentales, se llevó a cabo la cuantificación de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) así como la cuantificación de las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (Tbars).

Como se puede ver en la **Figura 22A y 22B**, no se observaron diferencias significativas en los niveles de TBARS y en la actividad de SOD en el tejido cardíaco entre grupos. Respecto a la actividad de CAT, en la **Figura 22C** se observa una disminución significativa en el grupo Gal-1 KO tratado con ANGII en comparación con el grupo Gal-1 KO expuesto al VH.

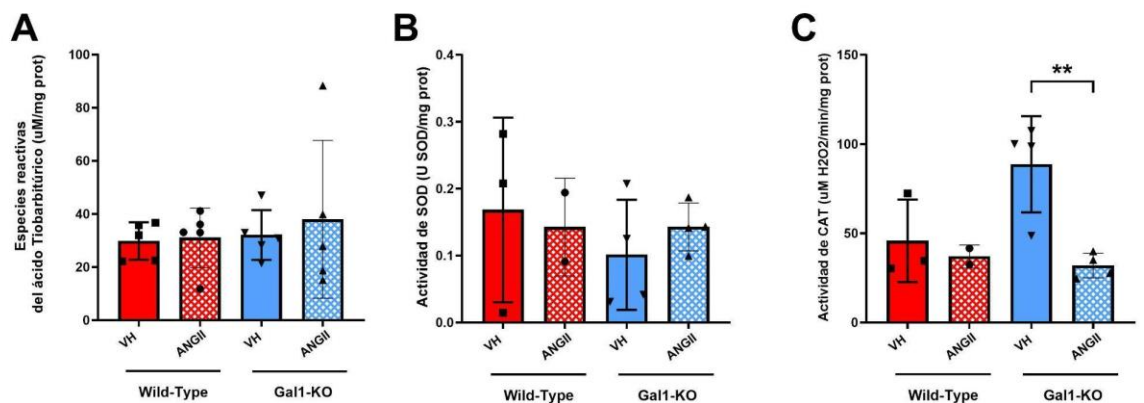


Figura 22. Evaluación del estrés oxidativo. VH, Vehículo; ANGII, angiotensina II; Gal1, galectina 1; KO, knock out. **p<0,01. Test de ANOVA de una vía y test a posteriori de Benjamini and Hochberg.

8.11 Cuantificación de actividad de MMP9

Las metaloproteinasas 9 (MMP9) son enzimas gelatinolíticas que intervienen en el remodelamiento de la matriz extracelular. Por este motivo, se llevó a cabo la cuantificación de la actividad proteica de estas enzimas. En la **Figura 23A**, se puede

observar la cuantificación del área de actividad de la enzima MMP9 en los grupos expuestos a ANGII y al VH. En la **Figura 23B**, se puede observar el área de actividad de la forma latente de la MMP9. En ambos casos, la actividad de la enzima MMP9 y de la forma latente MMP pro9 no mostraron alteraciones significativas.

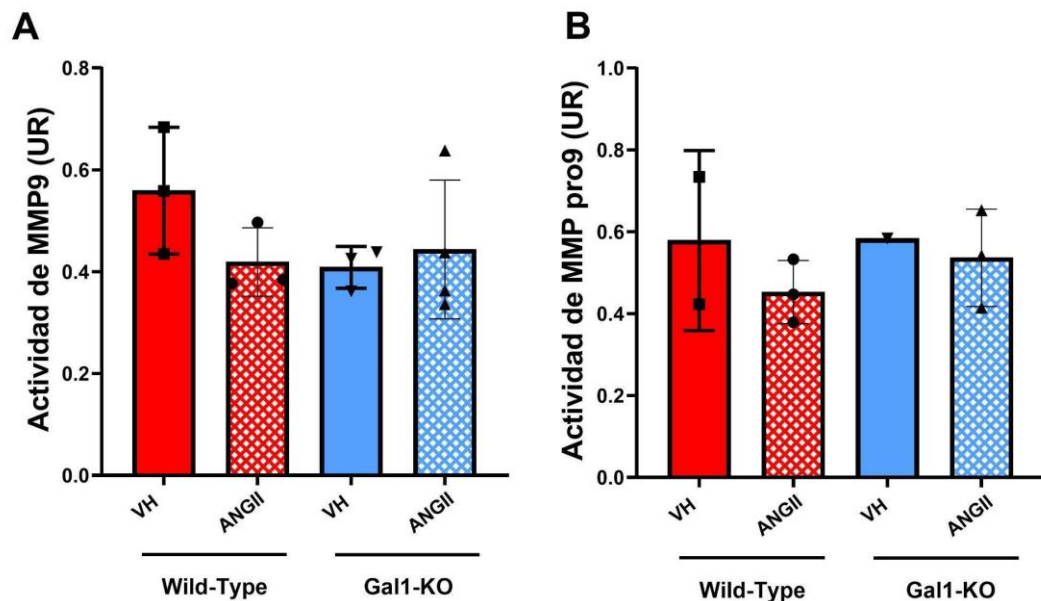


Figura 23. Cuantificación de actividad de MMP9. VH, Vehículo; ANGII, angiotensina II; Gal1, galectina 1; KO, knockout; MMP9, metaloproteinasas 9.

9. Discusión

En el presente trabajo hemos estudiado el rol de la Gal-1 en un modelo de hipertensión arterial inducido por ANGII. A partir del desarrollo de este modelo, en primer lugar, hemos demostrado que la infusión crónica de ANGII, tanto en ratones Gal-1 KO como en ratones Wild-Type (C57BL/6), incrementó la presión arterial sistólica e indujo hipertrofia cardiaca en los animales. Aunque el incremento de la presión arterial e hipertrofia cardíaca por infusión continua de ANGII ya ha sido demostrado en trabajos previos (MONASSIER *et al.*, 2006), este es el primer estudio que evalúa el efecto de la ANGII en ratones KO para Gal-1. De esta forma, pudimos observar que el déficit de Gal-1, no modificó la patogénesis de la hipertensión arterial luego de la infusión continua de ANGII. A su vez, observamos que los corazones de ambos grupos que recibieron

ANGII incrementaron la hipertrofia miocárdica en comparación con aquellos grupos que recibieron vehículo. Asimismo, cortes histológicos confirmaron la hipertrofia en las células cardíacas de los animales tratados con ANGII en comparación con sus respectivos controles. Además, a través de distintos métodos se observó un aumento en el depósito de colágeno intersticial en el tejido cardíaco de los animales con HTA. Estos resultados confirman que la hipertensión arterial inducida por ANGII produce hipertrofia cardíaca y fibrosis en ambos grupos, sugiriendo que el déficit de Gal-1 no previene estos efectos. Para evaluar el daño por estrés oxidativo, se realizaron pruebas para medir la concentración de especies reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la actividad enzimática de SOD y CAT. En el caso de TBARS y de la actividad de SOD, no se encontraron diferencias significativas, sin embargo, se observó una disminución de la actividad de CAT en animales WT y Gal-1 KO expuestos a ANGII. Esto sugiere que, en este modelo de HTA, la capacidad antioxidante del tejido comienza a verse alterada, aunque esta no se refleja en un aumento del estrés oxidativo. Estos resultados pueden deberse al tiempo de experimentación, por lo cual sería interesante evaluar a futuro los parámetros mencionados en modelos de HTA más prolongados.

Como resultado de un aumento crónico de la presión arterial, los vasos sanguíneos de los riñones pueden verse comprometidos, lo cual lleva al daño del órgano y provoca pérdida de su función. Para estudiar el daño del riñón en animales hipertensos y si estas lesiones son modificadas por el déficit de Gal-1, se llevó a cabo la recolección de orina de los animales en estudio, tanto antes como después de la infusión de ANGII. De esta manera, observamos que aquellos animales expuestos únicamente a la infusión del VH mantenían niveles séricos y urinarios de urea, creatinina y proteinuria similares a los observados en el estado basal. Estos mismos parámetros fueron evaluados en los animales sometidos a la infusión sostenida de ANGII, donde se observó que tanto los ratones WT como los Gal-1 KO presentaban niveles séricos de urea superiores a los medidos en el estado basal y a los de sus respectivos controles. En cuanto a la creatinina sérica, se observó que los animales WT tenían concentraciones superiores en comparación con sus controles, aunque esto no fue el caso para los Gal-1 KO. Estos resultados sugieren que la función renal podría comenzar a verse afectada en las 4

semanas de estudio, provocando así la acumulación sistémica de dichos metabolitos. En cuanto a las concentraciones urinarias de urea, no se observaron diferencias con respecto a los controles al finalizar el período de estudio. Sin embargo, en el caso de la relación proteinuria/creatinina en orina, se pudo observar un aumento significativo en los animales con ANGII, siendo mayor en los WT respecto a los GAL-1KO. Esto se confirma en estudios previos (RUIZ-ORTEGA *et al.*, 1995; HISADA *et al.*, 1999), donde se demuestra que la ANGII está involucrada en la patogenia de enfermedades renales inmunes, sugiriendo, además, que este péptido es un mediador proinflamatorio para dicho tejido, lo que llevaría a la fibrosis de dicho órgano y pérdida de función del mismo. A su vez, se pudo observar que aquellos animales Gal-1 KO presentaron una menor relación de proteínas/creatinina en orina que los animales WT, lo que sugeriría que el déficit de Gal-1 tendría un rol protector de la función renal de dichos animales en contraste con los WT. Así mismo, sería interesante medir si estos valores efectivamente se correlacionan con una menor tasa de fibrosis renal.

Dado que en situaciones de fibrosis se produce un remodelamiento de la matriz extracelular, se evaluó el comportamiento de las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), enzimas que intervienen en la degradación del colágeno. En este trabajo, no se observaron diferencias en la actividad de dichas enzimas entre los grupos de estudio. Esto puede deberse al periodo de exposición a ANGII, ya que, como se ha descrito previamente (EGIDO *et al.*, 2003; MONASSIER *et al.*, 2006), la ANGII es un péptido que interactúa con las células a través de receptores AT1, entre otros, regulando el crecimiento celular y la fibrosis, además de inducir la producción de inhibidores de proteasas reguladoras de la MEC. Esto último fue descrito por NAKAMURA *et al.*, 2000, en riñones. A su vez se ha demostrado en trabajos previos de nuestro laboratorio (FONTANA ESTÉVEZ F. S *et al.*, 2022) realizados en el mismo modelo experimental de infusión continua de ANGII, aunque en ratones Gal-3 KO, que el déficit de Gal-3 incrementaba la expresión de mRNA para MMP-9. De esta manera, considerando los ejemplos previamente mencionados, sería interesante evaluar la actividad de las MMP en un modelo de estudio de hipertensión donde la exposición al angiotensinógeno sea más prolongada. Asimismo, a futuro sería de interés evaluar la expresión de los TIMPs,

dado que el remodelado de la MEC depende del balance MMP/TIMP (CABRAL-PACHECO *et al.*, 2020).

Con respecto a los resultados de EO como potencial mecanismo que acompaña el daño de órgano blanco, en el presente trabajo no se observaron diferencias en los niveles de TBARS, sin embargo, se observaron cambios en la actividad de CAT, lo cual podría sugerir que, en el tiempo experimental, la capacidad antioxidante del tejido cardíaco comenzaría a afectarse. A su vez en artículos como el de USHIO-FUKAI *et al. Journal of Biological Chemistry*, 1996 y ZAFARI *et al. Hypertension*, 1998, se describe que la ANGII favorece la acción oxidante al inducir la activación de la NADPH oxidasa, la cual se encuentra entre las enzimas fagocíticas y no fagocíticas más estudiadas por su gran producción del radical O_2^- y su correlación con las enfermedades coronarias independientes de otros factores de riesgo cardiovascular, como se detalla en GUZIK *et al. Circulation Research*, 2000. Esta activación sería independiente del aumento de la presión arterial, dado que dicho comportamiento no se ha observado en otros fármacos presores como la noradrenalina. Con esto en mente, sería esperable que la exposición por un periodo más prolongado a la ANGII resultara en una notable disminución de la actividad de enzimas antioxidantes como se vio en el caso de CAT, junto con un incremento en la concentración de TBARS.

10. Conclusión

Por lo tanto, podemos concluir que, la hipertensión inducida por ANGII causa hipertrofia cardíaca, fibrosis y daño renal en ratones WT y Gal-1 KO. La disminución en la actividad de CAT observada en los animales KO para Gal-1, sugiere un inicio de alteración de la capacidad antioxidante del tejido cardíaco, aunque el estrés oxidativo aún no se manifiesta en los parámetros medidos. Esto sugiere que los efectos sobre el EO pueden manifestarse en tiempos de exposición más prolongados a ANGII.

Los niveles elevados de urea, creatinina y proteinuria en los animales tratados con ANGII sugieren un posible daño renal progresivo. A su vez se pudo observar que en animales Gal-1 KO, si bien se observaron evidencias de dicho daño renal, el aumento de los parámetros medidos fue menor en contraste con sus controles, lo que podría indicar

que la deficiencia de la Gal-1 tendría un rol potencialmente nefro-protector ante un aumento prolongado en la presión arterial producto de la exposición a ANGII. Futuros estudios permitirían explorar este daño en etapas más avanzadas, evaluando también el impacto sobre la fibrosis renal y la inflamación, dado que estos procesos se asocian a la hipertensión crónica.

Otra línea de investigación clave es el análisis del papel de las metaloproteinasas (MMP) y sus inhibidores (TIMPs) en el remodelado de la matriz extracelular. El potencial daño cardíaco observado en este estudio no se vio reflejado en la actividad de MMP-2 y MMP-9.

En resumen, estos resultados indican que, fuera de los posibles efectos nefro-protectores observados, el déficit de Gal-1 no modifica los efectos hipertensivos de ANGII, y futuras investigaciones con tiempos de exposición más prolongados podrían ofrecer una visión más clara de los mecanismos de remodelado, daño renal y estrés oxidativo en la hipertensión crónica.

11. Financiamientos

PICT 2019-02987, PICT 2021-GRF-T1-00442

12. Referencias

1. Más de 700 millones de personas con hipertensión sin tratar. *World Health Organization (WHO)*. 25 de agosto de 2021. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/25-08-2021-more-than-700-million-people-with-untreated-hypertension>
2. ZHOU, Bin et al. Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. *The Lancet*. 2021, **398**(10304), 957–980. ISSN 0140-6736. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01330-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01330-1)
3. JAMESON, J. Larry et al. Vasculopatía Hipertensiva. En: MCGRAW HILL EDUCATION MÉXICO, ed. *Harrison principios de medicina interna*. 20^a ed. McGraw-Hill Interamericana, 2018, pp. 1890–1906. ISBN 9781456264888.
4. L. BAKRIS, George. Hipertensión. *Manual MSD versión para profesionales*. Septiembre de 2023. Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es-mx/professional/trastornos-cardiovasculares/hipertensión/hipertensión>
5. WAGNER-GRAU, Patrick. Fisiopatología de la hipertensión arterial. *An. Fac. med.* 2010, vol.71, n.4, pp.225-229. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832010000400003&lng=es&nrm=iso. ISSN 1025-5583.
6. SEROPIAN, Ignacio M. et al. Galectin-1 as an Emerging Mediator of Cardiovascular Inflammation: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Mediators of Inflammation*. 2018, 1–11. ISSN 1466-1861. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2018/8696543>
7. COLLINS, Allan J., Robert FOLEY, Charles HERZOG, Blanche CHAVERS, David GILBERTSON et al. *United States Renal Data System 2007 Annual Data Report Abstract*. American Journal of Kidney Diseases, vol. 51 (enero de 2008), n.º 1, pp. A6—A7. ISSN 0272-6386. Disponible

- en: <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2007.11.001>.
8. LEGUIZAMÓN, Hildebrando. Creatinina sérica como marcador de la función renal. Conceptos básicos. Tasa de filtración glomerular. *Urología Colombiana*. 2014, **23**(1), 78–79. ISSN 0120-789X. Disponible en: [doi:10.1016/s0120-789x\(14\)50015-9](https://doi.org/10.1016/s0120-789x(14)50015-9)
 9. SEIJAS, M. et al. Definición y biomarcadores de daño renal agudo: nuevas perspectivas. *Medicina Intensiva*. 2014, **38**(6), 376–385. ISSN 0210-5691. Disponible en: [doi:10.1016/j.medin.2013.09.001](https://doi.org/10.1016/j.medin.2013.09.001)
 10. RABINOVICH, Gabriel A. et al. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *European Journal of Immunology*. 2000, **30**(5), 1331–1339. ISSN 1521-4141. Disponible en: [doi:10.1002/\(sici\)1521-4141\(200005\)30:5%3C1331::aid-immu1331%3E3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/(sici)1521-4141(200005)30:5%3C1331::aid-immu1331%3E3.0.co;2-h)
 11. DELGADO ROCHE, Livan; MARTINEZ SANCHEZ, Gregorio y DIAZ BATISTA, Arquímedes. Determinación de marcadores de estrés oxidativo en pacientes con enfermedades cardiovasculares. *Acta bioquím. clín. latinoam.* 2009, vol.43, n.3, pp.307-313. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572009000300003&lng=es&nrm=iso. ISSN 0325-2957.
 12. FRANCO, Caterina et al. Essential Hypertension and Oxidative Stress: Novel Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022, **23**(22), 14489. ISSN 1422-0067. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms232214489>
 13. AGUILAR DIAZ DE LEON, J. and BORGES, C.R. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *Journal of Visualized Experiments*. 2020, (159). ISSN 1940-087X. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.3791/61122>
 14. NIKI, Etsuo. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009, **47**(5), 469–484. ISSN 0891-5849. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.032>
 15. GAXIOLA-ROBLES, Ramón et al. Peroxidación de lípidos y la respuesta

- del sistema de defensa antioxidante en el diabético tipo 2 obeso en comparación al diabético tipo 2 sin obesidad. *Nutr. Hosp.* 2013, vol.28, n.6, pp.1905-1911. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112013000600019&lng=es&nrm=iso. ISSN 1699-5198. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2013.28.6.6946>.
16. MUÑIZ, Pilar, COMA María Jesús y TERÁN Joaquín. ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO VASCULAR EN PROCESOS DE HIPOXIA. MALONDIALDEHÍDO (MDA) COMO BIOMARCADOR DE DAÑO OXIDATIVO. *Rev Electron Biomed / Electron J Biomed*. Febrero de 2014. Disponible en: <https://biomed.uninet.edu/2014/n2/muniz.html#:~:text=Uno%20de%20estos%20biomarcadores%20es%20el%20malondialdehido,oxidativo%20a%20lípidos%20por%20su%20potencial%20aterogénico>
17. VALENZUELA P, María Antonieta et al. Incremento de la actividad metaloproteinásica y de sus inhibidores en el líquido cefalorraquídeo, en pacientes con paraparesia espástica tropical. *Rev. méd. Chile.* 2000, vol.128, n.6, pp.585-592. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872000000600003&lng=es&nrm=iso. ISSN 0034-9887. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872000000600003>.
18. FLAMANT, M., PLACIER, S., DUBROCA, C., ESPOSITO, B., LOPES, I., CHATZIANTONIOU, C., TEDGUI, A., DUSSAULE, J.-C. and LEHOUX, S. Role of Matrix Metalloproteinases in Early Hypertensive Vascular Remodeling. *Hypertension.* 2007, **50**(1), 212–218. ISSN 1524-4563. Disponible en: <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.089631>
19. LAAF, D., BOJAROVÁ, P., ELLING, L. and KŘEN, V. Galectin–Carbohydrate Interactions in Biomedicine and Biotechnology. *Trends in Biotechnology.* 2019, **37**(4), 402–415. ISSN 0167-7799. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.10.001>
20. STOWELL, S.R., KARMAKAR, S., ARTHUR, C.M., JU, T., RODRIGUES,

- L.C., RIUL, T.B., DIAS-BARUFFI, M., MINER, J., MCEVER, R.P. and CUMMINGS, R.D. Galectin-1 Induces Reversible Phosphatidylserine Exposure at the Plasma Membrane. *Molecular Biology of the Cell*. 2009, **20**(5), 1408–1418. ISSN 1939-4586. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.e08-07-0786>
21. DIAS-BARUFFI, M., ZHU, H., CHO, M., KARMAKAR, S., MCEVER, R.P. and CUMMINGS, R.D. Dimeric Galectin-1 Induces Surface Exposure of Phosphatidylserine and Phagocytic Recognition of Leukocytes without Inducing Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2003, **278**(42), 41282–41293. ISSN 1083-351X. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m306624200>.
22. BRINCHMANN, M.F., PATEL, D.M. and IVERSEN, M.H. The Role of Galectins as Modulators of Metabolism and Inflammation. *Mediators of Inflammation*. 2018, **2018**, 1–11. ISSN 1466-1861. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2018/9186940>.
23. CEDENO-LAURENT, F. and DIMITROFF, C.J. Galectin-1 research in T cell immunity: Past, present and future. *Clinical Immunology*. 2012, **142**(2), 107–116. ISSN 1521-6616. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2011.09.011>.
24. SMETANA, K., Jr, ANDRÉ, S., KALTNER, H., KOPITZ, J. and GABIUS, H.-J. Context-dependent multifunctionality of galectin-1: a challenge for defining the lectin as therapeutic target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2013, **17**(4), 379–392. ISSN 1744-7631. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.2013.750651>.
25. SUNDBLAD, V., MOROSI, L.G., GEFFNER, J.R. and RABINOVICH, G.A. Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation. *The Journal of Immunology*. 2017, **199**(11), 3721–3730. ISSN 1550-6606. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1701172>.
26. CROCI, D.O., SALATINO, M., RUBINSTEIN, N., CERLIANI, J.P., CAVALLIN, L.E., LEUNG, H.J., OUYANG, J., ILARREGUI, J.M., TOSCANO, M.A., DOMAICA, C.I., CROCI, M.C., SHIPP, M.A., MESRI, E.A., ALBINI, A. and RABINOVICH, G.A. Disrupting galectin-1 interactions

- with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma. *Journal of Experimental Medicine*. 2012, **209**(11), 1985–2000. ISSN 1540-9538. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20111665>.
27. CROCI, D.O., SALATINO, M., RUBINSTEIN, N., CERLIANI, J.P., CAVALLIN, L.E., LEUNG, H.J., OUYANG, J., ILARREGUI, J.M., TOSCANO, M.A., DOMAICA, C.I., CROCI, M.C., SHIPP, M.A., MESRI, E.A., ALBINI, A. and RABINOVICH, G.A. Glycosylation-Dependent Lectin-Receptor Interactions Preserve Angiogenesis in Anti-VEGF Refractory Tumors. *Cell*. 2014, **156**(4), 744–758. ISSN 0092-8674. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20111665>.
28. SEROPIAN, I.M., CERLIANI, J.P., TOLDO, S., VAN TASSELL, B.W., ILARREGUI, J.M., GONZÁLEZ, G.E., MATOSO, M., SALLOUM, F.N., MELCHIOR, R., GELPI, R.J., STUPIRSKI, J.C., BENATAR, A., GÓMEZ, K.A., MORALES, C., ABBATE, A. and RABINOVICH, G.A. Galectin-1 Controls Cardiac Inflammation and Ventricular Remodeling during Acute Myocardial Infarction. *The American Journal of Pathology*. 2013, **182**(1), 29–40. ISSN 0002-9440. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.09.022>.
29. BATALLER, R. and BRENNER, D.A. Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2005, **115**(2), 209–218. ISSN 0021-9738. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1172/jci24282>.
30. WYNN, T.A., 2011. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *The journal of experimental medicine*, vol. 208, no. 7, ISSN 0022-1007. DOI 10.1084/jem.20110551. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20110551>.
31. WYNN, T.A. and RAMALINGAM, T.R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nature Medicine*. 2012, **18**(7), 1028–1040. ISSN 1546-170X. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2807>.
32. BOCHATON-PIALLAT, M.-L., GABBIANI, G. and HINZ, B. The myofibroblast in wound healing and fibrosis: answered and unanswered

- questions. *F1000Research*. 2016, **5**, 752. ISSN 2046-1402. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.8190.1>.
33. MARRERO, M.B., SCHIEFFER, B., PAXTON, W.G., HEERDT, L., BERK, B.C., DELAFONTAINE, P. and BERNSTEIN, K.E. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature*. 1995, **375**(6528), 247–250. ISSN 1476-4687. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/375247a0>.
34. STANLEY NAHMAN, N., Jr, ROTHE, K.L., FALKENHAIN, M.E., FRAZER, K.M., DACIO, L.E., MADIA, J.D., LEONHART, K.L., KRONENBERGER, J.C. and STAUCH, D.A. Angiotensin II induction of fibronectin biosynthesis in cultured human mesangial cells: Association with CREB transcription factor activation. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1996, **127**(6), 599–611. ISSN 0022-2143. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2143\(96\)90151-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2143(96)90151-1).
35. RUIZ-ORTEGA, M., LORENZO, Ó., RUPÉREZ, M., BLANCO, J. and EGIDO, J. Systemic Infusion of Angiotensin II into Normal Rats Activates Nuclear Factor-κB and AP-1 in the Kidney. *The American Journal of Pathology*. 2001, **158**(5), 1743–1756. ISSN 0002-9440. [http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64130-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64130-2).
36. RUIZ-ORTEGA, M., LORENZO, O., RUPÉREZ, M., KÖNIG, S., WITTIG, B. and EGIDO, J. Angiotensin II Activates Nuclear Transcription Factor κB Through AT 1 and AT 2 in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*. 2000, **86**(12), 1266–1272. ISSN 1524-4571. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1161/01.res.86.12.1266>.
37. RUIZ-ORTEGA, M., LORENZO, Oscar, SUZUKI, Y., RUPÉREZ, M. and EGIDO, J. Proinflammatory actions of angiotensins. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. 2001, **10**(3), 321–329. ISSN 1062-4821. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1097/00041552-200105000-00005>.
38. CAREY, R.M. AT2 Receptors: Potential Therapeutic Targets for Hypertension. *American Journal of Hypertension*. 2016, **30**(4). ISSN 1941-7225. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/ajh/hpw121>.

-
39. WEISS, D., KOOLS, J.J. and TAYLOR, W.R. Angiotensin II–Induced Hypertension Accelerates the Development of Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice. *Circulation*. 2001, **103**(3), 448–454. ISSN 1524-4539. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1161/01.cir.103.3.448>.
40. EGIDO, J., ALCÁZAR, R. and RUIZ-ORTEGA, M., 2003. Angiotensina II: péptido clave en el daño vascular y renal. *Nefrología: publicación oficial de la Sociedad Española Nefrología*, vol. 23,. ISSN 0211-6995. Disponible en: <https://www.revistanefrologia.com/es-angiotensina-ii-peptido-clave-el-articulo-X0211699503029170>.
41. OLIVARES-SILVA, F., DE GREGORIO, N., ESPITIA-CORREDOR, J., ESPINOZA, C., VIVAR, R., SILVA, D., OSORIO, J.M., LAVANDERO, S., PEIRÓ, C., SÁNCHEZ-FERRER, C. and DÍAZ-ARAYA, G. Resolvin-D1 attenuation of angiotensin II-induced cardiac inflammation in mice is associated with prevention of cardiac remodeling and hypertension. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2021, **1867**(12), 166241. ISSN 0925-4439. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166241>.
42. GUAN, A.-L., HE, T., SHAO, Y.-B., CHI, Y.-F., DAI, H.-Y., WANG, Y., XU, L., YANG, X., DING, H.-M. and CAI, S.-L. Role of Jagged1-Hey1 Signal in Angiotensin II-induced Impairment of Myocardial Angiogenesis. *Chinese Medical Journal*. 2017, **130**(3), 328–333. ISSN 0366-6999. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4103/0366-6999.198928>.
43. LIN, L., GONG, H., GE, Jingyi, JIANG, G., ZHOU, N., LI, L., YE, Y., ZHANG, G., GE, Junbo and ZOU, Y. High density lipoprotein downregulates angiotensin II type 1 receptor and inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011, **404**(1), 28–33. ISSN 0006-291X. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.037>.
44. SRIRAMULA, S., CARDINALE, J.P., LAZARTIGUES, E. and FRANCIS, J. ACE2 overexpression in the paraventricular nucleus attenuates angiotensin II-induced hypertension. *Cardiovascular Research*. 2011, **92**(3), 401–408. ISSN 1755-3245. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvr242>.

-
45. LOWRY, Oliver H., NIRA ROSEBROUGH, A. Lewis FARR y Rose J. RANDALL. *PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT*. *The journal of biological chemistry*, vol. 193 (noviembre de 1951), n.º 1, pp. 265–275. ISSN 0021-9258. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6).
46. IDRIS-KHODJA, N., MIAN, M. O. R., PARADIS, P. and SCHIFFRIN, E. L., 2014. Dual opposing roles of adaptive immunity in hypertension. *European heart journal*. 2014. Vol. 35, no. 19, p. 1238–1244. DOI 10.1093/eurheartj/ehu119.
47. MONASSIER, Laurent, Roy COMBE y Lahcen El FERTAK. *Mouse models of hypertension*. *Drug Discovery Today: Disease Models*, vol. 3 (septiembre de 2006), n.º 3, pp. 273–281. ISSN 1740-6757. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2006.10.008>.
48. MARRERO, Mario B., Bernhard SCHIEFFER, William G. PAXTON, Lauri HEERDT, Bradford C. BERK et al. *Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor*. *Nature*, vol. 375 (mayo de 1995), n.º 6528, pp. 247–250. ISSN 1476-4687. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/375247a0>.
49. NAKAMURA, Shinya, Ikuko NAKAMURA, Lijun MA, Douglas E. VAUGHAN y Agnes B. FOGO. *Plasminogen activator inhibitor-1 expression is regulated by the angiotensin type 1 receptor in vivo*. *Kidney International*, vol. 58 (julio de 2000), n.º 1, pp. 251–259. ISSN 0085-2538. Disponible en: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00160.x>.
50. FONTANA ESTÉVEZ F. S, et al. *Genetic Deletion of Galectin-3 Exacerbates Age-Related Myocardial Hypertrophy and Fibrosis in Mice*. *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 56 (agosto de 2022), n.º 4, pp. 353–366. ISSN 1421-9778. Disponible en: <https://doi.org/10.33594/000000556>.
51. USHIO-FUKAI, Masuko, A. Maziar ZAFARI, Toshiki FUKUI, Nobukazu ISHIZAKA y Kathy K. GRIENGLING. *p22phox Is a Critical Component of the*

- Superoxide-generating NADH/NADPH Oxidase System and Regulates Angiotensin II-induced Hypertrophy in Vascular Smooth Muscle Cells*. Journal of Biological Chemistry, vol. 271 (septiembre de 1996), n. ° 38, pp. 23317–23321. ISSN 1083-351X. Disponible en: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.38.23317>.
52. ZAFARI, A. Maziar, Masuko USHIO-FUKAI, Marjorie AKERS, Qiqin YIN, Aalok SHAH et al. *Role of NADH/NADPH Oxidase-Derived H₂O₂ in Angiotensin II-Induced Vascular Hypertrophy*. Hypertension, vol. 32 (septiembre de 1998), n.º 3, pp. 488–495. ISSN 1524-4563. Disponible en: <https://doi.org/10.1161/01.hyp.32.3.488>.
53. GUZIK, Tomasz J., Nick E. J. WEST, Edward BLACK, Denise MCDONALD, Chandi RATNATUNGA et al. *Vascular Superoxide Production by NAD(P)H Oxidase*. Circulation Research, vol. 86 (mayo de 2000), n.º 9. ISSN 1524-4571. Disponible en: <https://doi.org/10.1161/01.res.86.9.e85>.
54. RUIZ-ORTEGA, Marta, Silvia GONZÁLEZ, Daniel SERÓN, Enric CONDOM, Carmen BUSTOS et al. *ACE inhibition reduces proteinuria, glomerular lesions and extracellular matrix production in a normotensive rat model of immune complex nephritis*. Kidney International, vol. 48 (diciembre de 1995), n.º 6, pp. 1778–1791. ISSN 0085-2538. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/ki.1995.476>.
55. HISADA, Yutaka, Takeshi SUGAYA, Masaya YAMANOUCHI, Hiromi UCHIDA, Hisako FUJIMURA et al. *Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice*. Journal of Clinical Investigation, vol. 103 (marzo de 1999), n. ° 5, pp. 627–635. ISSN 0021-9738. Disponible en: <https://doi.org/10.1172/jci2454>.
56. CABRAL-PACHECO, Griselda A., Idalia GARZA-VELOZ, Claudia CASTRUITA-DE LA ROSA, Jesús M. RAMIREZ-ACUÑA, Braulio A. PEREZ-ROMERO et al. *The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their*

Inhibitors in Human Diseases. International Journal of Molecular Sciences, vol. 21 (diciembre de 2020), n. ° 24, p. 9739. ISSN 1422-0067. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms21249739>.