



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

525
anys
1499 - 2024

Programa de Doctorado en Fisiología

Departamento de Fisiología

Facultad de Medicina y Odontología

**Efectos del ácido valproico sobre la función de
la aorta abdominal en conejos con infarto
agudo de miocardio**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Begoña Belmonte Alonso

Dirigida por:

Dra. María Dolores Mauricio Aviñó

Dra. Eva Serna García

Dra. Solanye Guerra Ojeda

Valencia, abril de 2025

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

Dña. Eva Serna García, Profesora Titular del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València,

Dña. Solanye Jacqueline Guerra Ojeda, Investigadora Postdoctoral del Dpto. de Fisiología de la Universitat de València,

CERTIFICA/N:

Que la presente memoria, titulada “**Efectos del ácido valproico sobre la función de la aorta abdominal en conejos con infarto agudo de miocardio**”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por **Dña. Begoña Belmonte Alonso**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que conste firman el presente certificado en Valencia, a 15 de abril de 2025.

Fdo. María Dolores Mauricio Aviñó

Fdo. Eva Serna García

Fdo. Solanye Jacqueline Guerra Ojeda

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras, la Dra. María Dolores Mauricio, la Dra. Eva Serna, y la Dra. Solanye Guerra, por haberme acogido en el laboratorio y haber podido así realizar este trabajo. Gracias por toda la ayuda recibida y por darme la oportunidad de seguir formándome en este campo.

A los Dres. José Vila y Martín Aldasoro, por ofrecer su ayuda cuando lo necesitamos y por ser tan atentos en todo momento.

Al Dr. Luis Such, por haber puesto a nuestra disposición el modelo de infarto agudo de miocardio, su laboratorio y quirófano experimental para la obtención de muestras, así como a su equipo de investigación, los Dres. Antonio Alberola, Javier Chorro, Manolo Zarzoso, Irene del Canto, Luis Such Miquel, Germán Parra, Carlos Soler, Oscar Arias y Patricia Genovés.

A las técnicas de laboratorio, por su amabilidad y dedicación.

A las secretarias, por su eficiencia, así como a Inma, por esos pequeños momentos de desconexión y, en general, a todo el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Por último, agradecer a las personas más allegadas para mí, que me han ayudado a lidiar con todo el estrés y han sido de gran apoyo en esta etapa. A mi familia, por interesarse por mi trabajo y mi esfuerzo. A mis amigos, por todos los consejos y los momentos que han hecho más amena mi trayectoria. A mi compañera de laboratorio Andrea, por aguantarme en mis momentos de desesperación. Y, finalmente, al que ha sido mi principal y mayor apoyo posible: Santi, gracias infinitas.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVD), such as acute myocardial infarction (AMI), are associated with endothelial dysfunction, characterised by reduced nitric oxide (NO) bioavailability. Treatment of AMI consists of rapid reperfusion, which is not without side effects. In this context, histone deacetylase (HDAC) inhibitors such as valproic acid (VPA) have been suggested as a possible treatment to reduce ventricular injury following AMI. However, the effects of VPA on vascular function after AMI and on NO synthesis and signalling are not yet fully understood. Therefore, the aim of this study was to examine whether VPA protects vascular function in the abdominal aorta through mechanisms that increase NO-dependent signalling in an *in vivo* model of AMI.

Our study was conducted in male White New Zealand rabbits, in which AMI was induced by occlusion of the left circumflex coronary artery for one hour, followed by reperfusion. The rabbits were divided into three experimental groups: a sham surgery or control group, an AMI group, and a VPA-treated AMI group. Five weeks later, abdominal aorta was isolated to study the vascular function and to quantify protein expression. Blood was also taken for plasma determination of nitrate and nitrite (NO_x) levels using a colorimetric assay.

Our results showed that AMI decreased the endothelial response to ACh, without altering the endothelium-independent response to sodium nitroprusside, indicating endothelial dysfunction. Treatment with VPA was able to reverse this AMI-induced dysfunction, and in addition increased vascular smooth muscle sensitivity to NO. On the other hand, VPA was able to restore the protein levels of the antioxidant enzyme superoxide dismutase 1 (SOD1), which was decreased by AMI. The mechanism of action of VPA was ruled out as being related to the expression of nitric oxide synthase, soluble guanylate cyclase, or arginase 2, concluding that the endothelial improvement was attributed to its antioxidant effect.

We also studied the effects of VPA on the sympathetic nervous system (SNS), endothelin 1 (ET-1) and angiotensin II (Ang II), involved in the pathophysiology of

AMI. Our results showed that AMI increased the vasoconstriction induced by NE and ET-1. This effect was reversed by VPA, which promoted up-regulation of α_2 -adrenergic receptors and ETB, and down-regulation of ETA receptors compared to AMI. Although no changes in the vascular response to Ang II were observed in rabbits with AMI or treated with VPA, an increase in angiotensin type 2 receptor (ATR2) expression was observed with VPA treatment.

In conclusion, VPA favours vasodilation by increasing NO bioavailability, probably due to its antioxidant effect. Furthermore, VPA could act as a vascular protector by modulating SNS, ET-1 and Ang II in aorta, which, added to its cardioprotective effect, would make it a promising candidate for the treatment of AMI.

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), como el infarto agudo de miocardio (IAM), se relacionan con disfunción endotelial, caracterizada por una biodisponibilidad reducida de óxido nítrico (NO). El tratamiento del IAM consiste en la rápida reperfusión, que no está exenta de efectos secundarios. En este contexto, se ha sugerido como posible tratamiento a los inhibidores de las histonas desacetilasas (HDAC), como el ácido valproico (VPA) para reducir la lesión ventricular posterior a un IAM. Sin embargo, los efectos del VPA sobre la función vascular, y sobre la síntesis y señalización del NO, todavía no se comprenden completamente. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue examinar si el VPA protege la función vascular en la aorta abdominal a través de mecanismos que aumenten la señalización dependiente de NO en un modelo in vivo de IAM.

Nuestro estudio se realizó en conejos macho White New Zealand, a los cuales se les indujo un IAM mediante la oclusión de la arteria coronaria circunfleja izquierda durante una hora, seguida de reperfusión. Los conejos se distribuyeron en tres grupos experimentales: un grupo sometido a cirugía simulada o grupo control, un grupo con IAM, y un grupo con IAM tratado con VPA. Cinco semanas después, se aisló la aorta abdominal para el estudio de la función vascular en baño de órganos y cuantificar la expresión proteica. También se tomó sangre para la determinación plasmática de los niveles de nitratos y nitritos (NO_x) a partir de un ensayo colorimétrico.

Nuestros resultados mostraron que el IAM disminuyó la respuesta relajante a la ACh, sin alterar la respuesta independiente del endotelio al nitroprusiato sódico (NPS), lo que indicaba una disfunción endotelial. El tratamiento con VPA logró revertir esta disfunción inducida por el IAM, además de incrementar la sensibilidad del músculo liso vascular al NO. Por otro lado, el VPA logró restaurar los niveles de la enzima antioxidante superóxido dismutasa 1 (SOD1), que había disminuido por el IAM. Se descartó que el mecanismo de acción del VPA estuviera relacionado con la expresión

de la óxido nítrico sintasa, la guanilato ciclasa soluble, o la arginasa 2, concluyendo que la mejora endotelial se atribuía a su efecto antioxidante.

Con respecto a la respuesta vasoconstrictora, estudiamos los efectos del VPA sobre el sistema nervioso simpático (SNS), la endotelina 1 (ET-1) y la angiotensina II (Ang II), involucrados en la fisiopatología del IAM. Nuestros resultados mostraron que el IAM aumentó la vasoconstricción inducida por la NE y la ET-1. Este efecto fue revertido por el VPA, el cual promovió una regulación al alza de los receptores α_2 y ETB, y una regulación a la baja de los receptores ETA comparados con el IAM. Aunque no se observaron cambios en la respuesta vascular a la Ang II en conejos con IAM o tratados con VPA, se observó un aumento en la expresión del receptor de angiotensina tipo 2 (ATR2) con el tratamiento con VPA.

En conclusión, el VPA favorece la vasodilatación al aumentar la biodisponibilidad de NO, probablemente debido a su efecto antioxidante. Además, el VPA podría actuar como un protector vascular al modular el SNS, la ET-1 y la Ang II en aorta, lo que, sumado a su efecto cardioprotector, lo convertiría en un candidato prometedor para el tratamiento del IAM.

RESUM

Les malalties cardiovasculars (ECV), com l'infart agut de miocardi (IAM), es relacionen amb disfunció endotelial, caracteritzada per una biodisponibilitat reduïda d'òxid nítric (NO). El tractament de l'IAM consisteix en la ràpida reperfusió, que no està exempta d'efectes secundaris. En este context, s'ha suggerit com a possible tractament als inhibidors de les histones desacetilasas (HDAC), com l'àcid valproic (VPA) per a reduir la lesió ventricular posterior a un IAM. No obstant això, els efectes del VPA sobre la funció vascular, i sobre la síntesi i senyalització del NO, encara no es comprenen completament. Per tant, l'objectiu d'este estudi va ser examinar si el VPA protegeix la funció vascular en l'aorta abdominal a través de mecanismes que augmenten la senyalització dependent de NO en un model in vivo d' IAM.

El nostre estudi es va realitzar en conills mascle White New Zealand, als quals se'ls va induir un IAM mitjançant l'oclusió de l'artèria coronària circumflexa esquerra durant una hora, seguida de reperfusió. Els conills es van distribuir en tres grups experimentals: un grup sotmés a cirurgia simulada o grup control, un grup amb IAM, i un grup amb IAM tractat amb VPA. Cinc setmanes després, es van aïllar l'aorta abdominal per a l'estudi de la funció vascular en bany d'òrgans i quantificar l'expressió proteica relacionada amb la síntesi i senyalització del NO. També es va prendre sang per a la determinació plasmàtica dels nivells de nitrats i nitrits (NO_x) per colorimetria.

Els nostres resultats van mostrar que l'IAM va disminuir la resposta relaxant a l'acetilcolina, sense alterar la resposta independent de l'endoteli al nitroprusiato sòdic, la qual cosa indicava una disfunció endotelial. El tractament amb VPA va aconseguir revertir esta disfunció induïda per l'IAM, a més d'incrementar la sensibilitat del múscul llis vascular al NO. D'altra banda, el VPA va aconseguir restaurar els nivells de l'enzim antioxidant superòxid dismutasa 1 (SOD1), que havien disminuït per l'IAM. Es va descartar que el mecanisme d'acció del VPA estiguera relacionat amb l'expressió de l'òxid nítric sintasa, la guanilat ciclase

soluble, o l'arginasa 2, concloent que la millora endotelial s'atribuïa al seu efecte antioxidant.

Respecte a la resposta vasoconstrictora, estudiarem els efectes del VPA sobre el sistema nerviós simpàtic (SNS), l'endotelina 1 (ET-1) i l'angiotensina II (Ang II), involucrats en la fisiopatologia de l'IAM. Els nostres resultats van mostrar que l'IAM va augmentar la vasoconstricció induïda per la NE i l'ET-1. Este efecte va ser revertit pel VPA, el qual va promoure una regulació a l'alça dels receptors adrenèrgics α_2 i ETB, i una regulació a la baixa dels receptors ETA. Encara que no es van observar canvis en la resposta vascular a l'Ang II en conills amb IAM o tractats amb VPA, es va observar un augment en l'expressió del receptor d'angiotensina tipus 2 (ATR2) amb el tractament amb VPA.

En conclusió, el VPA afavorix la vasodilatació en augmentar la biodisponibilitat de NO, probablement a causa del seu efecte antioxidant. A més, el VPA podria actuar com un protector vascular en modular els efectes del SNS, l'ET-1 i l'Ang II en aorta, la qual cosa, sumat al seu efecte cardioprotector, el convertiria en un candidat prometedor per al tractament del IAM.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Infarto agudo de miocardio	3
1.2. Papel fisiológico del endotelio	8
1.3. Infarto agudo de miocardio y disfunción endotelial	15
1.4. El ácido valproico y sus efectos vasculares	20
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS.....	27
3.1. Objetivo general	29
3.2. Objetivos específicos	29
MATERIAL Y MÉTODOS	31
4.1. Animales de experimentación	33
4.2. Procedimiento experimental	33
<i>4.2.1. Grupos de estudio</i>	33
<i>4.2.2. Extracción y preparación de las muestras</i>	34
<i>4.2.3. Estudio de la reactividad vascular</i>	35
<i>4.2.4. Viabilidad vascular</i>	37
<i>4.2.5. Curvas concentración-respuesta</i>	37
<i>4.2.6. Determinación de los niveles plasmáticos de NO_x</i>	38
<i>4.2.7. Soluciones y fármacos empleados en el baño de órganos</i>	38
4.3. Análisis de la expresión proteica mediante western blot	39
<i>4.3.1. Separación y transferencia de las proteínas</i>	39
<i>4.3.2. Inmunodetección</i>	40
4.4. Análisis estadístico	42
RESULTADOS	43
5.1. Estudio de la respuesta vasodilatadora	45
5.2. Participación de factores relajantes en respuesta a la acetilcolina	47
5.3. Estudio de la respuesta vasoconstrictora	52
5.4. Estudio de la expresión proteica	56
<i>5.4.1. Efecto del tratamiento con VPA en un modelo de IAM sobre la expresión proteica de eNOS, peNOS, ARG1 y ARG2</i>	56

5.4.2. Efecto del tratamiento con VPA en un modelo de IAM sobre la expresión proteica de SOD1 y SOD2.....	60
5.4.3. Efecto del tratamiento con VPA en un modelo de IAM sobre la expresión proteica de receptores adrenérgicos α_1 y α_2	62
5.4.4. Efecto del tratamiento con VPA en un modelo de IAM sobre la expresión proteica de receptores de la ET-1 (ETA Y ETB)	64
5.4.5. Efecto del tratamiento con VPA en un modelo de IAM sobre la expresión proteica de los receptores de la Ang II (ATR1 y ATR2)	66
5.5. Niveles plasmáticos de nitratos y nitritos	68
DISCUSIÓN	69
6.1. Ventajas y limitaciones del procedimiento experimental	71
6.2. Selección de conejo como modelo experimental de IAM y tratamiento con VPA	72
6.3. Efecto del VPA sobre un modelo de IAM. Estudio de la vasodilatación	73
6.4. Efecto del IAM y del VPA sobre la vasoconstricción	80
6.5. Efecto del VPA en un modelo de IAM sobre los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos	83
6.6. Consideraciones finales	84
CONCLUSIONES	87
BIBLIOGRAFÍA	91

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AA: Ácido araquidónico
ACh: Acetilcolina
ADMA: Dimetilarginina asimétrica
AMPc: Adenosín monofostato cíclico
Ang II: Angiotensina II
ARG: Arginasa
ATP: Adenosín trifosfato
ATR: Receptor de angiotensina
BCA: Ácido bicinconínico
BH4: Tetrahidrobiopterina
Big ET-1: Big Endotelina-1
BSA: Seroalbúmina bovina
COX: Ciclooxygenasa
DDAHs: Dimetilarginina dimetilaminohidrolasas
ECA: Enzima convertidora de angiotensina
ECE: Enzima convertidora de endotelina
ECV: Enfermedades cardiovasculares
EDH: Hiperpolarización derivada del endotelio
eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial
ET-1: Endotelina-1
ETA: Receptor de endotelina tipo A
ETB: Receptor de endotelina tipo B
GABA: Ácido γ -aminobutírico
GC: Guanilato ciclasa
GMPc: Guanosín monofosfato cíclico
GPx: Glutación peroxidasa
GR: Glutación reductasa
GSH: Glutación

GTP: Guanosín trifosfato
HAT: Histonas acetiltransferasas
HDAC: Histonas desacetilasas
IAM: Infarto agudo de miocardio
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible
KCl: Cloruro potásico
L-NAME: NG-nitro-L-arginina metil éster
NE: Norepinefrina
nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintasa
NO_x: Nitratos y nitritos
NPS: Nitroprusiato sódico
MDA: Malondialdehído
MLV: Músculo liso vascular
O₂⁻: Anión superóxido
ONOO⁻: Peroxinitrito
PGI₂: Prostaciclina
PGH₂: Prostaglandina H₂
PKI: Proteína quinasa I
RAS: Sistema renina-angiotensina
ROS: Especies reactivas de oxígeno
TXA₂: Tromboxano A₂
SDMA: Dimetilarginina simétrica
SOD: Superóxido dismutasa
VPA: Ácido valproico

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Papel de las HAT y de las HDAC.....	6
Figura 2. Principales interacciones entre la célula endotelial (CE) y la célula del músculo liso vascular (CMLV) mediante la liberación de sustancias vasoactivas relajantes.....	11
Figura 3. Principales interacciones entre la célula endotelial (CE) y la célula del músculo liso vascular (CMLV) mediante la liberación de sustancias vasoactivas contráctiles.....	14
Figura 4. Recolección de sangre por goteo en un tubo con EDTA mediante punción de la vena marginal de la oreja.	34
Figura 5. Esquema del baño de órganos y preparación experimental utilizada para el registro de la tensión isométrica.	36
Figura 6. Curvas concentración-respuesta a la (A) acetilcolina (ACh, 10^{-9} - 10^{-5} M) y al (B) nitroprusiato sódico (NPS, 10^{-10} – 10^{-5} M) en segmentos de aorta de los tres grupos precontraídas con norepinefrina (NE, 10^{-7} M).....	46
Figura 7. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (ACh, 10^{-9} – 10^{-5} M) en segmentos de aorta de los tres grupos precontraídas con norepinefrina (NE, 10^{-7} M) en ausencia y presencia de indometacina (10^{-5} M).....	48
Figura 8. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (ACh, 10^{-9} - 10^{-5} M) en segmentos de aorta de los tres grupos precontraídas con norepinefrina (NE, 10^{-7} M) en ausencia y presencia de L-NAME (10^{-4} M).....	49
Figura 9. Producción de NO inducido por acetilcolina (ACh) en los 3 grupos de estudio calculado a partir de la diferencia de AUC de la curva concentración-respuesta en presencia y ausencia de L-NAME (10^{-4} M).	50
Figura 10. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (ACh, 10^{-9} – 10^{-5} M) en segmentos de aorta de los tres grupos precontraídas con norepinefrina (NE, 10^{-7} M) en ausencia y presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NAME (10^{-4} M) y KCl (20 mM).	51
Figura 11. Curvas concentración-respuesta a la norepinefrina (NE, 10^{-9} – 10^{-4} M) en segmentos de aorta de los tres grupos.	52
Figura 12. Curvas concentración-respuesta a la ET-1 en segmentos de aorta de los tres grupos.	54
Figura 13. Curvas concentración-respuesta a la angiotensina II (Ang II, 10^{-11} - 10^{-6} M) en segmentos de aorta de los tres grupos.....	55

Figura 14. Expresión proteica de eNOS (A) y peNOS (B) en aorta de conejo de los tres grupos de estudio.....	57
Figura 15. Expresión proteica de ARG1 (A) y ARG2 (B) en aorta de conejo de los tres grupos de estudio.	59
Figura 16. Expresión proteica de SOD1 (A) y SOD2 (B) en aorta de conejo de los tres grupos de estudio.	61
Figura 17. Expresión proteica de los receptores adrenérgicos α_1 (A) y α_2 (B) en aorta de conejo de los tres grupos de estudio... ..	63
Figura 18. Expresión proteica de los receptores de la ET-1, ETA (A) y ETB (B) en aorta de conejo de los tres grupos de estudio.	65
Figura 19. Expresión proteica de los receptores de la Ang II, ATR1 (A) y ATR2 (B) en aorta de conejo de los tres grupos de estudio.....	67
Figura 20. Concentración plasmática de No_x (A) y L-arginina (B) en los tres grupos de estudio.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados para la determinación de la expresión proteica por Western Blot..... 41

Tabla 2. Valores de $pD2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en presencia de ACh en segmentos de aorta de conejo de los tres grupos de estudio. 47

Tabla 3. Valores de $pD2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en presencia de NPS en segmentos de aorta de conejo de los tres grupos de estudio. 47

Tabla 4. Valores de $pD2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en presencia de NE en segmentos de aorta de conejo de los tres grupos de estudio. 53

Tabla 5. Valores de $pD2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en presencia de ET-1 en segmentos de aorta de conejo de los tres grupos de estudio. 54

Tabla 6. Valores de $pD2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en presencia de Ang II en segmentos de aorta de conejo de los tres grupos de estudio. 55

INTRODUCCIÓN

1.1. Infarto agudo de miocardio

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de mortalidad y morbilidad en todo el mundo (Incalza et al., 2018; Li et al., 2022) siendo un problema de salud pública que contribuye al 30% de la mortalidad mundial y al 10% de la carga mundial de morbilidad. En 2005, de un total de 58 millones de muertes en todo el mundo, 17 millones se debieron a ECV y, entre ellas, 7,6 millones a enfermedades coronarias (Mendis et al., 2011). Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se espera que mueran más de 23 millones de personas al año por ECV para 2030, debido al envejecimiento de la población y al aumento de la prevalencia de la diabetes y la obesidad (WHO, 2014). Dentro de las ECV se incluyen varias afecciones, como la aterosclerosis o la insuficiencia cardíaca, y factores de riesgo clave, como la hipertensión o la obesidad (Gray et al., 2024). Sin embargo, los mecanismos que median el desarrollo y la progresión de estas enfermedades siguen sin comprenderse por completo (Li et al., 2022).

Las manifestaciones principales de enfermedad coronaria incluyen angina de pecho, infarto de miocardio y muerte cardíaca súbita. La de mayor prevalencia es el infarto agudo de miocardio (IAM), que produce un daño irreversible en el músculo cardíaco, provocando la pérdida de millones de cardiomiocitos (Tian et al., 2019, Grönros et al., 2013; Tratsiakovich et al., 2013). En los estudios epidemiológicos, la incidencia de infarto de miocardio en una población puede utilizarse como indicador indirecto para estimar la carga de cardiopatía coronaria (Mendis et al., 2011). El IAM representa la primera causa de mortalidad en todo el mundo (15,9 millones/año) (Fernandez Rico et al., 2022). En España, entre el 2007 y 2008, se observó un aumento de la tasa de incidencia con la edad, tanto en hombres como en mujeres. La tasa de incidencia pasó de 169 y 28 casos/100.000/año en el grupo de 35-64 años, a 2.306 y 1.384 casos/100.000/año en mayores de 85 años para hombres y mujeres respectivamente (Vázquez-Oliva et al., 2018). Sin embargo, a pesar de que en la

actualidad la incidencia del IAM sigue siendo menor en mujeres, la mortalidad es mayor en este grupo. Esta alta mortalidad en mujeres, podría ser, en parte atribuida, por un lado, al peor pronóstico del IAM con elevación del segmento ST en este grupo, y al infra diagnóstico y menor uso de tratamiento intervencionista en este colectivo (de Miguel-Yanes et al., 2021).

El IAM puede clasificarse en varios tipos según la etiología: tipo 1, por rotura de una placa aterosclerótica; tipo 2, por un desequilibrio entre la demanda y el suministro de oxígeno al miocardio de forma secundaria a otras enfermedades agudas (esta es la forma más común y representa más de un tercio de las hospitalizaciones); tipo 3, en el cual se produce la muerte cardíaca súbita e inesperada, a menudo con síntomas que sugieren isquemia miocárdica; tipo 4, relacionado con la intervención coronaria percutánea; y tipo 5, relacionado con la revascularización aorto-coronaria con injerto (Chapman et al., 2017). El IAM es un evento patológico que implica una remodelación ventricular y la necrosis de las células del miocardio debido a una isquemia significativa y mantenida (Cheng et al., 2019), que desemboca en una hipertrofia cardíaca patológica, con cicatrices de colágeno de tipo IV (Cheng et al., 2019), así como de colágeno de tipo I/III (Yu et al., 2018). Finalmente, el deterioro en la función contráctil del corazón conduce a una insuficiencia cardíaca (Y. Wu et al., 2011).

Los cambios que ocurren en los cardiomiocitos vienen definidos por una gran variedad de modificaciones de la cromatina, como la acetilación, la metilación, la fosforilación y la remodelación de la cromatina dependiente de ATP, y tienen un impacto en la expresión génica (Tian et al. 2019). Estas alteraciones están englobadas en la epigenética, que se define como cambios hereditarios y temporales en la expresión y función génica que se llevan a cabo a través de ciertos mecanismos genómicos, dejando la secuencia de ADN intacta. La importancia de la epigenética reside en su fuerte relación con factores ambientales, lo que puede alterar el

epigenoma y modular la expresión génica (Rizzacasa et al., 2019). En concreto, la acetilación de histonas tiene un papel crucial en el desarrollo de ECV (Lee et al., 2007). Las cargas positivas de las histonas se neutralizan mediante la adición de un grupo acetilo a los residuos de lisina presentes en las colas a partir del acetil coenzima A por las histonas acetiltransferasas (HAT) para así formar ϵ -N-acetil lisina. Como consecuencia, la interacción con las cargas negativas del ADN se desestabiliza, activando y permitiendo el reclutamiento de factores de transcripción. Este proceso puede verse revertido por las enzimas que realizan la función opuesta, las histonas desacetilasas (HDAC) (Tang & Zhuang, 2019). Se trata de un grupo de enzimas clasificadas en cuatro clases (I, II, III y IV) (Lyu et al., 2019), involucradas en la remodelación de la cromatina, ejerciendo su función mediante la eliminación de los grupos acetilo de los residuos de lisina (Ruess et al., 2016), que produce la condensación de la cromatina y la consecuente inhibición de la transcripción (Chiu et al., 2013). La figura 1 representa el papel de las HAT y de las HDAC.

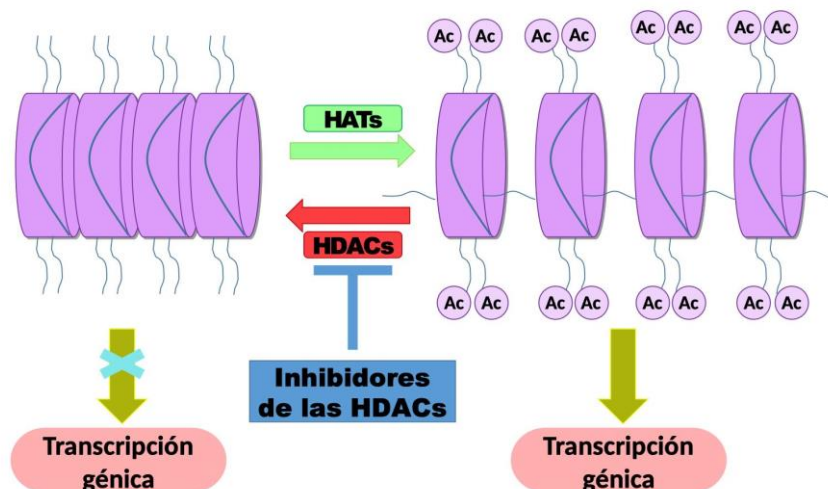


Figura 1. Papel de las HAT y de las HDAC. Las histonas acetiltransferasas (HAT) acetilan los residuos de lisina de las histonas, lo que promueve la transcripción, ya que se neutralizan las cargas positivas de las histonas y, por tanto, se impide que interactúen con las cargas negativas del ADN. Por el contrario, las histonas desacetilasas (HDAC) eliminan estos grupos acetilo, por lo que se condensa la cromatina y se inhibe la transcripción. Adaptado de (Lyu et al., 2019).

El incremento en la expresión y la actividad de las HDAC se ha relacionado con procesos patológicos como las arritmias, la insuficiencia cardíaca, el síndrome coronario agudo y la hipertrofia (Benedetti et al., 2015). Concretamente, la sobreexpresión de las HDAC de clase I y de clase II interviene en la cardiopatía isquémica (Tang & Zhuang, 2019) y el inicio y la progresión de fibrosis en el corazón (Lyu et al., 2019). Por ejemplo, en un modelo de IAM en ratón, se encontró que el incremento de la actividad de las HDAC provocaba un aumento del tamaño del infarto (L. Zhang et al., 2018), y en un modelo de IAM en rata, los niveles de las HDAC de clase I y de clase II estaban elevados (Nural-Guvener et al., 2014).

La prevalencia de las patologías cardiovasculares, entre ellas el IAM, ha llevado a la búsqueda de tratamientos para prevenirlo o paliar sus efectos posteriores, como el desencadenamiento de una insuficiencia cardíaca. La implementación de

medidas de prevención primaria y la optimización en el uso de tratamientos específicos tanto farmacológicos como intervencionistas han reducido la incidencia del IAM en las personas más jóvenes (Vázquez-Oliva et al., 2018). Los tratamientos actuales se enfocan en la reperfusión para reestablecer el abastecimiento de oxígeno al miocardio, lo que no está exento de efectos secundarios, ya que tras la reperfusión del miocardio se activan vías de señalización que contribuyen a la disfunción produciendo el denominado daño por isquemia reperfusión (Kalogeris et al., 2012; Sanada et al., 2011; Yellon & Hausenloy, 2007). Por lo tanto, es necesaria la farmacoterapia destinada a reducir la lesión por reperfusión (Uriel et al., 2018).

Los tratamientos farmacológicos que se emplean actualmente no pueden regenerar por completo el miocardio y la lesión ventricular. Por lo que la búsqueda de tratamientos contra la lesión por isquemia/reperfusión es una necesidad actual. En este sentido, la inhibición de las HDACs podría ser un tratamiento prometedor contra la lesión por isquemia/reperfusión. De hecho, se han iniciado estudios, en su mayoría en animales de investigación, con el objetivo de evaluar los efectos de la inhibición de las HDACs tras un IAM (Pickell et al., 2020; Sanchez-Fernandez et al., 2024; M. Yang et al., 2020). Las HDAC de clase I, II y IV requieren iones de zinc para desacetilar su sustrato y compartir un dominio de desacetilación funcional, lo que apunta a que un solo compuesto podría inhibir todas las HDAC dependientes de zinc de forma simultánea. Por otro lado, las HDAC de clase III pueden inhibirse con nicotinamidas (S. Yoon et al., 2019). Los experimentos en modelos animales sugieren que la inhibición de las HDAC mejora la remodelación cardíaca, la función ventricular y disminuye el tamaño del infarto y la inflamación, entre otros efectos beneficiosos (Sanchez-Fernandez et al., 2024). Entre estos inhibidores de las HDACs encontramos el ácido valproico (VPA) (H. Jung et al., 2019; S.-Y. Wu et al., 2015), que podría ser un buen candidato para el tratamiento del IAM. El VPA actúa como inhibidor de las HDAC, disminuyendo la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α , inhibiendo así la fibrosis y mejorando la función

cardíaca (Soria-Castro et al., 2019a). Además, se ha sugerido que el VPA puede ser cardioprotector cuando se administra a pacientes con IAM en dosis de 1.000 mg/día o superiores (English et al., 2022). A nivel cardiovascular el VPA detiene del crecimiento, la diferenciación y la apoptosis de los cardiomiocitos *in vitro* (Lee et al., 2007). En modelos animales de ratón y rata, el VPA bloquea la hipertrofia cardíaca inducida por la Ang II de forma eficaz (H. Jung et al., 2019), atenúa el desarrollo de aterosclerosis y actúa de manera positiva sobre la remodelación del ventrículo izquierdo después del IAM (Olesen et al., 2011). También se ha observado que el VPA reduce el tamaño del infarto en un modelo de rata mediante un mecanismo que implica la sobreexpresión de FoxM1, un gen codificador de proteínas que preserva la función cardíaca y regula los genes implicados en la supresión de la respuesta inmune (Tian et al., 2019). Sin embargo, a nivel vascular sus efectos no se conocen por completo, por ello en esta tesis nos centramos en estudiar los efectos del tratamiento del IAM con VPA en la aorta abdominal, explorando mecanismos endoteliales y musculares que pudieran alterarse en el IAM y revertirse con el VPA.

1.2. Papel fisiológico del endotelio y otros factores reguladores del tono vascular

El sistema vascular es una red tubular ramificada compuesta por vasos sanguíneos, tales como las arterias, las venas y los capilares, que abastecen de nutrientes y oxígeno a los tejidos, y eliminan los desechos catabólicos (Moccia et al., 2019). El interior de estos vasos sanguíneos está recubierto por una monocapa de células conocida como endotelio, inicialmente definido como una barrera con funciones de permeabilidad selectiva al agua y electrolitos, exclusivamente (Rajendran et al., 2013). Sin embargo, se ha demostrado que sus funciones son esenciales para regular la circulación de las células sanguíneas, el tono vascular, la actividad plaquetaria, la inflamación y el crecimiento vascular, entre otras (Daiber et al., 2017).

En condiciones fisiológicas, las células endoteliales sintetizan y secretan sustancias que afectan a su propia función y a la función de las células musculares lisas adyacentes (Alem, 2019). Mediante esta secreción de sustancias vasoactivas, se regula el tono vascular en respuesta a diversos estímulos, dependiendo del lecho vascular (Rajendran et al., 2013). El endotelio participa, por tanto, activamente en la regulación del tono vascular mediante la liberación de sustancias vasodilatadoras, como la prostaciclina (PGI_2) o el óxido nítrico (NO), y mediante la iniciación del mecanismo conocido como hiperpolarización derivada del endotelio (EDH), un proceso que involucra la activación de canales de potasio y la modulación de la relajación vascular (Cahill & Redmond, 2016). El endotelio también libera sustancias vasoconstrictoras, como la endotelina-1 (ET-1), la angiotensina II (Ang II) (Smiljic, 2017) y el tromboxano A_2 (TXA_2) (Ellinsworth et al., 2014).

La PGI_2 se sintetiza a partir del ácido araquidónico (AA) en dos pasos: primero, el AA se convierte en prostaglandina H_2 (PGH_2) a través de la vía de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) (Mauricio et al., 2013), para finalmente sintetizar PGI_2 mediante la enzima prostaciclina sintasa (Korbecki et al. 2014). La vía de la ciclooxigenasa 1 (COX-1) está más relacionada con la síntesis de prostanoides contráctiles, como el tromboxano A_2 (TXA_2) (Aldasoro et al., 2007; H. Chen, 2018), que es sintetizado a partir de la PGH_2 , pero a través de la enzima tromboxano sintasa (Korbecki et al., 2014) y que también favorece la agregación plaquetaria (Rucker & Dhamoon, 2021).

Por otro lado, el NO es un potente vasodilatador, que además inhibe la proliferación de las células del músculo liso vascular (MLV) y la agregación plaquetaria (Rajeshwari et al., 2014). El NO se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina por acción de la óxido nítrico sintasa (NOS), que posee tres isoformas principales: neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS) (Hayashi et al., 2021). La L-arginina acepta electrones de NADPH a través del cofactor

tetrahidrobiopterina (BH4) (Grandl & Wolfrum, 2018), en una reacción que da como resultado la formación de L-citrulina junto con la síntesis de NO. La liberación del NO del endotelio y su fácil difusión a través de las membranas biológicas da como resultado la estimulación de la guanilato ciclasa soluble en las células del músculo liso vascular, que provoca un aumento de GMP cíclico (GMPc) (Cahill & Redmond, 2016). Una de las acciones más importantes del GMPc para el sistema cardiovascular es la activación dependiente de GMPc de la proteína quinasa I (PKI) en el endotelio. Esto, a su vez, activa la miosina fosfato, que da como resultado la liberación de Ca^{2+} de las reservas intracelulares, lo que permite la vasodilatación (Triposkiadis et al., 2022).

Por otra parte, la L-arginina también es sustrato de la enzima arginasa. Por tanto, ambas enzimas, eNOS y arginasa, compiten por el mismo sustrato (R. B. Caldwell et al., 2015). La arginasa escinde la L-arginina para formar urea y L-ornitina. La L-ornitina es necesaria para la proliferación celular, la formación de colágeno y otras funciones fisiológicas (R. W. Caldwell et al., 2018). Cuando aumenta la actividad de la arginasa, se produce un mayor consumo de L-arginina, disminuyendo así la producción de NO. Por ello, esta reducción en la síntesis de NO daría lugar a una disfunción endotelial (Pernow & Jung, 2013), presente en el desarrollo de la lesión por isquemia-reperfusión y en IAM (Roy et al., 2023), cuyo mecanismo clave es esta disminución en la biodisponibilidad de NO (Tratsiakovich et al., 2013).

Se han descrito dos isoformas distintas de arginasa: la arginasa I (ARG1), que es una enzima citosólica que se expresa principalmente en el hígado, aunque también se encuentra en el músculo liso vascular, las células endoteliales y el miocardio, y la arginasa II (ARG2), que es mitocondrial y se expresa en varios tejidos, incluidos el corazón y los vasos sanguíneos (Gonon et al., 2012).

El mecanismo de EDH procude una vasodilatación hiperpolarizando la célula muscular mediante la salida de K^+ (Cahill & Redmond, 2016).

Específicamente, la EDH se inicia en las células endoteliales a través de un aumento del Ca^{2+} intracelular y la subsiguiente activación de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de baja e intermedia conductancia. La salida de K^+ de las células endoteliales produce hiperpolarización, que se propaga a las células musculares lisas adyacentes a través de las uniones gap (Jackson, 2022). Además, en este mecanismo se ha descrito la activación de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} de alta conductancia, localizados principalmente en la célula muscular, que favorecen la salida de K^+ hacia el espacio mioendotelial. Por último, la hiperpolarización se mantiene gracias a la activación de la bomba Na^+-K^+ y de los canales rectificadores de K^+ (Garland & Dora, 2017; Goto et al., 2018). La figura 2 muestra los principales factores relajantes y sus interacciones.

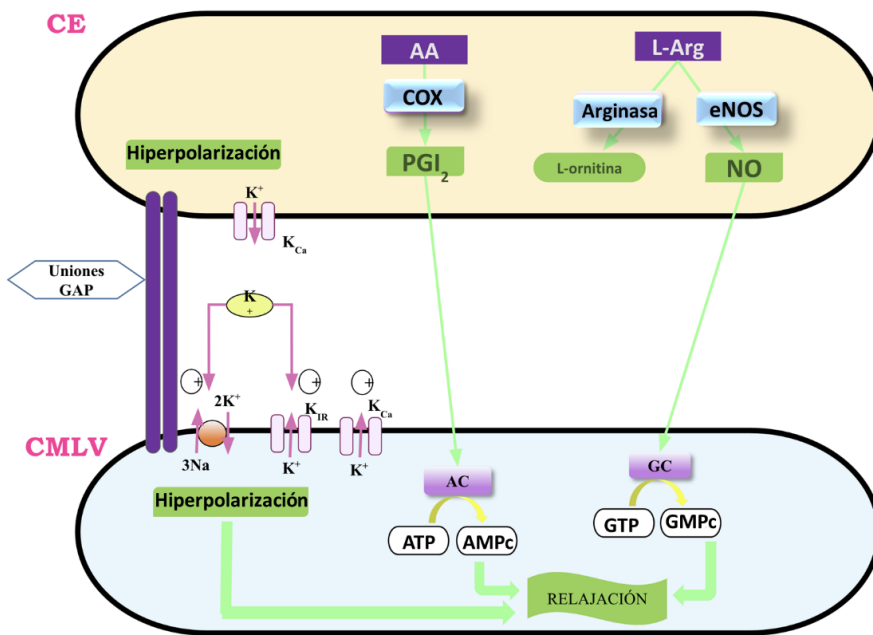


Figura 2. Principales interacciones entre la célula endotelial (CE) y la célula del músculo liso vascular (CMLV) mediante la liberación de sustancias vasoactivas relajantes. AA: ácido araquidónico. L-Arg: L-arginina; COX: ciclooxigenasa; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; PGI_2 : prostaciclina; NO: óxido nítrico; ATP: adenosín trifosfato; AMPc: adenosín monofosfato cíclico; GC: guanilato ciclasa; GTP: guanosín trifosfato; GMPc: guanosín monofosfato cíclico. Adaptado de (Cahill & Redmond, 2016).

Por otro lado, el endotelio produce también sustancias vasoconstrictoras. Una de las más potentes es la ET-1. Su síntesis implica el procesamiento de un precursor por una proproteína convertasa de tipo furina a un intermediario inactivo, big ET-1. Este péptido puede luego ser escindido directamente por la enzima convertidora de endotelina (ECE) en ET-1, o bien a través de un proceso de dos pasos que hidroliza la big ET-1 (Houde et al., 2016). La ET-1 es sintetizada principalmente por las células endoteliales, y contribuye al mantenimiento del tono vascular, promoviendo la inflamación y la proliferación de las células del MLV (Thorin & Webb, 2010). La ET-1 ejerce su efecto a través de la activación de sus dos tipos de receptores, tipo A (ETA) y tipo B (ETB), ambos localizados en el MLV (Aflyatumova et al., 2018; Spieker et al., 2001). El receptor ETB se encuentra también en las células endoteliales, provocando vasodilatación (Mazzuca & Khalil, 2012; Spieker et al., 2001) a través de la vía del NO (Park et al., 2022).

En la homeostasis cardiovascular, la regulación neural del tono vasomotor está mediada, en parte, por la ET-1. La evidencia experimental sugiere que la ET-1 puede estimular la actividad central y periférica del SNS a través de los receptores ETA (Bruno et al., 2011). En concreto, la ET-1 y sus receptores, ETA y ETB, participan en la fisiopatología del IAM y modulan la activación simpática a nivel miocárdico y suprarrenal (Lekkas et al., 2019). Esta interacción se ejerce en el miocardio ventricular, en el que se ha demostrado la presencia de los receptores ETA y ETB en las varicosidades del nervio simpático (Kolettis et al., 2014). La activación de ETA conduce a una inhibición de la recaptación de NE, lo que resulta en un aumento en la liberación de NE. Por el contrario, la activación de ETB conduce a una inhibición de la liberación de NE exocitótica. Por lo tanto, la abundancia relativa de ETA y ETB puede favorecer un aumento o una disminución de la liberación de NE (Lehmann et al., 2014).

La evidencia clínica y experimental sugiere que la hiperactividad del sistema nervioso simpático y los niveles elevados de ET-1 están directamente

correlacionados con la progresión del IAM (Abukar et al., 2016). En un modelo de IAM en rata, el bloqueo de los receptores ETA cerebrales disminuyó la respuesta simpática y produjo un aumento de las respuestas vagales, lo que conduce a un entorno electrofisiológico más homogéneo (Lekkas et al., 2019). La microinyección local de ET-1 en el ganglio estrellado izquierdo resultó en una activación simpática aumentada y una arritmia ventricular agravada inducida por isquemia en perros Beagle macho mediante la vía de señalización de los receptores ETA (Z. Wang et al., 2019). En corazones isquémicos aislados de cobayas, la ET-1 exógena aumentó la liberación de NE y las arritmias ventriculares (Isaka et al., 2007).

Al igual que la ET-1, la Ang II es otro factor contráctil importante liberado por el endotelio, y juega un papel crucial en el sistema renina-angiotensina (RAS). La renina actúa sobre el angiotensinógeno para formar angiotensina I, que se convertirá en Ang II (activa fisiológicamente) por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), localizada en el endotelio (Vargas Vargas et al., 2022). Las funciones de la Ang II están mediadas por receptores específicos acoplados a proteína G, siendo estos de tipo 1 (ATR1) y de tipo 2 (ATR2) unidos a la membrana (Méndez-Valdés et al., 2022). La mayor parte de la actividad cardiovascular de Ang II está mediada por los receptores ATR1, cuya activación causa la contracción de las células del MLV, incrementa la contractilidad del miocardio e induce la producción de aldosterona y la liberación de catecolaminas de la médula suprarrenal (Mirabito Colafella et al., 2019; Sun, 2010). El aumento de aldosterona es perjudicial para el endotelio, que lleva a una reducción de la liberación de NO y, en consecuencia, a una menor capacidad vasodilatadora (Triebel & Castrop, 2024). Por otro lado, los receptores ATR2 inducen una vasodilatación que está mediada en gran parte por el NO (Kaschina et al., 2017). La señalización intracelular mediada por ATR2 incluye, entre otras, la regulación de la vía NO-GMPc. Esto amortigua los efectos de la Ang II sobre los receptores ATR1 atenuando la vasoconstricción (Triebel & Castrop, 2024). Además, la Ang II estimula la apoptosis, el crecimiento celular, la

inflamación, la fibrogénesis y la diferenciación celular, regula la expresión génica de sustancias bioactivas y activa múltiples vías de señalización intracelular, que producen la remodelación de los tejidos (Sun, 2010). En la figura 3 se muestran los factores contráctiles principales y sus interacciones.

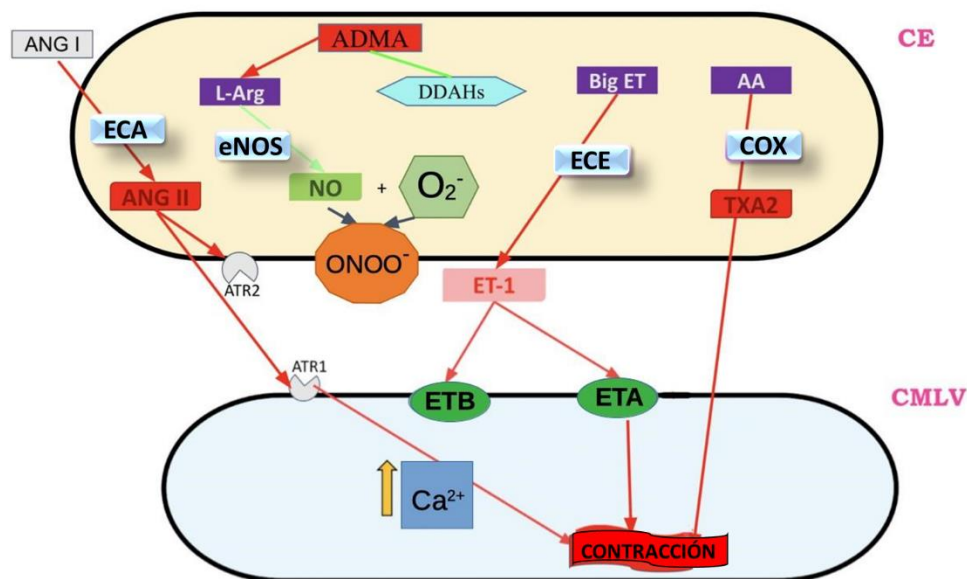


Figura 3. Principales interacciones entre la célula endotelial (CE) y la célula del músculo liso vascular (CMLV) mediante la liberación de sustancias vasoactivas contráctiles. ADMA: dimetilarginina asimétrica. ANG I: Angiotensina I. ANG II: angiotensina II. ATR1: receptor 1 de angiotensina II. ATR2: receptor 2 de angiotensina II. AA: ácido araquidónico. Big ET-1: big endotelina-1. COX: ciclooxigenasa. DDAHs: dimetilarginina dimetilaminohidrolasas. ECA: Enzima convertidora de angiotensina. ECE: enzima convertidora de endotelina. eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial. ET-1: endotelina-1. ET_A, ET_B: receptores de endotelina tipo A y B. L-Arg: L-arginina. NO: óxido nítrico. O₂⁻: anión superóxido. ONOO⁻: peroxinitrito. TXA₂: tromboxano A2. Adaptado de (Beñaldo F. et al. 2017).

La activación del sistema nervioso simpático (SNS), a través de la liberación de norepinefrina (NE) y la unión a sus receptores α y β regula el tono vascular (Al-Gburi et al., 2017). En condiciones fisiológicas, la NE se libera a través de las vesículas sinápticas mediante un mecanismo dependiente de Ca^{2+} hacia la hendidura sináptica. Una vez que la membrana se despolariza, el Ca^{2+} intracelular aumenta y

las vesículas que contienen NE migran y se fusionan con la membrana, lo que permite que la NE entre en la hendidura sináptica (Lehmann et al., 2014).

La NE es capaz de aumentar la presión arterial sistémica mediante la estimulación de los receptores adrenérgicos α (Russell et al., 2021; Zuo et al., 2022). Los receptores adrenérgicos α_1 se encuentran principalmente en el tejido muscular liso, lo que produce vasoconstricción tras su estimulación. Esto, además de aumentar la presión arterial, también induce efectos inotrópicos positivos en los cardiomiocitos. La estimulación de los receptores adrenérgicos α_2 ubicados en el endotelio (Vanhoutte et al., 2017) da como resultado una vasodilatación arterial (Zuber et al., 2011).

La actividad simpática excesiva es, sin duda un factor importante que contribuye a la fisiopatología de la hipertensión, insuficiencia cardíaca, enfermedad renal terminal, y muchas otras enfermedades cardiovasculares crónicas (J. Lu et al., 2014). Las primeras etapas de la insuficiencia cardíaca se caracterizan por una alta actividad simpática y altos niveles de NE circulatoria, que afectan perjudicialmente a los órganos vitales, entre ellos el corazón (Abassi et al., 2022).

1.3. Infarto agudo de miocardio y disfunción endotelial

La disfunción endotelial subyace en todas las ECV, y se puede definir como el desequilibrio en la función reguladora del endotelio que conduce a una pérdida de vasodilatación (Janaszak-Jasiecka et al., 2023; Widmer & Lerman, 2014). Generalmente, se caracteriza por una disminución en la biodisponibilidad del NO, aunque otros mecanismos pueden estar implicados. Además, la disfunción endotelial se asocia a un estado proinflamatorio y protrombótico (Aflyatunova et al., 2018), caracterizado por vasoconstricción, activación plaquetaria, adhesión leucocitaria, mitogénesis, prooxidación, alteración de la coagulación e inflamación vascular

(Incalza et al., 2018; Kalkman, 2020). La disfunción endotelial está relacionada con los factores clásicos de riesgo cardiovascular, como son la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia, la diabetes mellitus y el tabaquismo crónico (Daiber et al., 2017).

El IAM se caracteriza por cambios en la estructura y función de la pared de estos vasos sanguíneos (Rajeshwari et al., 2014), formándose nuevas ramificaciones y aumentando en grosor y tamaño, además de incrementar la permeabilidad y la liberación de vesículas extracelulares, posiblemente para mediar la comunicación intercelular después de un IAM (X. Wu et al., 2021). Durante la isquemia, se produce una situación de hipoxia que afecta a la integridad de las células endoteliales y a su función de barrera, lo que incrementa la permeabilidad vascular y facilita la infiltración de células inflamatorias del tejido infartado (Prabhu & Frangogiannis, 2016).

La biodisponibilidad de NO se puede encontrar alterada por diversos mecanismos, como un aumento en la actividad de la arginasa, en los niveles de ADMA o ante un estado de estrés oxidativo (Janaszak-Jasiecka et al., 2023; Poeggeler et al., 2023). En los últimos años, se ha relacionado la arginasa con ECV y factores de riesgo cardiovascular, como la hipertensión, la aterosclerosis, la enfermedad vascular diabética o la reperfusión isquémica (Li et al., 2022; Tratsiakovich et al., 2013). La regulación al alza de la vía de la arginasa ha surgido como un factor importante que contribuye a la reducción de la biodisponibilidad de NO al competir con la eNOS por el sustrato L-arginina (Gonon et al., 2012; Grönros et al., 2013; Molek et al., 2021). El aumento de la actividad de la arginasa puede causar desacoplamiento de la eNOS, lo que conduce a una mayor formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y por ende a una reducción en la biodisponibilidad de NO (Chandra et al., 2012). Por ejemplo, se ha observado un aumento de la actividad de la arginasa durante la isquemia-reperfusión en arteria coronaria que conduce a una menor producción de NO (H. Jung et al., 2019).

Además, un estudio realizado en un modelo porcino de isquemia-reperfusión demostró que la isquemia-reperfusión miocárdica aumentaba la actividad de la arginasa sin afectar la expresión de ARG1 ni ARG2, y que la inhibición de la arginasa miocárdica local protegía al corazón contra la lesión por isquemia-reperfusión a través de una mayor producción de NO (Gonon et al., 2012). Por otro lado, un estudio realizado en un modelo de rata con ligadura de la arteria coronaria durante 30 minutos y posterior perfusión, concluyó que la actividad de la arginasa se incrementaba durante la perfusión y que este aumento se mantenía hasta 8 días. Además, la inhibición de la actividad de la arginasa provocó una mejora a largo plazo de la función microvascular coronaria y la limitación del tamaño del infarto (Grönros et al., 2013). En pacientes con IAM, se observó una mayor afinidad de L-arginina por la arginasa (Molek et al., 2021). Otro estudio en ratas Sprague-Dawley con isquemia-reperfusión demostró que la actividad de la arginasa aumentaba en el miocardio durante la isquemia-reperfusión y que la inhibición de la arginasa por nor-NOHA después del inicio de la isquemia, pero antes de la perfusión, protegía de la lesión por isquemia-reperfusión del miocardio (Tratsiakovich et al., 2013). No obstante, a pesar de la extensa investigación clínica y experimental que indica el potencial de la arginasa como biomarcador y herramienta de diagnóstico para la progresión de las ECV, todavía no existe un estándar de definición clínica para la actividad de la arginasa o los niveles de expresión de ARG1 y ARG2 en sangre o tejidos para el diagnóstico de las ECV (Li et al., 2022).

En 1992, se describió por primera vez la presencia de ADMA, como inhibidor endógeno de la eNOS en plasma y orina (Korandji et al., 2007). Niveles elevados de ADMA disminuyen la producción de NO en las células endoteliales y, por lo tanto, la vasodilatación (Chalioti et al., 2020; Klinger et al., 2013; Korandji et al., 2007). Las metilargininas, como la ADMA, la dimetilarginina simétrica (SDMA), y la NG-metil-L-arginina (L-NMMA) son análogos estructurales de la L-arginina (Klinger et al., 2013). Éstas son sintetizadas por la enzima arginina

N-metiltransferasa (Pautz et al., 2021) y se eliminan por excreción renal, degradándose a L-citrulina por las dimetilarginina dimetilaminohidrolasas (DDAHs). La disminución de las DDAHs puede contribuir a una inhibición de la producción de NO (Palm et al., 2007).

Los niveles elevados de ADMA, por encontrarse más concentrado en plasma que el L-NMMA, se han convertido en un marcador de riesgo cardiovascular (Klinger et al., 2013), y son útiles para documentar el transcurso de la disfunción endotelial en las ECV (Gavriilaki et al., 2020). Los niveles elevados de ADMA y SDMA se han relacionado con mal pronóstico del IAM (Chalioiti et al., 2020; Korandji et al., 2007). En pacientes con enfermedad coronaria se encontraron niveles más altos de ADMA en plasma que en pacientes control (Valkonen & Laaksonen, 2004). En otro estudio en pacientes con IAM, se investigaron los niveles de ADMA durante 24 horas, observándose un incremento al inicio, lo que sugirió un aumento de la actividad plaquetaria a través de la supresión de la biodisponibilidad del NO (Bergheanu et al., 2011). Estos hallazgos pueden relacionar los niveles de ADMA con la aparición de futuros eventos cardiovasculares fisiopatológicos.

Otro de los factores clave en el desarrollo de las ECV es el estrés oxidativo, definido como un desequilibrio entre la producción de ROS y sustancias antioxidantes, de manera que las primeras prevalecen (Daiber et al., 2017; Dawson et al., 2008). Concretamente, la disfunción endotelial asociada al estrés oxidativo aparece por una disminución en la biodisponibilidad del NO cuando el anión superóxido (O_2^-) reacciona con el NO para formar peroxinitritos ($ONOO^-$) (Roumeliotis et al., 2020; Vrankova et al., 2019), un agente prooxidante muy potente que intensifica el desacoplamiento de eNOS al oxidar su cofactor BH_4 (Janaszak-Jasiecka et al., 2023). La BH_4 sirve en este proceso como donante de un electrón para el oxígeno unido al hemo, que activa el O_2 , permitiendo la siguiente oxidación de L-arginina a L-citrulina y NO. El cofactor BH_4 es, por tanto, esencial para una actividad

óptima de la eNOS (Stuehr & Haque, 2019). El desacoplamiento de la eNOS está presente en ECV, como la hipertensión arterial, la aterosclerosis o la insuficiencia cardíaca (Bendall et al., 2014).

Por otra parte, se ha demostrado que los niveles plasmáticos de ET-1 aumentan después de un IAM, lo que contribuye a la vasoconstricción coronaria que subyace a la isquemia miocárdica y la disfunción ventricular (Doggrell, 2004). En un modelo de isquemia en rata, se determinó que el receptor ETA mediaba la muerte de las células cardíacas a través de su interacción con ROS (Park et al. 2022). Por otro lado, el bloqueo del receptor ETA a corto plazo también redujo el tamaño del infarto en modelos animales de IAM (oclusión coronaria seguida de reperusión). Durante la oclusión de la arteria coronaria en rata, las arritmias ventriculares se redujeron mediante el bloqueo del receptor ETA. En el modelo de IAM en conejo, el bloqueo de la enzima convertidora de endotelina redujo el tamaño del infarto (Park et al. 2022).

Después de un IAM, uno de los componentes clave que participa en las modificaciones estructurales es la Ang II. La activación de Ang II se ha relacionado con los procesos fisiopatológicos del IAM (Zhang et al., 2018) y está implicada en diversas funciones fisiológicas que regulan la vasoconstricción, el gasto cardíaco, el crecimiento celular y la integridad de la pared vascular. Por otro lado, la producción de ROS inducida por Ang II puede dañar aún más el miocardio y agrandar el tamaño del infarto (Forrester et al., 2018). La Ang II induce un aumento en la tensión de la pared ventricular al actuar a través de un sistema de transducción de señales mediado por receptores y da como resultado el desarrollo de hipertrofia cardíaca (Shah et al., 2021). En las últimas décadas, varios autores han destacado la participación de Ang II en el IAM, concluyendo que la activación transitoria del sistema RAS y el aumento de los niveles de Ang II empeora la función cardiovascular (Duncan et al., 1997) (Forrester et al., 2018) (X. Zhang et al., 2018).

1.4. El ácido valproico y sus efectos vasculares

El VPA tiene una estructura química similar a la de los ácidos grasos de cadena corta (Rabadiya & Dudhrejiya, 2019) que se une a proteínas plasmáticas con un porcentaje mayor al 85%, lo cual conlleva a una menor tasa de eliminación y excreción en orina (Wahba & Bergez, 2020). Fue aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) en 1978 (Hwabejire et al., 2014), y actualmente es el fármaco antiepiléptico más utilizado (Wahba & Bergez, 2020). En mayo de 2018 la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) aprobó este fármaco para tratar la epilepsia y los desórdenes bipolares. Además, dio luz verde a algunos países europeos para probarlo en el tratamiento de la migraña. El VPA se usa también como tratamiento en pacientes con fobias sociales, dolor neuropático y esquizofrenia (Rabadiya & Dudhrejiya, 2019). A lo largo de los años, diversos estudios han demostrado que el VPA tiene un papel protector en el sistema nervioso (W. Zhao et al., 2020). Atraviesa la barrera hematoencefálica (Zhou et al., 2017) y aumenta la disponibilidad del ácido γ -aminobutírico (GABA), disminuyendo la hiperexcitabilidad neuronal (Soria-Castro et al., 2019b).

Como ya se ha comentado anteriormente, el VPA puede ser un candidato para tratar el IAM por sus beneficios a nivel cardiaco, sin embargo, los efectos que tiene a nivel vascular son todavía contradictorios o desconocidos. Por eso, en la presente tesis nos centramos en la vía del NO endotelial, la vía de la arginasa, el estrés oxidativo, la vía de la Ang II, ET-1 y la respuesta adrenérgica, puesto que todos estos sistemas se alterarían tras un IAM.

El VPA inhibe la función endotelial y la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* (Kvestad et al., 2014; Michaelis et al., 2004; Nevo et al., 2020). Por otro lado, el VPA podría mitigar los cambios en los patrones de expresión de genes vasculares y preservar la función endotelial, ya que atenúa la expresión de factores de permeabilidad vascular y angiogénicos (Causey et al., 2012). También se encontró

que el tratamiento con VPA inducía angiogénesis postisquémica y promovía la recuperación funcional a largo plazo en un modelo experimental de accidente cerebrovascular isquémico (Z. Wang et al., 2012). En pericitos microvasculares humanos, el VPA condujo a un aumento general en los genes asociados con la estabilización y maduración de los vasos, como la supervivencia endotelial, la formación, estabilización y ramificación del tubo endotelial y el mantenimiento de contactos directos entre células endoteliales (Karén et al., 2011). Estos hallazgos sugieren que la inhibición de HDAC inducida por VPA puede modular la expresión génica proangiogénica y contribuir a la angiogénesis postisquémica (Z. Wang et al., 2012).

Respecto al efecto del VPA sobre la expresión o actividad de la arginasa, hay pocos estudios que los evalúen y, de nuevo, los resultados son contradictorios. Por un lado se ha demostrado un descenso en los niveles de arginasa (Xie et al., 2018), mientras que otro grupo encontró un aumento de esta enzima (Gezginci-Oktayoglu et al., 2016). Si el VPA demostrara disminuir la actividad de la arginasa, aumentaría su idoneidad como tratamiento para la disfunción endotelial originada por el IAM.

En cuanto al efecto del VPA sobre el sistema ADMA-NO, los estudios tampoco son concluyentes. Algunos autores indicaron que el tratamiento con VPA aumentaba los niveles de ADMA (Oz et al., 2009; Ozdemir et al., 2011), lo que repercutiría en una menor producción de NO. Sin embargo, otros estudios han demostrado que el tratamiento con VPA aumentaba los niveles séricos de NO en niños (Karabiber et al., 2004; Peker et al., 2009). En cultivo de células embrionarias de aorta bovina y en aorta de ratones macho sanos, el VPA aumentó la producción de NO y la vasodilatación inducida por acetilcolina (Cho et al., 2014).

Con relación al estrés oxidativo, el VPA es capaz de atenuar sus efectos nocivos, ya que incrementa los niveles de sustancias antioxidantes como el ácido úrico

(Hamed et al., 2007), la superóxido dismutasa (SOD) y el glutatión (GSH), además de reducir los niveles de malondialdehído (MDA) (Shi et al., 2019; H. Wu et al., 2018) en tejido miocárdico, concretamente en ventrículo izquierdo (Shi et al., 2019), de ratas Sprague-Dawley (Wu et al., 2018). No obstante, otros estudios han determinado que el VPA podría producir un aumento de estrés oxidativo en tejido renal de ratas Sprague-Dawley (Gezginci-Oktayoglu et al., 2016).

Por último, no hay estudios que describan qué efectos vasculares tendría el VPA sobre el SNS, ET-1 y Ang II, activados tras un IAM. Si el VPA atenuase la respuesta a estos agonistas contráctiles, podría ejercer un efecto protector frente a la vasoconstricción excesiva inducida por el aumento de actividad de estos sistemas tras el IAM. Esto, junto a la controversia de los efectos endoteliales del VPA hace necesario investigar más en este campo antes de proponerlo como tratamiento para el IAM.

El grupo de investigación del Departamento de Fisiología GRELCA ha desarrollado un modelo de infarto agudo de miocardio en conejo y ha demostrado que el VPA reduce la magnitud del daño miocárdico (Genovés et al., 2020). En la presente tesis nos centramos en los efectos del tratamiento con VPA a nivel vascular en conejos con IAM, ahondando en los mecanismos por los que el VPA puede ejercer su efecto protector.

HIPÓTESIS

En base a los antecedentes expuestos, nuestra hipótesis es que el IAM provocaría una disminución de la capacidad vasodilatadora de la aorta abdominal, aumentando la poscarga y, por tanto, agravando la patología. El tratamiento con VPA podría tener efectos beneficiosos a nivel vascular, tal y como se ha demostrado a nivel cardíaco después de un IAM.

OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Partiendo de la hipótesis de que el IAM induce una disfunción vascular en aorta abdominal de conejo, nuestro objetivo principal era analizar los mecanismos que subyacen a tal disfunción y estudiar si el VPA ejerce un efecto protector vascular centrándonos en las vías de señalización del NO, adrenérgica, ET-1 y Ang II. El estudio se realizó en conejos macho White New Zealand divididos en tres grupos: control, IAM e IAM tratado con VPA (IAM + VPA).

3.2. Objetivos específicos

1. Estudiar la vasodilatación tanto dependiente (en respuesta a la acetilcolina, ACh) como independiente (en respuesta al nitroprusiato sódico, NPS) de endotelio en aorta de conejo de los tres grupos de estudio.
2. Determinar los mecanismos endoteliales que participan en la relajación a la ACh, centrándonos en la vía del NO, en aorta de conejo de los tres grupos de estudio.
3. Analizar la expresión proteica de las enzimas implicadas en la vía del NO y estrés oxidativo vascular.
4. Evaluar la respuesta a agonistas contráctiles como la NE, ET-1 y Ang II en aorta de conejo de los tres grupos de estudio.
5. Analizar la expresión proteica de los receptores que median la respuesta a los agonistas contráctiles estudiados.

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Animales de experimentación

Se utilizaron conejos macho White New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*) de 15 semanas de edad, bajo condiciones ambientales y alimentarias controladas según la normativa española RD 53/2013 por la que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Los animales permanecieron en jaulas específicas estabulados en la Unidad Central de Investigación de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de Valencia, alimentados con pienso estándar y agua, con una temperatura ambiente de $19 \pm 2^{\circ}\text{C}$, una humedad relativa de $55 \pm 10\%$ y ciclos de luz-oscuridad artificiales de 12 horas. Los protocolos experimentales y el cuidado animal siguieron la normativa 2010/63 de la Unión Europea sobre la protección de animales utilizados con fines científicos, y recibieron aprobación por parte del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Valencia (2015/VSC/PEA/00233 tipo 2). Para más detalle del modelo experimental consultar (Genovés et al., 2020).

4.2. Procedimiento experimental

4.2.1. Grupos de estudio

Los animales se dividieron en tres grupos: el grupo control estuvo constituido por un grupo de animales que fueron sometidos al mismo estrés quirúrgico, pero sin inducción de infarto (grupo control, $n=12$). En otro grupo de animales se indujo un IAM mediante una esternotomía media, se ocluyó la arteria coronaria circunfleja izquierda durante 1 hora. Posteriormente, se reperfundió la arteria mediante la eliminación de la oclusión y se cerró el tórax usando técnicas de sutura estándar. El tiempo transcurrido desde la inducción del IAM hasta el sacrificio fue de 6 semanas (grupo IAM, $n=15$). Por último, el tercer grupo consistió en administrar VPA a los

animales sometidos a la cirugía para crear un IAM, (grupo IAM + VPA, n=14). El tratamiento con VPA fue también de 6 semanas, iniciándose después de la inducción del IAM.

4.2.2. *Extracción y preparación de las muestras*

Antes del sacrificio, se procedió a la recolección de sangre de la vena marginal de la oreja en tubo con EDTA (Figura 4). La sangre se centrifugó a 2500 r.p.m. durante 15 minutos, se alicuotó el sobrenadante (plasma) en microtubos de 1.5 mL y se guardó a -20°C para la determinación plasmática de nitratos y nitritos (NO_x), L-arginina y ADMA.



Figura 4. Recolección de sangre por goteo en un tubo con EDTA mediante punción de la vena marginal de la oreja.

A continuación, se llevó a cabo la extracción de la aorta abdominal, que se limpió en placa Petri provistas con suero fisiológico. Bajo una lupa de disección con iluminación blanca, se separaron y desecharon los restos de tejido graso perivascular

y se procedió a cortarla en segmentos de unos 3mm de longitud, que fueron destinados inmediatamente al estudio de la reactividad vascular o congelados a -80°C para el estudio de la expresión proteica.

4.2.3. Estudio de la reactividad vascular

Los segmentos vasculares se montaron en un equipo para el registro de la tensión isométrica (Figura 5). La fuerza se midió en mg de contracción. Previamente al análisis de la respuesta de los segmentos vasculares a los diversos estímulos, se procedió a determinar la tensión basal óptima en un grupo de experimentos preliminares en segmentos de longitud y diámetro semejantes a los experimentales. Para ello, se registró la contracción inducida por el KCl (60 mM) después de exponer los segmentos arteriales a diversas tensiones pasivas (1, 2, 3 y 4 g). La tensión pasiva a la que se obtuvo la mayor respuesta contráctil se consideró como la tensión óptima de reposo y la que se consideraría como referencia para calibrar los transductores isométricos. La tensión pasiva óptima para la aorta de conejo fue de 3 g.

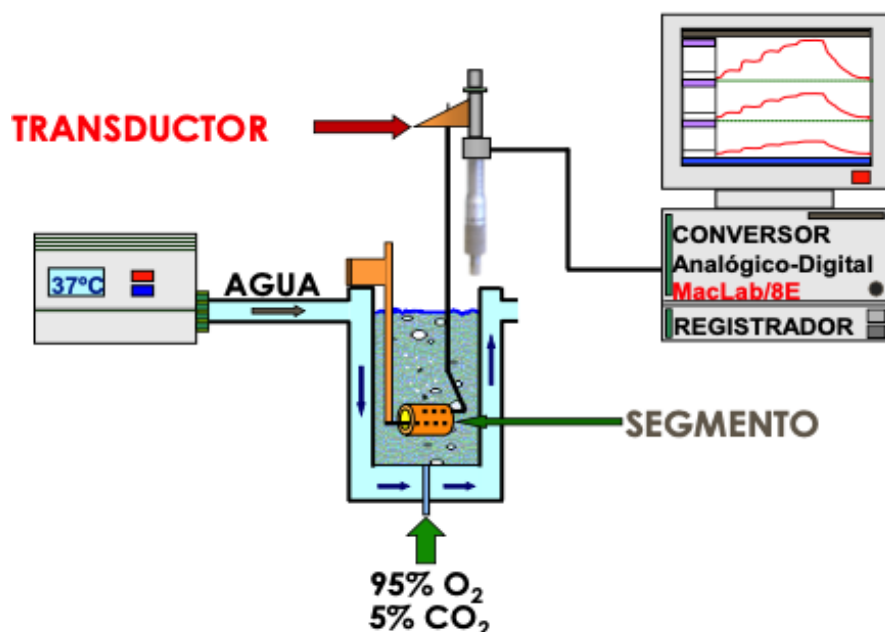


Figura 5. Esquema del baño de órganos y preparación experimental utilizada para el registro de la tensión isométrica.

La preparación experimental consiste en la introducción de dos alambres rígidos de acero inoxidable a través de la luz del anillo vascular. Uno de los alambres está unido a un soporte que a su vez se fija a la pared del baño de órganos y el otro se desplaza paralelamente al anterior y está conectado a un transductor de fuerza (FT03 Grass Instruments). Cada uno de los segmentos vasculares se introduce en un baño de órganos compuesto por pequeñas copas de vidrio con altura ajustable, cubriendo los segmentos vasculares con un volumen de 4 mL de solución de Krebs-Henseleit, cuya composición en mM es 115 NaCl, 4.6 KCl, 1.2 MgCl₂·6H₂O, 2.5 CaCl₂, 25 NaHCO₃, glucosa 11.1 y 0.01 EDTA disódico. Esta solución se equilibra con una mezcla gaseosa de O₂ (95%) y CO₂ (5%), que proporciona un pH entre 7,3 - 7,4. La temperatura se mantuvo constante a 37°C en las copas del sistema gracias a un termocirculador que libera y retorna agua destilada a esta temperatura usando un circuito estanco que rodea todo el sistema. Un tornillo micrométrico unido al

transductor isométrico (UF1 Pioden Controls Ltd) permite aplicar al anillo vascular la tensión pasiva adecuada separando los alambres. Los cambios de tensión isométrica se registran en un ordenador Macintosh utilizando un software Chart v7 y un sistema de adquisición de datos MacLab /8e (AD Instruments). Una vez terminado el montaje de las arterias, se dejan estabilizar aproximadamente 1 hora, realizando lavados cada 20 minutos con la solución de Krebs-Henseleit.

4.2.4. Viabilidad vascular

La capacidad de contracción del músculo liso vascular se comprobó por su respuesta al KCl (60mM), que provoca el aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular obteniendo una contracción inespecífica de receptor. La integridad funcional del endotelio se comprobó observando la presencia de relajación provocada por la ACh (10^{-7} - 10^{-6}) en segmentos previamente contraídos con NE (10^{-7} - 3×10^{-7}).

4.2.5. Curvas concentración-respuesta

Se realizaron curvas concentración-respuesta al nitroprusiato sódico (NPS, 10^{-9} - 10^{-5} M) para estudiar la relajación independiente de endotelio, y a la ACh (10^{-9} - 10^{-5} M) para comprobar la relajación dependiente de endotelio. En este último caso las curvas se realizaron en ausencia (control) y presencia de diferentes inhibidores:

- Indometacina (10^{-5} M), un inhibidor de la COX, para evaluar la participación de los prostanoideos.
- L-NAME (10^{-4} M), un inhibidor de la NOS, para evaluar la liberación de NO inducida por la ACh.
- Indometacina (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-4} M) + KCl (20 mM), para inhibir la producción de prostaglandinas, NO y EDH.

Todas las incubaciones se realizaron durante 20 minutos en el baño de órganos.

También se realizaron curvas concentración-respuesta a los siguientes agonistas contráctiles:

- NE (10^{-9} - 10^{-4} M).
- ET-1(10^{-11} - 10^{-7} M).
- Ang II (10^{-11} - 10^{-6} M).

4.2.6. *Determinación de los niveles plasmáticos de NO_x*

La determinación de los niveles plasmáticos de NO_x se realizó por colorimetría (kit de Cayman Chemical Company®) según el método de Griess. Este método se basa en la conversión enzimática de nitratos a nitritos por la enzima nitrato reductasa. Como producto final se obtiene un compuesto azoderivado que absorbe a 540-550 nm (Bryan & Grisham, 2007). Las muestras de plasma se descongelaron, filtraron y diluyeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los estándares de nitratos y nitritos se diluyeron sucesivamente de mayor a menor concentración con el diluyente de reacción para la obtención de la recta patrón. Todas las diluciones se colocaron en los pocillos y se calculó la media de la absorbancia de cada concentración. Los resultados se expresan en μ M.

4.2.7. *Soluciones y fármacos empleados en el baño de órganos*

Todos los reactivos utilizados para el estudio de la función vascular fueron distribuidos por Sigma-Merck. Las soluciones concentradas de los fármacos se realizaron con agua bidestilada, excepto la indometacina que se disolvió en etanol y bicarbonato sódico (150 mM) ajustado a un pH 7,4 con HCl. La concentración de etanol final en el baño fue inferior al 0,01%. Las diluciones correspondientes se hicieron con suero fisiológico.

4.3. Análisis de la expresión proteica mediante western blot

Segmentos de 50 mg de aorta de conejo se descongelaron y se sumergieron en buffer de lisis (0,125 M, pH 6,8, 2% SDS, 19% glicerol y 1% (v/v) inhibidor de proteasas) en un microtubo de 1,5 mL para su homogeneización por fricción mecánica. Posteriormente, se procedió a la centrifugación de los microtubos a 10.000 r.p.m. durante 20 minutos a una temperatura de 4°C. Tras la centrifugación se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración proteica total mediante el método del ácido bicinonínico (BCA) empleando una curva estándar de seroalbúmina bovina (BSA).

4.3.1. Separación y transferencia de las proteínas

Una vez conocida la concentración proteica de las muestras, se añadió 0,5% de la fracción volumétrica (v/v) de 2-mercaptoetanol y 1% (v/v) azul de bromofenol, y se calentó durante 5 minutos a 95°C. La separación de las proteínas se realizó por electroforesis desnaturante SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). Para ello, se cargaron entre 20-30 µg de proteína de cada muestra en geles de resolución, con un gradiente de poliacrilamida del 4 al 15% en función del peso molecular de la proteína a estudiar. Para medir la eficacia de la transferencia y determinar el tamaño de las proteínas de interés, se utilizó una proteína estándar multicolor (Broad MultiColor Pre-Stained Protein Standard, GenScript). La electroforesis se realizó en el sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio Rad), que contenía un tampón de migración (Tris 25mM, glicina 200mM y SDS al 0.1% (p/v), pH 8,3). Para la electroforesis se aplicó un voltaje constante de 140 V durante 50-60 minutos. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas separadas en el gel se transfirieron en medio húmedo a una membrana de difloruro de polivinidileno (PVDF) (Bio-Rad, Hércules, CA, EE.UU), activada previamente con metanol. Para la transferencia se usó un tampón de transferencia (Tris 25 mM, 190

mM glicina y 20% de metanol), y se aplicó un voltaje constante de 60 V durante 1 hora a 4°C.

4.3.2. *Inmunodetección*

Las membranas se incubaron con una solución de bloqueo para evitar las uniones inespecíficas. Esta solución está compuesta por BSA al 5% en TBS-Tween (Tris-Cl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5). El bloqueo de las membranas se realizó en agitación suave, durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C en agitación suave con el anticuerpo primario (Tabla 1), diluido en la solución de bloqueo. Al día siguiente, las membranas se lavaron con TBS-Tween (3 lavados de 5 minutos) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario (anti-rabbit para eNOS, peNOS, receptor adrenérgico α_1 , receptor adrenérgico α_2 , SOD1, ETA, ETB, ATR1, ATR2, ARG1 y ARG2; y anti-mouse para SOD2 y β -actina) junto con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP), diluida en la solución de bloqueo. Finalmente, se lavaron las membranas con TBS-Tween tres veces durante 5 minutos para eliminar el exceso de anticuerpo secundario, y se incubaron con el reactivo comercial ECL (Pierce, Thermo Scientific), que permite la detección por quimioluminiscencia de los anticuerpos conjugados con HRP. La actividad de la peroxidasa se observó mediante el sistema ImageQuant LAS-4000 (GE Healthcare Life Science, Barcelona, Spain), y la señal obtenida se cuantificó por densitometría utilizando el software informático Image J. La proteína de interés se normalizó a la β -actina, que se utilizó como proteína de control de carga.

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados para la determinación de la expresión proteica por Western Blot.

Anticuerpo	Peso molecular (KDa)	Dilución	Referencia	Casa comercial
SOD1	20	1:1000	ADI-SOD-10	Enzo Life Sciences
SOD2	21	1:1000	sc-137254	Santa Cruz Biotechnology
eNOS	133	1:1000	ab76198	Abcam
peNOS	135	1:300	BS3447R	Thermo Fisher Scientific
ARG1	35	1:1000	NBP1-32731SS	Novus Biologicals
ARG2	39	1:500	NBP2-15446	Novus Biologicals
ETA	48	1:1000	Ab85163	Abcam
ETB	50	1:5000	Ab117529	Abcam
Receptor adrenérgico α_1	50	1:1000	NB100-78585	Novus Biologicals
Receptor adrenérgico α_2	48	1:1000	NBP2-22452	Novus Biologicals
ATR1	41	1:1000	PA5-20812	Thermo Fisher Scientific
ATR2	36	1:2000	PA5-20813	Thermo Fisher Scientific
β -actina	42	1:5000	NB-600-501SS	Novus Biologicals

4.4. Análisis estadístico

Los valores se indican como la media $\pm$ error estándar (e.e) para los resultados de la reactividad vascular y como la media $\pm$ desviación estándar para los resultados de expresión proteica.

La relajación se expresa como porcentaje de la contracción inducida por la NE. La concentración de agonista que produce el 50% de la respuesta máxima (CE_{50}) se calculó para cada curva concentración-respuesta por un método de análisis de regresión no lineal. Los resultados se expresan como pD_2 calculado a partir del $-\log(CE_{50})$. En cada grupo de experimentos, n indica el número de animales.

La concentración plasmática de NO_x fue determinada por extrapolación del valor de absorbancia para cada muestra con la recta patrón.

Se utilizó el programa GraphPad PRISM (versión 10.0; GraphPad Software Inc.) para llevar a cabo el análisis estadístico. En primer lugar, se comprobó si la distribución de las muestras cumplía con la normalidad. En caso de ser así, las diferencias entre los distintos grupos fueron estimadas por la aplicación de un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías aplicando la prueba de Tukey o Bonferroni. Se consideraron las diferencias como significativas cuando el valor de $p < 0,05$. Se aplicó la prueba T (prueba paramétrica). En caso de que la distribución de las muestras no fuera normal, se aplicó la prueba de Mann-Whitney U para muestras no apareadas (prueba no paramétrica).

RESULTADOS

5.1. Estudio de la respuesta vasodilatadora

En segmentos de aorta abdominal previamente contraídos con NE (10^{-7} M), se obtuvieron curvas concentración-respuesta a la ACh y al NPS, que muestran la capacidad vasodilatadora dependiente e independiente de endotelio respectivamente. La ACh (10^{-9} - 10^{-5} M) produjo una relajación dependiente de la concentración en los tres grupos de estudio, con un efecto significativamente menor en el grupo IAM comparado con el grupo control (Figura 6, Tabla 2). Sin embargo, la relajación inducida por la ACh en el grupo IAM + VPA, fue similar a la obtenida en el grupo control, indicando que la disfunción endotelial producida por el IAM se revierte con el VPA (Figura 6A, Tabla 2).

El NPS (10^{-10} - 10^{-5} M) también indujo una relajación dependiente de la concentración en los tres grupos de estudio, sin embargo y a diferencia de lo observado en respuesta a la ACh, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos control e IAM (Figura 6B, Tabla 3). Estos resultados confirman que la menor respuesta a la ACh observada en el grupo IAM no es debida a una disminución de la capacidad relajante del músculo liso vascular, sino a una disfunción endotelial. Nuestros resultados también indican que la función vasodilatadora independiente de endotelio mejora con el tratamiento con VPA, ya que la respuesta al NPS fue significativamente mayor en el grupo IAM + VPA comparado con el grupo IAM.

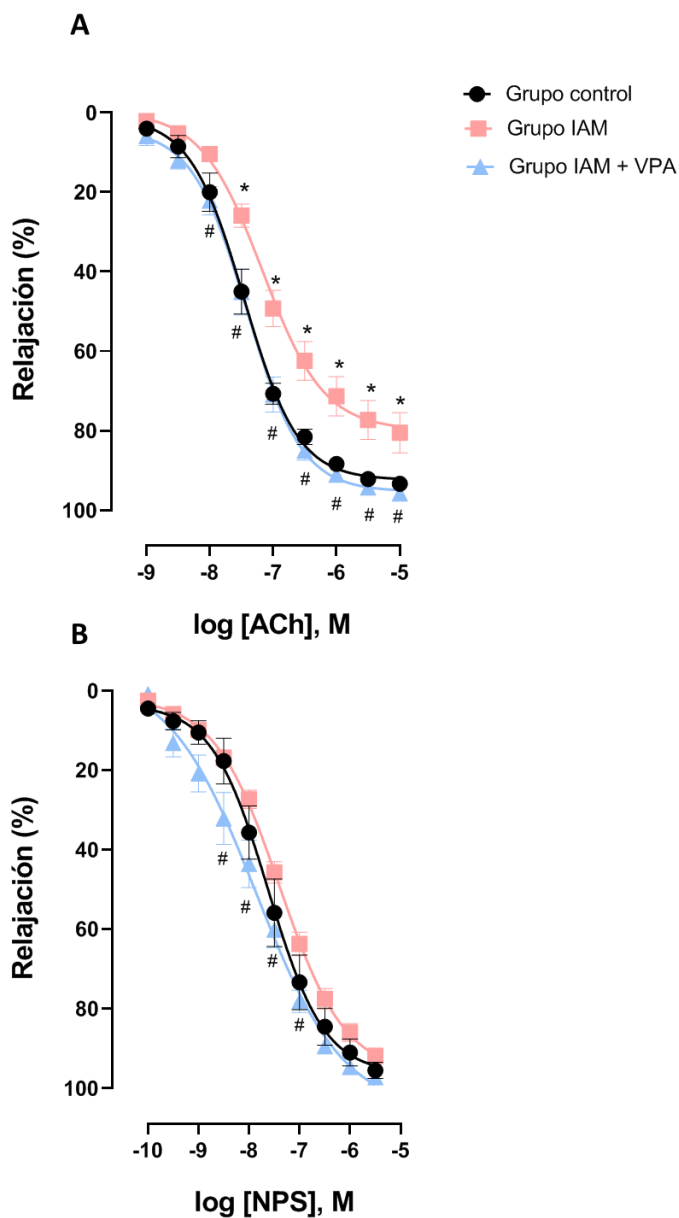


Figura 6. Curvas concentración-respuesta a la (A) acetilcolina (ACh, $10^{-9} - 10^{-5}$ M) y al (B) nitroprusiato sódico (NPS, $10^{-10} - 10^{-5}$ M) en segmentos de aorta de los tres grupos precontraídas con norepinefrina (NE, 10^{-7} M). Cada punto representa la media $\pm$ error estándar. * $p < 0,05$ comparado con el grupo control. # $p < 0,05$ comparado con el grupo IAM. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico.

Tabla 2. Valores de pD2 $\pm$ error estándar (e.e.) y del Emax $\pm$ error estándar (e.e.), en presencia de ACh en segmentos de aorta de conejo de los tres grupos de estudio.

ACh	n	pD2 $\pm$ e.e	Emax $\pm$ e.e
Control	6	7,46 $\pm$ 0,06	93,3 $\pm$ 1,6
IAM	10	7,17 $\pm$ 0,07*	80,5 $\pm$ 4,9*
IAM + VPA	9	7,42 $\pm$ 0,10 [#]	95,8 $\pm$ 1,2 [#]

n = número de conejos. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico. *p<0,05 comparado con el grupo control; [#]p<0,05 comparado con el grupo IAM.

Tabla 3. Valores de pD2 $\pm$ error estándar (e.e.) y del Emax $\pm$ error estándar (e.e.), en presencia de NPS en segmentos de aorta de conejo de los tres grupos de estudio.

NPS	n	pD2 $\pm$ e.e	Emax $\pm$ e.e
Control	6	7,63 $\pm$ 0,18	95,5 $\pm$ 2,0
IAM	10	7,40 $\pm$ 0,13	92,0 $\pm$ 1,9
IAM + VPA	9	7,86 $\pm$ 0,35 [#]	97,2 $\pm$ 0,7

n = número de conejos. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico. [#]p<0,05 comparado con el grupo IAM.

5.2. Participación de factores relajantes en respuesta a la acetilcolina

Para estudiar si la menor respuesta vasodilatadora a la ACh obtenida en el grupo IAM era debida a la menor producción de sustancias vasodilatadoras derivadas del endotelio, como los prostanoïdes o el NO, se incubaron los segmentos de aorta con indometacina (10^{-5} M), L-NAME (10^{-4} M) respectivamente. En presencia de indometacina (10^{-5} M) + L-NAME (10^{-4} M) y con el fin de estudiar el mecanismo de EDH relacionado con los canales de K⁺ en respuesta a la ACh, se inubaron las curvas con KCl 20 (mM). La incubación con indometacina no modificó la respuesta a la ACh en los grupos control e IAM + VPA. Sin embargo, el grupo IAM mostró una mayor relajación, lo que indica liberación de prostanoïdes contráctiles. Este hallazgo podría explicar, en parte, la menor respuesta a la ACh en el grupo IAM (Figura 7).

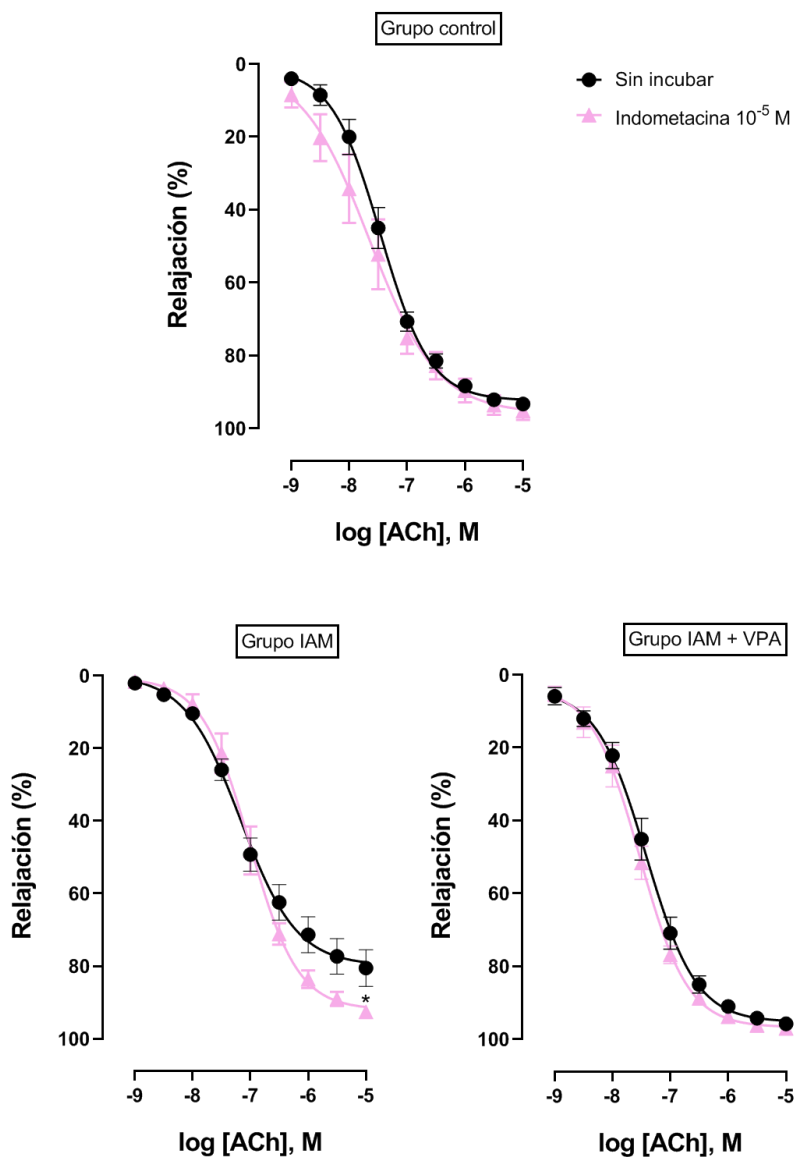


Figura 7. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (ACh, 10^{-9} – 10^{-5} M) en segmentos de aorta de los tres grupos precontraídas con norepinefrina (NE, 10^{-7} M) en ausencia y presencia de indometacina (10^{-5} M). Cada punto representa la media $\pm$ error estándar. * $p < 0,05$ comparado con la curva sin incubar. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico.

En otro set de experimentos, la relajación a la ACh se bloqueó significativamente en presencia de L-NAME (10^{-4} M) (Figura 8).

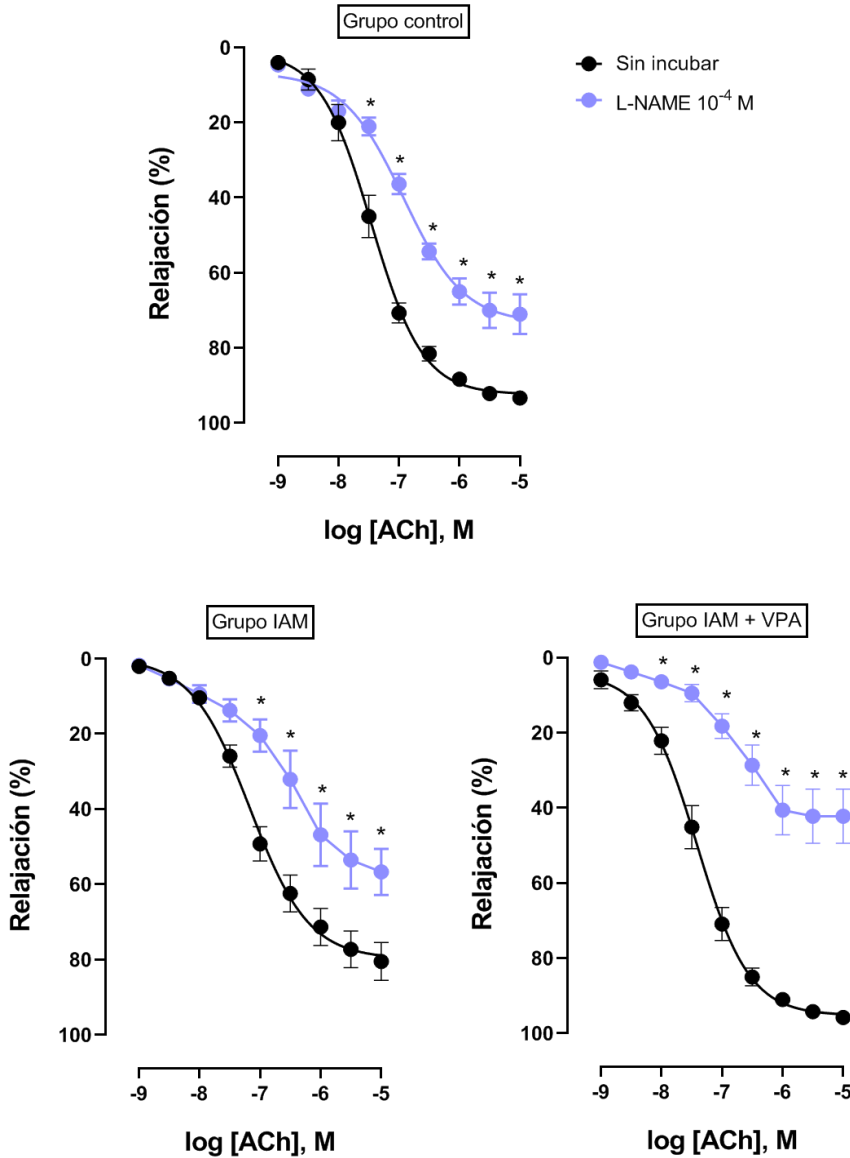


Figura 8. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (ACh, 10^{-9} – 10^{-5} M) en segmentos de aorta de los tres grupos precontraídas con norepinefrina (NE, 10^{-7} M) en ausencia y presencia de L-NAME (10^{-4} M). Cada punto representa la media $\pm$ error estándar. * $p < 0,05$ comparado con la curva sin incubación. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico.

Puesto que el bloqueo con L-NAME fue significativo en los tres grupos de estudio, para poder comparar si la producción de NO en respuesta a la ACh era diferente entre grupos, se calculó el área bajo la curva (AUC) resultante de restar el AUC de la curva concentración-respuesta en presencia y en ausencia de L-NAME para cada uno de los grupos de estudio. Así, la producción de NO fue de $71,1 \pm 2,0$ unidades arbitrarias (UA) para el grupo control, $66,3 \pm 2,9$ UA para el grupo IAM y $150,2 \pm 2,0$ UA para el grupo IAM + VPA. Se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo IAM + VPA frente al control y entre el grupo IAM frente al grupo IAM + VPA (Figura 9, Tabla 4).

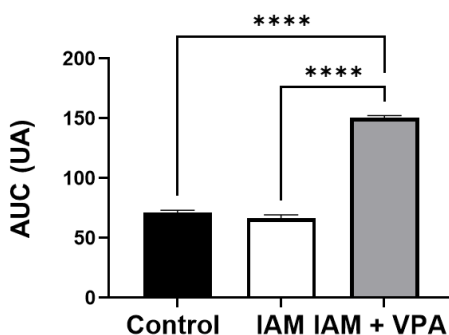


Figura 9. Producción de NO inducido por acetilcolina (ACh) en los 3 grupos de estudio calculado a partir de la diferencia de AUC de la curva concentración-respuesta en presencia y ausencia de L-NAME (10^{-4} M). **** $p < 0,0001$. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico.

Por último, la respuesta relajante a la ACh se abolió en los tres grupos de estudio tras la incubación conjunta de indometacina (10^{-5} M), L-NAME (10^{-4} M) y KCl (20 mM), (Figura 10). Estos resultados indican la apertura de los canales de K^+ que median hiperpolarización y, por ende, relajación en el mecanismo de acción de la ACh.

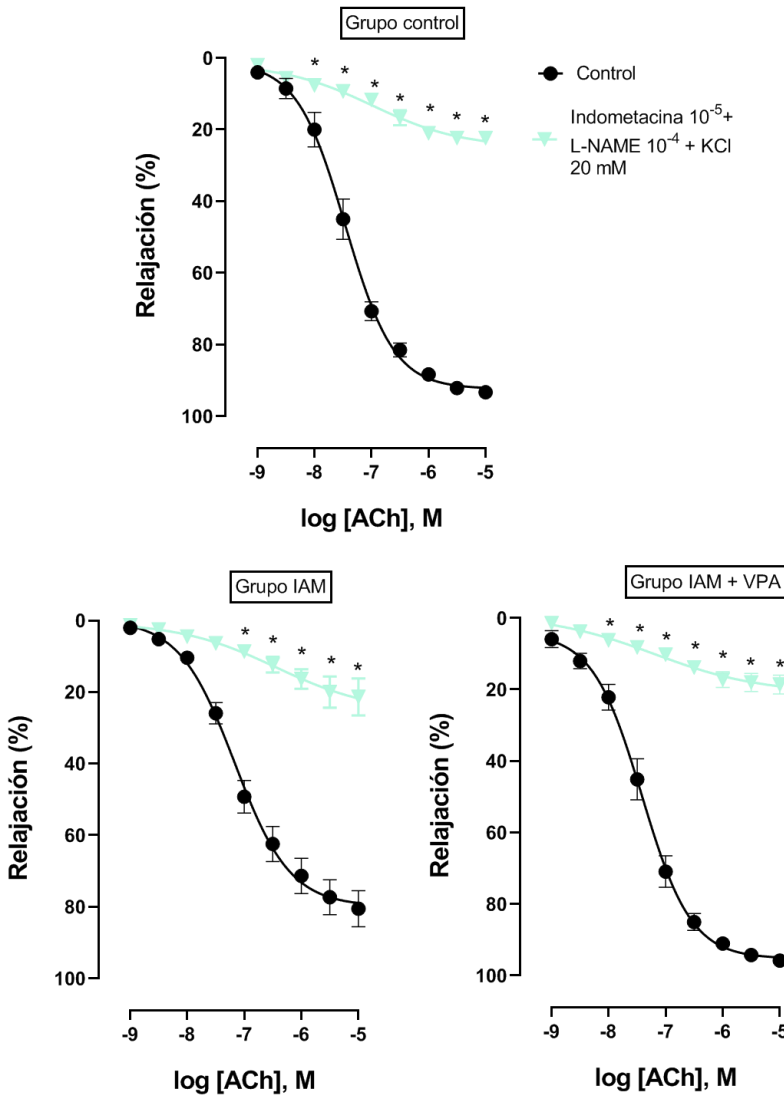


Figura 10. Curvas concentración-respuesta a la acetilcolina (ACh, 10^{-9} – 10^{-5} M) en segmentos de aorta de los tres grupos precontraídos con norepinefrina (NE, 10^{-7} M) en ausencia y presencia de indometacina (10^{-5} M), L-NAME (10^{-4} M) y KCl (20 mM). Cada punto representa la media $\pm$ error estándar. * $p < 0,05$ comparado con la curva sin incubar. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico.

5.3. Estudio de la respuesta vasoconstrictora

Para estudiar los efectos del IAM y del tratamiento con VPA sobre la respuesta adrenérgica, se realizaron curvas concentración-respuesta a la NE, agonista no específico de los receptores α -adrenérgicos. La administración de concentraciones crecientes de NE (10^{-11} - 10^{-6} M) produjo una contracción dependiente de la concentración en los segmentos vasculares procedentes de los tres grupos de estudio significativamente mayor en el grupo IAM comparado con el grupo control (Figura 11, Tabla 4). El tratamiento con VPA revirtió el incremento de la contracción observada para el grupo IAM e igualó la curva concentración-respuesta a los valores obtenidos para el grupo control. No se observaron diferencias a nivel de la pD_2 (Figura 11, tabla 4).

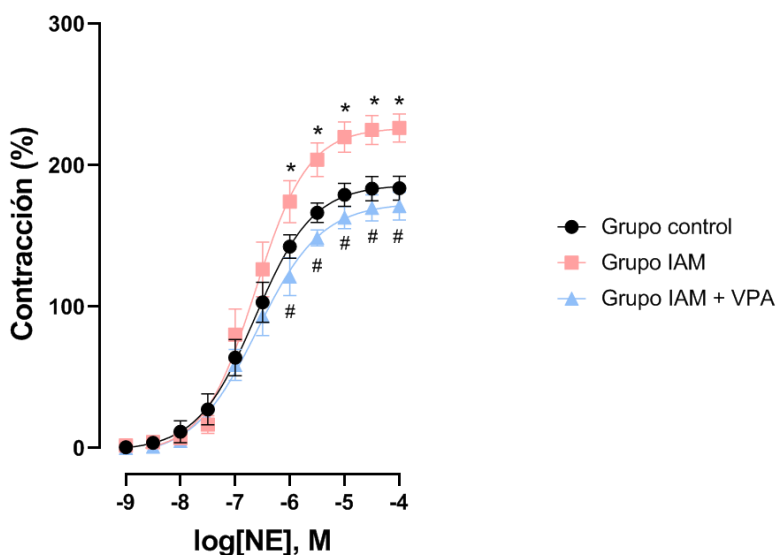


Figura 11. Curvas concentración-respuesta a la norepinefrina (NE, 10^{-9} – 10^{-4} M) en segmentos de aorta de los tres grupos. Cada punto representa la media $\pm$ error estándar. * $p < 0,05$ comparado con el grupo control. # $p < 0,05$ comparado con el grupo IAM. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico.

Tabla 4. Valores de $pD2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en presencia de NE en segmentos de aorta de conejo de los tres grupos de estudio.

NE	n	$pD2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$
Control	8	$6,64 \pm 0,14$	$183,8 \pm 8,5$
IAM	11	$6,63 \pm 0,13$	$226,2 \pm 9,8^*$
IAM + VPA	6	$6,59 \pm 0,23$	$171,0 \pm 9,9^{\#}$

n = número de conejos. * $p < 0,05$ comparado con el grupo control; $^{\#}p < 0,05$ comparado con el grupo IAM. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico

Con el fin de estudiar si la respuesta a la ET-1 (10^{-9} - 10^{-4} M) aumentaba en el IAM y si el tratamiento con VPA era capaz de revertirla, se realizaron curvas concentración-respuesta a este agonista. Se obtuvo una contracción dependiente de la concentración que se vio aumentada en el grupo IAM con respecto al control. Este aumento no se observó en los segmentos vasculares procedentes del grupo IAM + VPA, que contrajo de manera similar al grupo control y significativamente por debajo de los valores obtenidos para el IAM (Figura 12, Tabla 5). Estos resultados indican que el VPA reduce el tono vasoconstrictor mediado por la ET-1 después de un IAM.

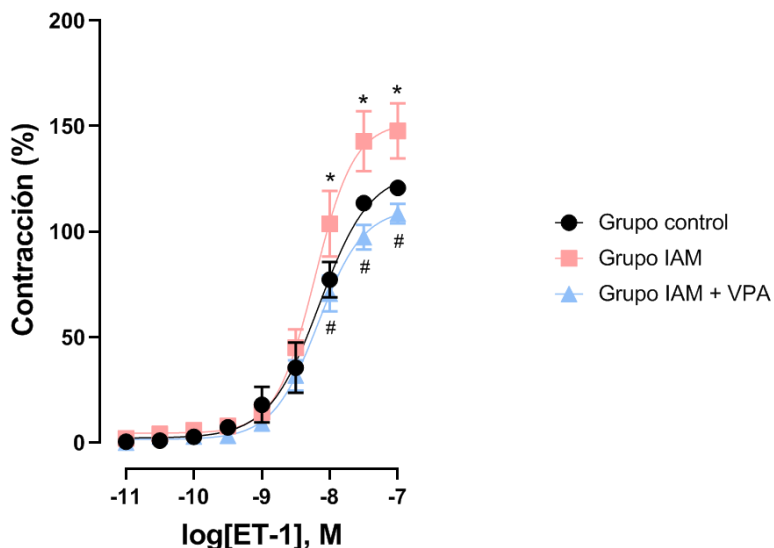


Figura 12. Curvas concentración-respuesta a la ET-1 en segmentos de aorta de los tres grupos. Cada punto representa la media $\pm$ error estándar. * $p < 0,05$ comparado con el grupo control; # $p < 0,05$ comparado con el grupo IAM. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico.

Tabla 5. Valores de $pD2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en presencia de ET-1 en segmentos de aorta de conejo de los tres grupos de estudio.

ET-1	n	$pD2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$
Control	4	$8,15 \pm 0,21$	$120,7 \pm 3,7$
IAM	7	$8,21 \pm 0,08$	$147,7 \pm 13,1^*$
IAM + VPA	5	$8,18 \pm 0,10$	$108,5 \pm 4,6^{\#}$

n = número de conejos; * $p < 0,05$ comparado con el grupo control; # $p < 0,05$ comparado con el grupo IAM. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico

Para estudiar los efectos del IAM y del tratamiento con VPA sobre la actividad vasoconstrictora de la Ang II, se realizaron curvas concentración-respuesta a la Ang II (10^{-11} - 10^{-6} M). Los resultados obtenidos fueron similares en los tres grupos de estudio (Figura 13, Tabla 6).

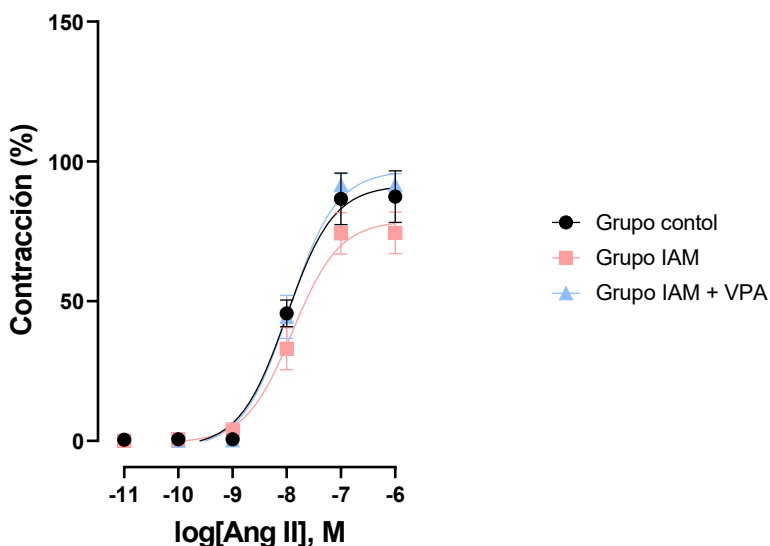


Figura 13. Curvas concentración-respuesta a la angiotensina II (Ang II, 10^{-11} - 10^{-6} M) en segmentos de aorta de los tres grupos. Cada punto representa la media $\pm$ error estándar. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico.

Tabla 6. Valores de $pD2 \pm$ error estándar (e.e.) y del $E_{max} \pm$ error estándar (e.e.), en presencia de Ang II en segmentos de aorta de conejo de los tres grupos de estudio.

Ang II	n	$pD2 \pm e.e$	$E_{max} \pm e.e$
Control	6	$8,00 \pm 0,19$	$87,4 \pm 9,2$
IAM	8	$7,90 \pm 0,19$	$72,4 \pm 7,4$
IAM + VPA	7	$7,96 \pm 0,17$	$91,6 \pm 4,0$

n = número de conejos. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico.

5.4. Estudio de la expresión proteica

5.4.1. Efecto del tratamiento con VPA en un modelo de IAM sobre la expresión proteica de eNOS, peNOS, ARG1 y ARG2

Nuestros resultados indicaban que en los segmentos de aorta procedentes del grupo IAM, la menor respuesta relajante a la ACh no venía determinada por una menor participación de NO, sin embargo, el tratamiento con VPA revertía la disminución de relajación obtenida en el grupo IAM por aumentar la biodisponibilidad de NO, como mostraba el bloqueo con L-NAME. Con el fin de estudiar si este efecto del VPA era mediado por un aumento en la síntesis proteica de eNOS, medimos su expresión por Western Blot en los tres grupos de estudio. Los resultados mostraron que, a pesar de existir una tendencia a aumentar la expresión de eNOS en el grupo IAM + VPA con respecto a los grupos control e IAM (Figura 14A), no alcanzaba a ser significativa. Además, la peNOS se mantenía en niveles de expresión similares en los tres grupos de estudio (Figura 14B), por lo que concluimos que el aumento en la biodisponibilidad de NO observado en el grupo IAM + VPA no venía determinado ni por un aumento en la síntesis proteica de eNOS ni por un aumento de su forma activa fosforilada en Ser1177.

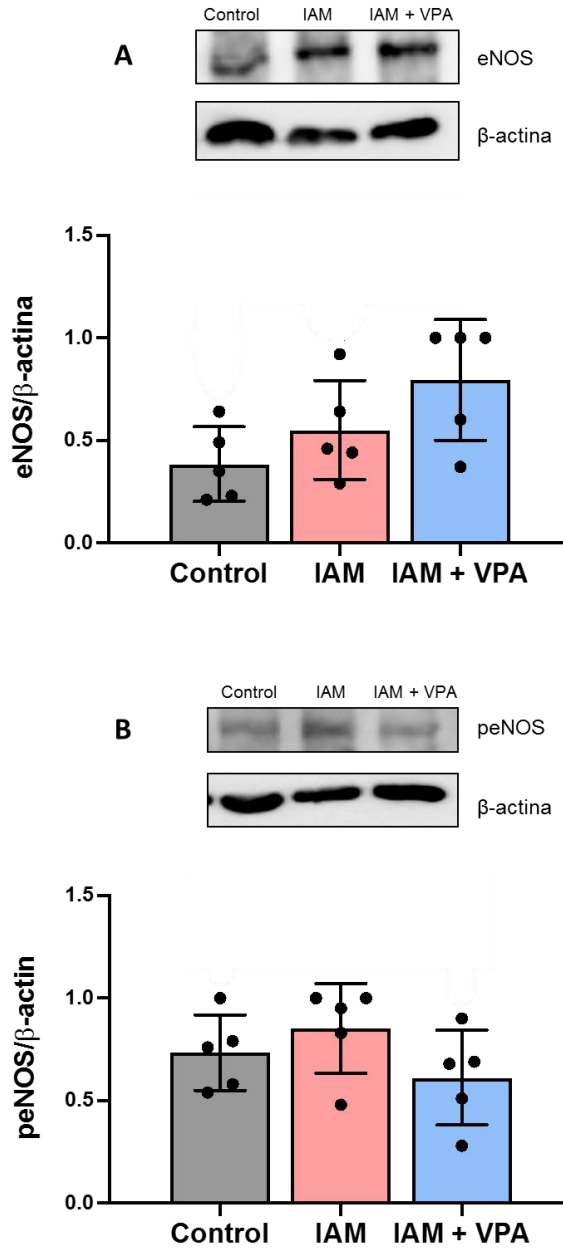


Figura 14. Expresión proteica de eNOS (A) y peNOS (B) en aorta de conejo de los tres grupos de estudio. La β -actina se usó como proteína de control de carga. Las barras representan la media $\pm$ desviación estándar. $n=5$ por grupo. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico.

Por otro lado, la arginasa compite con la eNOS por el mismo sustrato, la L-arginina, por tanto, una disminución de arginasa en el grupo IAM + VPA podría explicar una mayor biodisponibilidad de L-arginina para entrar en la vía de síntesis de NO. Nuestros resultados mostraron que ni el IAM ni el tratamiento con VPA cambian la expresión de ARG1 (Figura 15A). Sin embargo, se observó un aumento en la expresión proteica de la ARG2 en el grupo IAM, que no se revirtió con el VPA (Figura 15B). Estos resultados indican que la mejora a nivel vascular observada con el VPA no parece tener relación directa con la vía de la arginasa.

En conjunto, estos resultados demuestran que el mecanismo por el cual el VPA aumenta la relajación a la ACh, aunque implica la vía del NO, no está relacionada ni con una mayor síntesis o activación por fosforilación en Ser1177 de la eNOS ni con la vía de la arginasa.

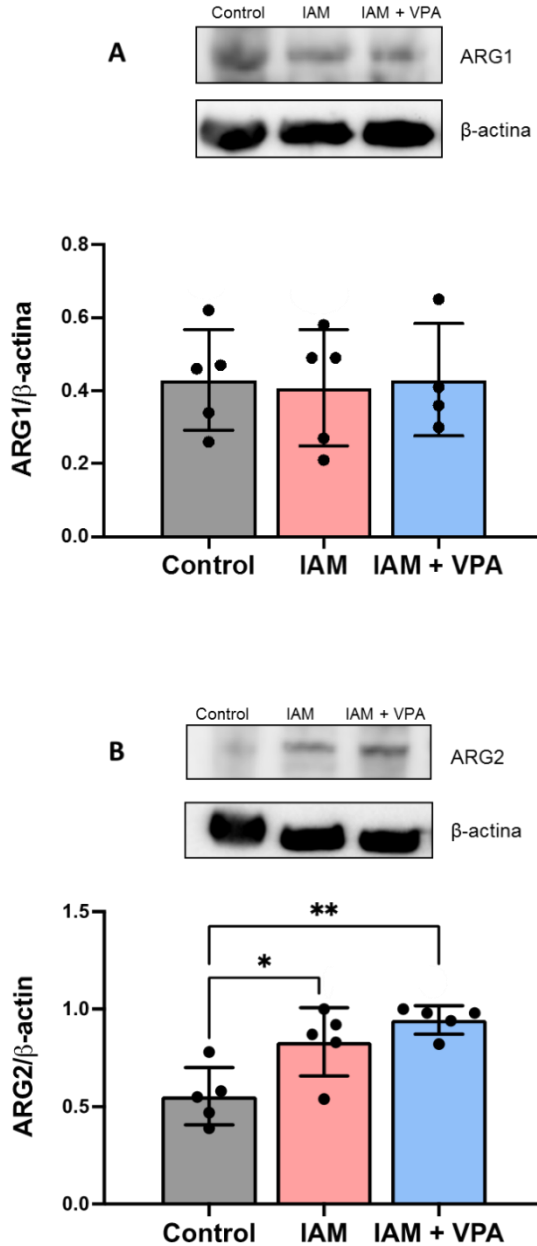


Figura 15. Expresión proteica de ARG1 (A) y ARG2 (B) en aorta de conejo de los tres grupos de estudio. La β -actina se usó como proteína de control de carga. Las barras representan la media $\pm$ desviación estándar. $n=4-5$ por grupo. * $p<0,05$ y ** $p<0,01$ comparado con el grupo control. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico.

5.4.2. Efecto del tratamiento con VPA en un modelo de IAM sobre la expresión proteica de SOD1 y SOD2

El estrés oxidativo se relaciona con disfunción endotelial debido a una disminución de la biodisponibilidad de NO. Con la finalidad de dilucidar si esta podría ser la causa de la disfunción endotelial observada en el grupo IAM y la mejora vascular producida por el VPA, se cuantificó la expresión proteica de las principales enzimas relacionadas con el estrés oxidativo a nivel vascular, SOD 1 y SOD 2. Nuestros resultados indicaron una disminución en la expresión proteica de la SOD1 en el grupo IAM con respecto al control, que se revertía en el grupo IAM + VPA (Figura 16A). No se observaron diferencias en la expresión proteica de SOD2 (Figura 16B). Por lo tanto, el IAM induce una disminución de la defensa antioxidante SOD1, que el tratamiento con VPA es capaz de revertir, aumentando así la biodisponibilidad de NO.

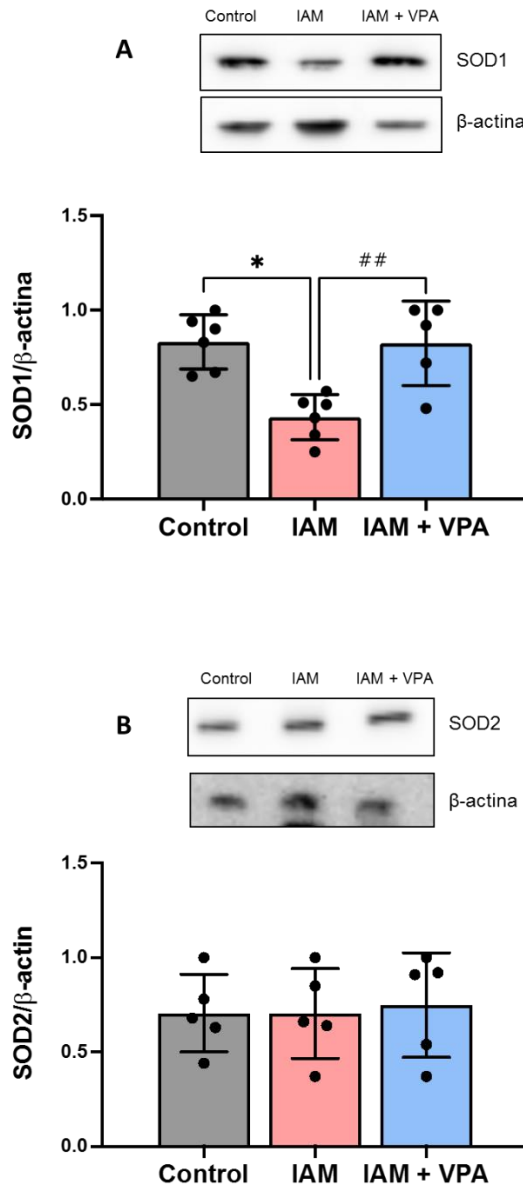


Figura 16. Expresión proteica de SOD1 (A) y SOD2 (B) en aorta de conejo de los tres grupos de estudio. La β-actina se usó como proteína de control de carga. Las barras representan la media $\pm$ desviación estándar. $n=5-6$ por grupo. * $p<0,05$ comparado con el grupo control. ## $p<0,01$ comparado con el grupo IAM. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico.

5.4.3. Efecto del tratamiento con VPA en un modelo de IAM sobre la expresión proteica de receptores adrenérgicos α_1 y α_2

Nuestros resultados de reactividad vascular indicaron que los segmentos de aorta procedentes del grupo IAM contrajeron más a la NE y que el tratamiento con VPA revertía este aumento. El análisis de la expresión proteica reveló un incremento de los receptores α_1 sin cambios en α_2 en el grupo IAM (Figura 17). El tratamiento con VPA no revirtió el incremento en la expresión del receptor adrenérgico α_1 , que se mantuvo elevada (Figura 17A). Sin embargo, el tratamiento con VPA aumentó la expresión del receptor α_2 (Figura 17B). Estos hallazgos podrían explicar la mayor respuesta adrenérgica de los segmentos de aorta del grupo IAM, vía α_1 , y también la capacidad para revertirla del VPA, vía α_2 .

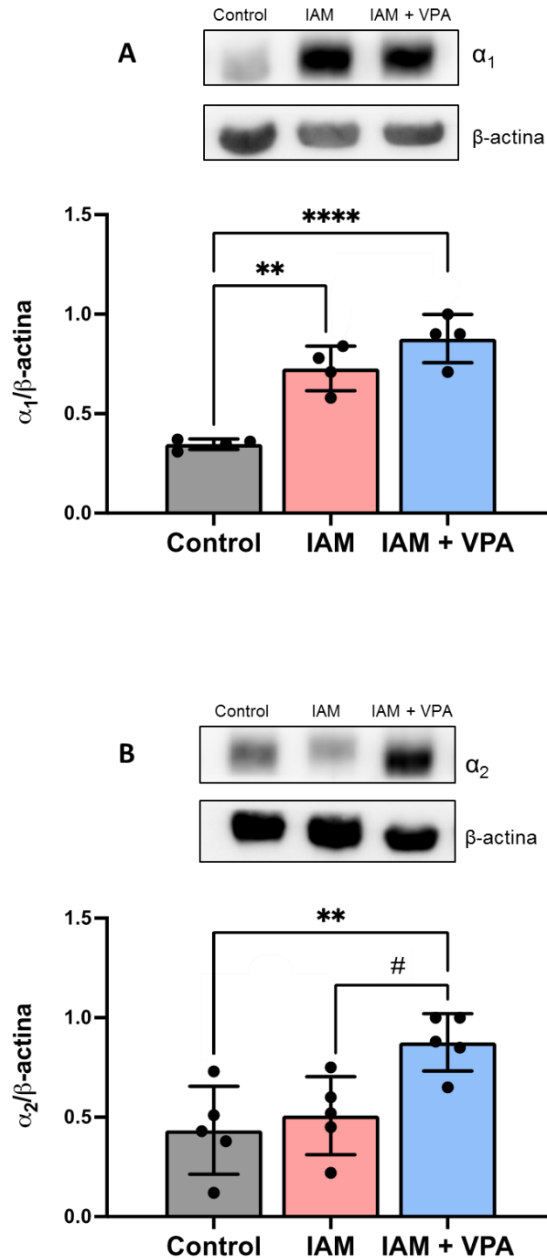


Figura 17. Expresión proteica de los receptores adrenérgicos α_1 (A) y α_2 (B) en aorta de conejo de los tres grupos de estudio. La β -actina se usó como proteína de control de carga. Las barras representan la media $\pm$ desviación estándar. $n=4-5$ por grupo. $**p<0,01$ y $****p<0,0001$ comparado con el grupo control. $\#p<0,05$ comparado con el grupo IAM. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico.

5.4.4. Efecto del tratamiento con VPA en un modelo de IAM sobre la expresión proteica de receptores de la ET-1 (ETA Y ETB)

Al estudiar la reactividad vascular observamos un aumento de contracción a la ET-1 en aorta procedente del grupo IAM, que se revertía con el tratamiento con VPA. El análisis de la expresión proteica de los receptores de ET-1 indicó un aumento del receptor ETA en el IAM, que revirtió con el tratamiento con VPA (Figura 18A), pudiendo ser la explicación a lo observado en los resultados de reactividad vascular. En el caso del receptor ETB se observó una disminución en el grupo IAM que también revirtió con el tratamiento con VPA (Figura 18B). Este mecanismo también podría explicar parte de la mejora vascular atribuida al VPA, ya que el receptor ETB se ha relacionado con producción de NO.

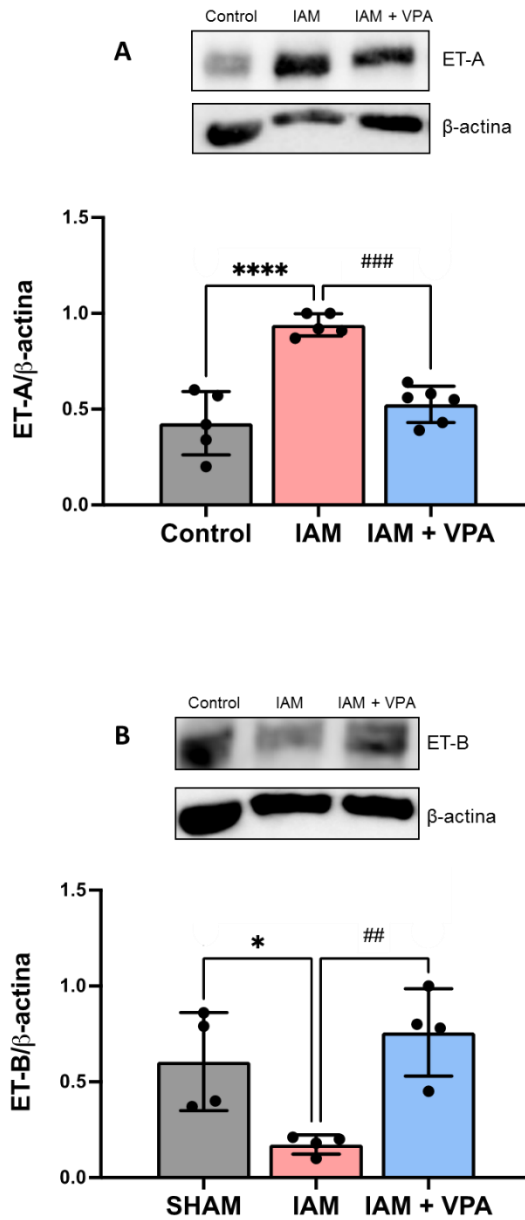


Figura 18. Expresión proteica de los receptores de la ET-1, ETA (A) y ETB (B) en aorta de conejo de los tres grupos de estudio. La β -actina se usó como proteína de control de carga. Las barras representan la media $\pm$ desviación estándar. $n=4-6$ por grupo. * $p<0,05$ y **** $p<0,0001$ comparado con el grupo control. ## $p<0,01$ y ### $p<0,001$ comparado con el grupo IAM. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico.

5.4.5. Efecto del tratamiento con VPA en un modelo de IAM sobre la expresión proteica de los receptores de la Ang II (ATR1 y ATR2)

Finalmente, se determinó la expresión proteica de los receptores de tipo 1 y 2 de la Ang II (ATR1 y ATR2). No hubo diferencias significativas en la expresión de ATR1 en ninguno de los tres grupos de estudio (Figura 19A), lo que concuerda con los resultados obtenidos en reactividad vascular para la Ang II. No obstante, la expresión de ATR2 se vio aumentada en el grupo IAM + VPA con respecto a los grupos control e IAM (Figura 19B). La activación del receptor ATR2 se ha relacionado con la liberación de NO, lo que podría jugar también a favor de la mejora vascular inducida por el VPA.

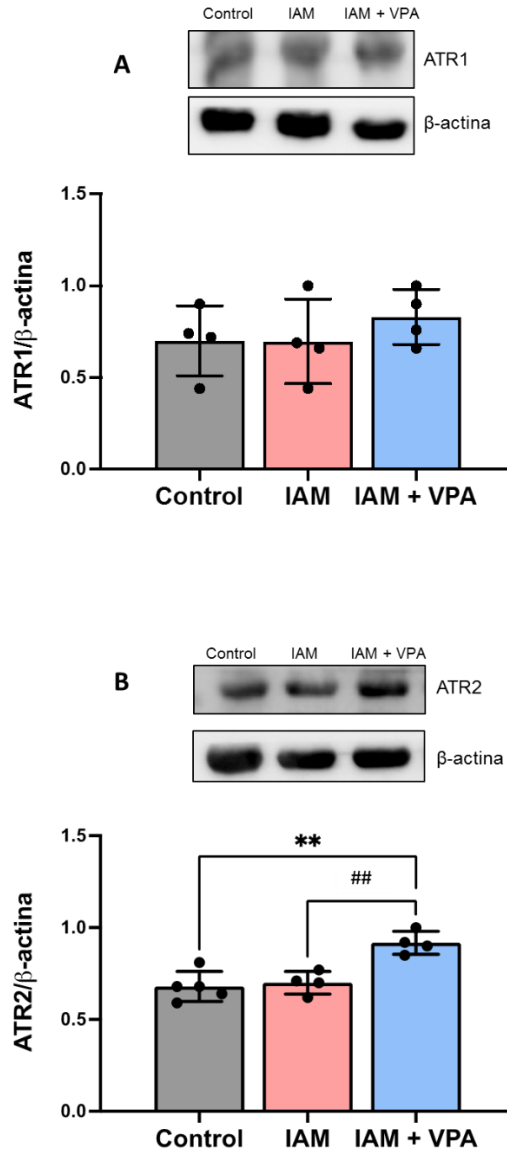


Figura 19. Expresión proteica de los receptores de la Ang II, ATR1 (A) y ATR2 (B) en aorta de conejo de los tres grupos de estudio, n=4-5 por grupo comparado con el control β-actina. Las barras representan la media ± desviación estándar. **p<0,01 comparado con el grupo control. ##p<0,01 comparado con el grupo IAM. IAM: infarto agudo de miocardio; VPA: ácido valproico.

5.5. Niveles plasmáticos de nitratos y nitritos

Dada la implicación del NO en la mejora vascular inducida por el VPA, decidimos medir los niveles plasmáticos de NO_x, así como los de su precursor, la L-arginina, en los tres grupos de estudio. Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas (Figura 20), lo que indica que los efectos del VPA se dan a nivel local, es decir modulando la biodisponibilidad de NO en la pared vascular y no a nivel sistémico.

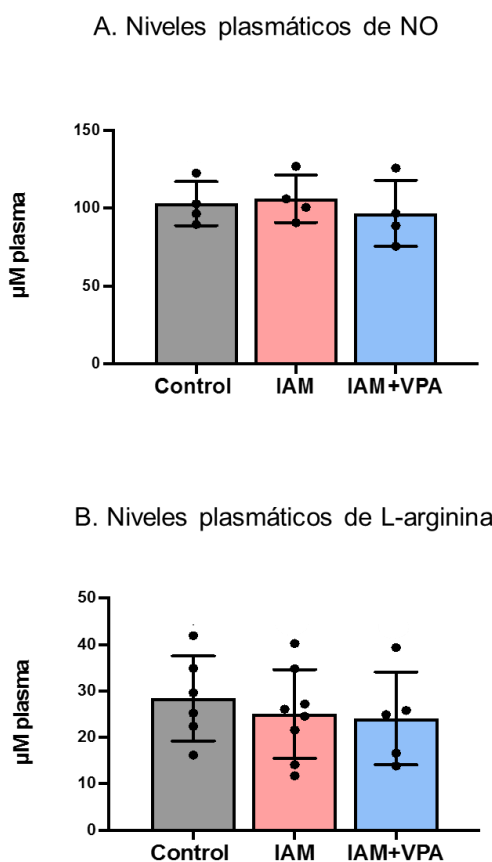


Figura 20. Concentración plasmática de NO_x (A) y L-arginina (B) en los tres grupos de estudio. n = 3 en cada grupo.

DISCUSIÓN

6.1. Ventajas y limitaciones del procedimiento experimental

El modelo experimental de IAM por oclusión de la arteria coronaria circunfleja izquierda en conejo White New Zealand, desarrollado por el grupo de investigación GRELCA de la UV, es comparable en términos cardiovasculares a un IAM en la especie humana (Genovés et al., 2020; B. Jung et al., 2012). La presente tesis se centra en las alteraciones vasculares que el IAM puede inducir en la aorta abdominal y la capacidad del VPA para revertirlas, principalmente a través del estudio de la reactividad vascular mediante la técnica de baño de órganos y de la expresión proteica mediante Western Blot.

Cuando se realiza el aislamiento de un órgano, en nuestro caso de un vaso sanguíneo, y se sumerge en un baño para el registro de la tensión isométrica, se eliminan las influencias nerviosas, hormonales y derivadas de la grasa perivascular. Este procedimiento permite estudiar los mecanismos intrínsecos que se dan en la pared vascular y que son propios de la contractilidad de las células musculares lisas y de la capacidad moduladora del endotelio. El sistema otorga la ventaja de dilucidar *ex vivo* los mecanismos de acción exclusivamente a nivel vascular, sin las “interferencias” que supone el estudio en un modelo animal *in vivo*. Sin embargo, al extrapolar los resultados al organismo en general se pueden encontrar con más mecanismos reguladores que podrían, incluso, enmascarar los efectos a nivel vascular observados en el baño de órganos y no obtener el efecto esperado en el organismo.

La otra técnica utilizada en la presente tesis es el estudio de la expresión proteica por Western Blot. En este caso, se han realizado los experimentos utilizando el vaso sanguíneo completo; por tanto, los resultados no discriminan entre tejido endotelial y muscular. El análisis de la expresión proteica ayuda a explicar los resultados obtenidos en el estudio de la reactividad vascular. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que estas proteínas podrían sufrir modificaciones postraduccionales que afecten a su actividad.

6.2. Selección de conejo como modelo experimental de IAM y tratamiento con VPA

Los animales pequeños, como el conejo, se han utilizado ampliamente en la investigación del sistema cardiovascular, debido a similitudes fisiológicas con los humanos y su manejo en estudios experimentales. El corazón de conejo carece de flujo sanguíneo colateral después de un IAM (TAN et al., 2017). Además, tanto el conejo como el ser humano tienen la presencia de una tercera arteria coronaria en común (Burton et al., 2012).

La remodelación ventricular, que comprende tanto la regulación a nivel estructural como funcional, es el proceso de curación y sustitución de cardiomiocitos por tejido fibroso, y dura varias semanas en animales pequeños y meses en animales grandes y humanos (Richardson et al., 2015). Como consecuencia del daño miocárdico, estos fibroblastos se activan y se diferencian en miofibroblastos durante las dos semanas posteriores al daño miocárdico, contribuyendo a la formación adicional de proteínas de la matriz extracelular, lo que aumenta la rigidez del tejido y contribuye al deterioro de la función ventricular (McDowell et al., 2011) que finalmente puede provocar insuficiencia cardíaca (Frantz et al., 2022). La progresión de la disfunción ventricular a insuficiencia cardíaca después de un IAM se ha asociado con la disfunción endotelial, entre otros factores (Zuchi et al., 2020). De hecho, se ha observado una disminución en la respuesta a la ACh en pacientes con insuficiencia cardíaca grave (Zuchi et al., 2020). En modelos de IAM en roedores se ha demostrado que la función endotelial deteriorada en arterias grandes como la aorta ocurre varias semanas después y puede depender de factores adicionales como el tamaño del infarto o el sexo (Csanyi et al., 2006; Teerlink et al., 1993).

Las acciones terapéuticas dirigidas a regular el proceso de fibrosis postinfarto y la acumulación de sustancias que forman parte de la matriz extracelular pueden contribuir a mejorar el proceso de remodelación y disfunción ventricular. El objetivo del protocolo experimental no es inhibir el proceso de curación, sino reducir el

exceso de fibrosis y remodelado ventricular que se produce durante este proceso y que contribuye a la formación del sustrato arritmogénico responsable de la mayoría de los episodios de muerte súbita cardíaca en estos pacientes (Frantz et al., 2022; Humeres & Frangogiannis, 2019). En este sentido, el VPA se administró durante la fase preoperatoria, antes de la inducción del infarto de miocardio, ya que se ha visto que las HDAC controlan la proliferación celular, la inflamación y la fibrosis (Lee et al., 2007b; Stratton & McKinsey, 2016).

6.3. Efecto del VPA en un modelo de IAM. Estudio de la vasodilatación

Después de un IAM, el endotelio muestra cambios morfológicos y funcionales, experimentando un aumento del Ca^{2+} citosólico que activa sustancias endoteliales vasoconstrictoras, lo que promueve la formación de espacios intercelulares que aumentan la permeabilidad a las macromoléculas. Las células endoteliales y las plaquetas activadas dan como resultado la expresión de moléculas de adhesión y la agregación de plaquetas y leucocitos a la microvasculatura coronaria (Hausenloy et al., 2019). Los pacientes con IAM sometidos a terapia de reperfusión presentan disfunción endotelial coronaria (Hernández-Reséndiz et al., 2018). La alteración del endotelio y la posterior extravasación de células después de la reperfusión probablemente se ven facilitadas por la desestabilización de las uniones celulares (Hausenloy et al., 2019). En consecuencia, las células endoteliales isquémicas se vuelven más permeables y debilitan su potencial antitrombótico y antiinflamatorio natural. La lesión por isquemia-reperfusión se asocia con la activación de los componentes humorales y celulares del sistema inmune innato y hemostático. También con la producción excesiva de ROS, la inhibición de la eNOS y con procesos inflamatorios (Hernández-Reséndiz et al., 2018).

Para evaluar la función relajante endotelial, una herramienta farmacológica ampliamente utilizada es la ACh, que se une a receptores muscarínicos acoplados a proteínas G para mediar una elevación transitoria del Ca^{2+} libre intracelular. Este aumento de Ca^{2+} provoca la síntesis de NO en condiciones fisiológicas (Edwards

et al., 2020). En condiciones fisiopatológicas como el IAM, se ha descrito una menor biodisponibilidad de NO que provoca una disfunción endotelial (Bravo Baptista et al., 2017; Horikoshi et al., 2019, 2021). En efecto, nuestros resultados apuntan a la existencia de disfunción endotelial en aorta procedente de conejos con IAM. Esto concuerda con los estudios de otros autores en diferentes modelos animales. En el caso de un modelo porcino de IAM, los autores encontraron una disfunción endotelial en las arterias coronarias (Kim et al., 2019). En pacientes menores de 40 años con IAM con elevación del segmento ST se determinó una disfunción endotelial grave, a través de la medición de la vasodilatación de la arteria braquial mediante ultrasonido de alta resolución (S.-M. Chen et al., 2011). En otro estudio en pacientes con IAM se mostró una menor actividad de la eNOS y, por tanto, un deterioro en la función endotelial mediante la regulación negativa del NO y la regulación positiva de la ET-1 (Z. Yang et al., 2013). En segmentos de arteria septal de ratas macho se mostró una respuesta significativamente menor a la ACh en el grupo con isquemia-reperfusión en comparación con el grupo control (Szabó et al., 2021). Por tanto, basándonos en nuestros resultados y en los resultados de otros autores en otros modelos animales, es evidente que el IAM causa una disfunción endotelial, sin embargo, lo novedoso de nuestros resultados es que esa disfunción endotelial viene determinada por una liberación de prostanoïdes contráctiles en respuesta a la ACh y no por una disminución de NO como apuntan otros autores.

Para corroborar que la menor capacidad relajante a la ACh encontrada en nuestro modelo de IAM era debida a una disfunción endotelial y no a una disminución de la capacidad del músculo liso para relajar, realizamos curvas de NPS, un vasodilatador independiente del endotelio (Fereja et al., 2020). En el presente estudio comprobamos que el IAM no modifica la respuesta al NPS, indicando que no existe una disminución de la capacidad del músculo liso para producir vasodilatación. En el mismo sentido, Kristiansen et al. (2017) demostraron que en arteria coronaria de ratas Sprague-Dawley la sensibilidad al NO no cambia después de la isquemia-reperfusión. Otros autores también demostraron que en segmentos de aorta de rata no se modificaba la respuesta relajante al NPS en el grupo IAM con

respecto al control (Lee et al., 2009). En base a lo expuesto, podemos deducir que el IAM no afecta a la capacidad relajante del músculo liso.

La disfunción endotelial está relacionada con baja biodisponibilidad de NO, estrés oxidativo vascular e inflamación (Donato et al., 2015). Los inhibidores de las HDAC, como el VPA, mitigan la disfunción endotelial (J. Chen et al., 2019; Mahapatra et al., 2010; Rexhaj et al., 2011; Sharma & Sharma, 2013). Diversos estudios han corroborado el papel beneficioso del VPA, en aorta de ratas espontáneamente hipertensas (SHR), donde aumentó la capacidad relajante y la producción de NO (Cardinale et al., 2010) o en un modelo porcino de isquemia-reperfusión con shock hemorrágico, donde mostró un efecto positivo en la preservación de la función endotelial de grandes vasos (Causey et al., 2012). Otros autores (Larsson et al. 2016) también encontraron una disminución de la acumulación de fibrina, así como trombos más pequeños en respuesta a la lesión vascular, en aorta de ratones tratados con VPA. H. Jung et al. (2019) hallaron que la disminución de la relajación a la ACh se revertía mediante la administración de VPA en ratas con constricción aórtica transversal. No obstante, Michaelis et al. (2004) concluyeron que el VPA disminuía la expresión de la eNOS en células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC). Por otro lado, Cho et al. (2014) estudiaron la producción de NO en células endoteliales bovinas de aorta y en ratón, encontrando que el tratamiento con VPA aumentó la producción de NO y la relajación aórtica in vitro e in vivo.

En base a todo lo anteriormente expuesto, el VPA podría ejercer un efecto beneficioso a nivel vascular revirtiendo la disfunción endotelial inducida por el IAM, y en efecto así lo demuestran nuestros resultados, pues en presencia del inhibidor de la síntesis de NO, la ACh relajó menos en los tres grupos, siendo esta inhibición aún más pronunciada en el grupo IAM+VPA. Para poder comparar la liberación de NO entre grupos se calculó la diferencia de AUC entre la curva control y la incubada con L-NAME, que indicó claramente que el IAM no inducía disfunción endotelial por

disminuir la liberación de NO; sin embargo, la mejora endotelial observada con el VPA sí fue por el aumento de la liberación de NO inducida por ACh.

Por otro lado, la regulación de la síntesis de NO por las células endoteliales a través de la eNOS es fundamental para la salud cardiovascular. Esta regulación involucra la fosforilación de la eNOS en diferentes sitios en respuesta a una amplia variedad de estímulos mecánicos, humorales y farmacológicos. En concreto, la fosforilación de la eNOS en el residuo Serina 1177 (Ser1177) es un requisito esencial para su activación (Mount et al., 2007). En el presente trabajo, en base a nuestros resultados concluimos que el aumento en la biodisponibilidad de NO por parte del VPA no venía determinado ni por un aumento en la síntesis proteica de eNOS ni por un aumento de su forma activa fosforilada en Ser1177. En este sentido, un estudio previo en arterias coronarias de rata con IAM, mostró una disminución de la actividad de eNOS y un aumento de la expresión de peNOS en comparación con el grupo falso operado (X. Liu & Tao, 2013). Estas diferencias pueden ser atribuibles al lecho vascular.

Dado que la arginasa compite con la eNOS por el mismo sustrato, la L-arginina, hipotetizamos que, si el VPA disminuía la expresión de arginasa, podría haber una mayor biodisponibilidad de L-arginina para entrar en la vía de síntesis de NO, explicando la mayor liberación de éste en respuesta a la ACh.

La arginasa es un factor clave en la disfunción endotelial al reducir la biodisponibilidad del NO y aumentar el estrés oxidativo. La actividad arginasa regulada al alza es un factor fisiopatológico en varias ECV, entre ellas el IAM (Mahdi et al., 2020). Además, el aumento de la expresión y actividad de la arginasa miocárdica está implicado en el desarrollo de la lesión por isquemia-reperfusión, lo que respalda un importante papel funcional de la arginasa en esta afección (Gonon et al., 2012; Tratsiakovich et al., 2013). Los niveles de ARG1 se relacionan con la gravedad de la insuficiencia cardíaca (Quitter et al., 2013) y en pacientes con hipertensión arterial pulmonar se ha observado un incremento de ARG2 (Xu et al.,

2004). Por tanto, era esperable observar cambios en la expresión de las arginasas con el modelo de IAM. Nuestros resultados mostraron que la expresión proteica de ARG1 no se modificó, mientras que la ARG2 aumentó en el IAM y el tratamiento con VPA no consiguió revertir este efecto. Además de nuestro estudio, no se han llevado a cabo otros estudios que analicen la expresión proteica de ARG1 y ARG2 en IAM con tratamiento con VPA. Por otro lado, la mejora de la función endotelial por aumento de liberación de NO observada con el VPA no parece tener relación con la vía de la arginasa. En este sentido, son muy pocos los estudios que se centren en el efecto que tiene el VPA sobre la actividad de la arginasa. El grupo de Bayrak et al. (2021) observó un aumento en los niveles de arginasa tras la administración de VPA, aunque estos autores no se centraron a nivel vascular, ya que estudiaron tejido pulmonar de ratas macho Sprague-Dawley con lesión pulmonar.

En conjunto, estos resultados descartan que el mecanismo por el cual el VPA produce una mejora en la vasodilatación es una activación en Ser1177 de la eNOS, o una menor expresión proteica de las arginasas.

Otro factor relajante que juega un rol crítico en la salud cardiovascular es la PGI₂ (Won et al., 2014). Los prostanoideos son importantes moduladores del tono vascular tanto en circunstancias fisiológicas como fisiopatológicas. Tanto los prostanoideos contráctiles como los relajantes son sintetizados por la COX; sin embargo, la contracción provocada por prostanoideos contráctiles se puede prevenir mediante inhibidores no selectivos de las COX (Vanhoutte et al., 2017), como por ejemplo la indometacina (Wong et al., 2009). En este estudio, para evaluar la participación de sustancias prostanoideos en respuesta a la ACh, incubamos los segmentos de aorta con indometacina, que sólo incrementó el Emax en el grupo IAM, indicando que la disfunción endotelial inducida por el IAM puede ser debida, en parte, a la mayor liberación de prostanoideos contráctiles. Por el contrario, otro estudio como el de Berges et al. (2005) en arterias coronarias de ratas Wistar, con disfunción endotelial posterior a un IAM, no encontró alteración en la liberación de prostanoideos en respuesta a la bradicinina. Otros autores concluyeron que el IAM no

modificaba la producción de PGI_2 en respuesta a la ACh en aorta de rata (Csanyi et al., 2006). Estas discrepancias pueden ser debidas al agonista vasodilatador, el lecho vascular o a la especie animal.

El VPA tiene efectos antiplaquetarios, además de regular negativamente la conversión del AA en prostaglandinas por COX-1 y COX-2 (Bambakidis et al., 2017). Sin embargo, en cuanto al tratamiento con VPA, nuestros resultados demuestran que el efecto por el cual el VPA revierte la disfunción endotelial inducida por IAM no está mediado por prostanoides. Otros estudios han relacionado el efecto del VPA sobre la liberación de prostanoides. En pacientes tratados con VPA los niveles plasmáticos de PGE_2 en células endoteliales microvasculares cerebrales humanas fueron más bajos en comparación con el grupo sin el fármaco (Rawat et al., 2020). En un estudio con células endoteliales de la microvasculatura del cerebro de ratón, el VPA suprime la expresión proteica de COX-2 inducida por lipopolisacáridos a través de MKP-1, demostrando así la capacidad antiinflamatoria del VPA (Chuang et al., 2014). No obstante, no hay estudios que hayan esclarecido sus efectos en el IAM, por lo que la presente tesis sería pionera en describirlos.

El endotelio también modula mecanismos que no necesariamente requieren un factor químico, como la hiperpolarización derivada del endotelio, y que contribuyen a la vasodilatación. Este mecanismo se torna más patente una vez bloqueadas las vías dependientes de prostanoides y de NO y está relacionado con la salida de K^+ de la célula muscular. Con KCl 20 mM se consigue bloquear esta hiperpolarización y así estudiar la participación de EDH en respuesta a la ACh. En nuestro estudio este mecanismo no se altera ni con el IAM ni con el tratamiento de VPA. Por tanto, en base a nuestros resultados, se demuestra que el VPA revierte la disfunción endotelial causada por el IAM al aumentar la biodisponibilidad de NO, sin afectar a la liberación de otros factores endoteliales como los prostanoides o la EDH. Otros estudios como el de Csanyi et al. (2006) han puesto de manifiesto que en aorta de ratas Sprague-Dawley, la EDH ejercía un efecto compensatorio a la reducción de la

biodisponibilidad de NO por el IAM. Aunque nuestros resultados indican la existencia de una disfunción endotelial en el IAM, no viene atribuida a la menor producción de NO, ya que la incubación con L-NAME no tiene un mayor efecto bloqueante en el grupo IAM que en el control. Además, en el grupo IAM hay una tendencia significativa a relajar más cuando se incubaba con indometacina, con lo que podría estar aumentada la participación de prostanoïdes contráctiles y ser, al menos parcialmente, la causa de la disfunción endotelial.

Se sabe que el aumento del estrés oxidativo y la disminución de la defensa antioxidante desempeñan papeles importantes en la patogénesis de las ECV como el IAM (Aladağ et al., 2021). La SOD, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa son las principales enzimas antioxidantes. La SOD cataliza la dismutación de O_2^- a H_2O_2 , que luego se transforma en H_2O y O_2 por la enzima catalasa (R. Liu et al., 2023). Dado que al VPA se le ha atribuido capacidad antioxidante (Beltrán-Sarmiento et al., 2018; Suda et al., 2013) y que la biodisponibilidad de NO se ve incrementada en un entorno antioxidante, nuestro siguiente paso fue determinar la expresión proteica de las principales enzimas antioxidantes a nivel vascular, la SOD 1 y SOD 2. Según nuestros resultados, la expresión proteica de la SOD1 disminuye en el grupo IAM, indicando que existe una menor defensa antioxidante en este grupo. Estos resultados eran esperables, puesto que otros autores han establecido la relación entre el IAM y estrés oxidativo (Lubrano et al., 2019; Yin et al., 2019). El tratamiento con VPA revierte este efecto, igualando los niveles de expresión de SOD1 a los del control. En cuanto a la SOD2 no encontramos cambios significativos entre grupos. Contrariamente a estos resultados, otros autores describen un aumento en la expresión de SOD2 en el IAM comparado con el grupo falso operado, sin encontrar cambios en la expresión de SOD1 en aorta torácica de rata (Dardi et al., 2021). Estas diferencias pueden ser debidas a cambios en la especie e incluso dentro de la aorta, el segmento a estudiar, puesto que la función vasodilatadora de la aorta torácica y abdominal se rige por mecanismos distintos. La SOD1 parece ser la isoforma más abundante a nivel vascular (Mendez et al., 2005). Estudios previos de

nuestro grupo han demostrado que en enfermedades como el síndrome metabólico, la SOD1 es la isoforma que disminuye, mientras que la SOD2 no se ve afectada (Guerra-Ojeda et al., 2021). Por tanto, el cambio de esta isoforma tendría un papel más relevante en nuestro modelo experimental.

En base a nuestros resultados, la mejora en la capacidad vasodilatadora atribuida al VPA podría ser debida, al menos en parte, a su capacidad antioxidante, que aumentaría la biodisponibilidad de NO, lo que explicaría tanto la mayor respuesta a la ACh como al NPS. Este mecanismo le confiere al VPA un potencial atractivo terapéutico para reducir el daño vascular inducido por el IAM.

6.4. Efecto del VPA en un modelo de IAM. Estudio de la vasoconstricción

La síntesis, liberación y recaptación de NE se altera después de un IAM, lo que da como resultado un aumento de NE extracelular (Ostrowski et al., 2013; Parrish et al., 2008) con incremento de la presión arterial por estimulación de los receptores adrenérgicos α_1 (Russell et al., 2021; Zuo et al., 2022). En nuestro trabajo, la respuesta contráctil a la NE aumentó en el grupo IAM y, en consonancia, la expresión de los receptores adrenérgicos α_1 . Estos resultados concuerdan con el estudio de otros autores, ya que en un modelo de isquemia-reperfusión en ratas Wistar macho se produce una mayor respuesta contráctil a la NE en segmentos de aorta (Granado et al., 2022). Sin embargo, aunque el VPA fue capaz de revertir el aumento de contracción a la NE, no modificó el aumento de la expresión de los receptores adrenérgicos α_1 . En este sentido, debido a que la NE es un agonista no selectivo de los receptores adrenérgicos (Guimarães & Moura, 2001), es razonable sugerir que el VPA puede estar activando los receptores adrenérgicos α_2 . Según Vanhoutte & Miller (1989), en el endotelio de vasos expuestos a elevadas presiones parciales de oxígeno y elevado flujo sanguíneo, como ocurre en la aorta, se expresan receptores adrenérgicos α_2 que median la relajación dependiente de endotelio, y así lo han comprobado posteriormente otros estudios (Maaliki et al., 2019; Pillay-Fuentes

Lorente et al., 2020; S. Y. Wang, 2000). A pesar de que nuestros resultados mostraron que el IAM no modificó la expresión de los receptores adrenérgicos α_2 , el VPA sí la aumentó. Por lo tanto, el efecto del VPA sobre la respuesta adrenérgica podría venir determinado por el aumento de expresión de los receptores adrenérgicos α_2 en el endotelio, induciendo la liberación de NO. En este sentido, cabe destacar que no hemos encontrado estudios que se centren en la modulación de los receptores adrenérgicos vasculares por el VPA. Un estudio ha especulado que, debido a que el VPA reduce la lesión neuronal y tiene efectos antiinflamatorios y antiapoptóticos como inhibidor de la histona desacetilasa, este puede tener un papel en la remodelación cardíaca al inhibir la actividad simpática (Y. Liu et al., 2017), pero no profundiza en la interacción entre el VPA y los receptores adrenérgicos. Por tanto, nuestro estudio es probablemente el primero en establecer que el VPA puede aumentar la expresión de α_2 en la aorta después de un IAM.

Por otro lado, los niveles elevados de ET-1 cardíaca y circulante se han relacionado con el desarrollo de disfunción cardíaca y la gravedad de la insuficiencia cardíaca (Brás-Silva y Leite-Moreira, 2008). En patologías como el IAM, la actividad y la densidad de los receptores de ET-1 en las membranas celulares del miocardio están aumentadas (Ai et al., 2022). En concreto, los efectos de la ET-1 durante el infarto de miocardio parecen estar mediados principalmente por la activación del receptor ETA (Oikonomidis et al., 2010). Nuestros resultados muestran que la expresión proteica de los receptores ETA aumentaba en el grupo IAM, explicando la mayor respuesta a la ET-1. En el mismo sentido, en otro estudio se observó que pacientes con infarto de miocardio con peso corporal normal, tenían mayor expresión génica de ETA en comparación con pacientes obesos (Dąbek et al., 2022). En esta tesis, demostramos que el VPA fue capaz de revertir tanto la contracción elevada a la ET-1 inducida por el IAM como el aumento de la expresión de los receptores ETA. Esto podría explicar la hipercontractilidad en respuesta a la ET-1 en el IAM y el mecanismo por el cual el VPA revierte este efecto. Por otro lado, observamos que la expresión del receptor ETB disminuyó con el IAM. Sin embargo, el trabajo de Dimitrijevic et al. (2009), muestra resultados opuestos a los

obtenidos por nuestro grupo, ya que observaron un aumento significativo de la expresión de los receptores ETB en pacientes con cardiopatía isquémica. Estos hallazgos podrían ser indicio de una remodelación vascular asociada a la cardiopatía isquémica y las diferencias con nuestros resultados podrían ser debidas al modelo experimental y al lecho vascular, ya que estos autores emplean en su estudio arterias subcutáneas de procedencia humana. En nuestro modelo de IAM, el tratamiento con VPA aumenta la expresión de los receptores ETB, que provoca vasodilatación (Mazzuca & Khalil, 2012) a través de la vía del NO (Park et al., 2022). Por tanto, la capacidad del VPA para disminuir la expresión del receptor ETA y aumentar la del ETB le confiere un efecto protector frente al IAM.

Un vasoconstrictor que promueve la producción de ET-1 mediante la estimulación de la bigET es la Ang II (Saenz-Medina et al., 2022), que es un potente vasopresor del RAS. Esta se ha visto aumentada en pacientes con ECV (Garcia et al., 2023; Mehta y Griendling, 2007) como el IAM (Ma et al., 2010). A nivel vascular, Ang II es uno de los factores contráctiles más importantes, que se sintetiza para actuar como antagonista fisiológico del NO (Radenković et al., 2016). Por tanto, dado que la aorta del grupo IAM padece una disfunción endotelial y presenta aumento en la respuesta contráctil a los otros agonistas estudiados, NE y ET-1, cabría esperar que también aumentase la respuesta a la Ang II. Sin embargo, nuestros resultados muestran que ni el IAM ni el tratamiento con VPA inducen cambios en respuesta a la Ang II, ni tampoco variaciones en la expresión del receptor ATR1. No obstante, el VPA aumenta la expresión del ATR2, relacionado con mecanismos de vasodilatación (Baranov y Armstead, 2005; Chia et al., 2011).

La mayoría de los trabajos que estudian el efecto del VPA sobre el sistema RAS se centran en el tejido cardíaco, como el estudio de Y. Lu & Yang (2009) que mostró que la Ang II inducía hipertrofia cardíaca, y el VPA ejercía un efecto protector sobre la hipertrofia de los cardiomiocitos. El mecanismo propuesto es que el VPA modula la expresión proteica de HDAC2. Además, en otro estudio en modelo animal de rata y de ratón se observó una reducción por parte del VPA de la hipertrofia cardíaca

producida por la Ang II (Kee et al., 2006). En cardiomiocitos se ha demostrado que el VPA es capaz de ejercer un efecto protector frente a la hipertrofia, actuando como un modulador selectivo de isoenzimas, revirtiendo el incremento de la expresión proteica de HDAC2 (Krämer et al., 2003; Y. Lu & Yang, 2009; McKinsey, 2011).

En otros trastornos cardiovasculares, como la hipertensión inducida por una dieta rica en grasas, la expresión de ARNm de ATR1 aumenta y el VPA la revierte a niveles normales a nivel renal (Choi et al., 2017). El estudio de Dimitrijevic et al. (2009) muestra que los pacientes con cardiopatía isquémica presentan una mayor expresión de los receptores ATR1 en las células del músculo liso en arterias subcutáneas. Por otra parte, Serner et al. (2001) no vieron cambios en ATR1 y ATR2 en pacientes con insuficiencia cardíaca en tejido cardíaco, arterias coronarias, aorta, arteria pulmonar, arteria mamaria y vena safena al igual que ocurre en nuestro estudio, pero no evaluaron el efecto del VPA. Así pues, la regulación al alza del receptor ATR2 por el VPA después de un IAM, como se muestra en esta tesis, no ha sido descrita previamente.

6.5. Efecto del VPA en un modelo de IAM. Niveles plasmáticos de nitratos y nitritos

Los niveles plasmáticos de NO_x son un parámetro que caracteriza varios procesos, incluida la síntesis y oxidación de NO endógeno o la excreción de nitritos y nitratos, podrían considerarse predictores independientes de mortalidad cardiovascular y existe una asociación entre los niveles elevados de NO_x y el riesgo de IAM (Gumanova et al., 2022). Puesto que el efecto de la mejora endotelial atribuida al VPA dependía de una mayor producción de NO, quisimos estudiar si a nivel sistémico también se producía un aumento de los niveles plasmáticos de NO. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre grupos, concluyendo que el IAM no modifica los niveles plasmáticos de NO y que el VPA aumenta la liberación de NO solo a nivel local. En la literatura encontramos estudios que indican

un aumento de los niveles plasmáticos de NO tras un IAM en sujetos jóvenes, que puede ser debido a la producción de NO por macrófagos (Akiyama et al., 1998; Caimi et al., 2008). También se ha observado un aumento de niveles de NO en conejos White New Zealand infartados (Akiyama et al., 1997) y en ratas, por incremento de actividad de iNOS (Sartório et al., 2005) o en pacientes con enfermedad de las arterias coronarias, donde el polimorfismo E298D del gen de la eNOS se asoció con un aumento de NO_x en plasma (Y. Yoon et al., 2000). Sin embargo, en el estudio de Serrano-Ponz et al. (2016), pacientes con accidente cerebrovascular isquémico agudo presentaron menores niveles plasmáticos de NO en comparación con sujetos sanos. Lo mismo ocurrió en el estudio de Y. B. Zhao et al. (2015), ya que encontraron niveles plasmáticos de NO disminuidos en modelo animal de conejo con lesión aguda por isquemia-reperusión miocárdica.

Por otra parte, el VPA inhibe la expresión de eNOS en cultivo de células endoteliales procedentes del cordón umbilical (HUVECs), lo que conduce a una disminución de la producción de NO (Murugavel et al., 2018). En plasma de ratas tratadas con VPA, también se observó una disminución en los niveles de NO (Adegoke et al., 2022). Contrariamente a esto, en plasma de ratón los niveles de NO aumentaron con VPA (Cho et al., 2014). Por otro lado, Emeksiz et al. (2013) no encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de NO en niños con epilepsia y niños sanos. Así que el efecto del VPA sobre los niveles plasmáticos de NO_x no queda claro en base a la literatura actual y con esta tesis aportamos que no tiene relevancia, por no encontrar diferencias entre grupos, así que no podría utilizarse como un biomarcador de la mejora del IAM con el VPA.

6.6. Consideraciones finales

El VPA podría ser un fármaco efectivo para tratar el IAM, ya que es capaz de revertir la disfunción endotelial y la hipercontractilidad vascular observada en esta patología. En este trabajo hemos atribuido estas mejoras vasculares a la capacidad antioxidante del VPA, que aumentarían la biodisponibilidad de NO a nivel local

mejorando la vasodilatación y sin afectar a los niveles plasmáticos de NO. Dado que tras un IAM se activan los sistemas simpático, ET-1 y Ang II, la modulación de estos por el VPA, a través del aumento de expresión de los receptores adrenérgicos α_2 , ETB y ATR2, todos ellos relacionados con la vasodilatación, tendría efectos beneficiosos disminuyendo las resistencias periféricas tras un IAM y mejorando la función cardíaca.

CONCLUSIONES

- 1- El IAM induce disfunción endotelial en aorta abdominal de conejo, sin afectar a la capacidad vasodilatadora del músculo liso vascular. El tratamiento con VPA mejora la función endotelial por aumentar la biodisponibilidad de NO y por aumentar la sensibilidad del músculo liso vascular al NO.
- 2- La mejora en la biodisponibilidad de NO con el VPA es independiente de la vía de la eNOS, ya que no se produce un aumento de su expresión proteica ni una mayor activación por fosforilación en Ser1177. Tampoco parece que esté relacionada con la vía de la arginasa, ya que el VPA no es capaz de revertir el aumento de la expresión de la ARG2 inducida por el IAM.
- 3- El tratamiento con VPA mejora el estrés oxidativo vascular inducido por el IAM al restaurar los niveles de SOD1, pudiendo ser la causa de la mayor biodisponibilidad de NO.
- 4- La respuesta a agonistas contráctiles como la NE y la ET-1 aumenta en el grupo IAM. El tratamiento con VPA revierte este efecto hasta igualarlo a los valores del grupo control. La mayor respuesta contráctil a la NE y a la ET-1 en el IAM puede estar relacionada con la mayor expresión de los receptores α_1 y ETA respectivamente. El VPA es capaz de incrementar la expresión de los receptores α_2 y ETB, ambos relacionados con mecanismos de vasodilatación.
- 5- La respuesta a la Ang II no se altera con el IAM ni con el VPA. No obstante, el VPA aumenta la expresión del receptor ATR2 relacionado también con vasodilatación.

BIBLIOGRAFÍA

- Abassi, Z., Khoury, E. E., Karram, T., & Aronson, D. (2022). Edema formation in congestive heart failure and the underlying mechanisms. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9, 933215. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.933215>
- Abukar, Y., May, C. N., & Ramchandra, R. (2016). Role of endothelin-1 in mediating changes in cardiac sympathetic nerve activity in heart failure. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 310(1), R94-R99. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00205.2015>
- Adegoke, T. E., Sabinari, I. W., Usman, T. O., Abdulkareem, T. O., Michael, O. S., Adeyanju, O. A., Dibia, C., Omotoye, O. O., Oyabambi, A. O., & Olatunji, L. A. (2022). Allopurinol and valproic acid improve cardiac triglyceride and Na⁺-K⁺-ATPase activity independent of circulating aldosterone in female rats with glucose intolerance. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 128(5), 1283-1289. <https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1767148>
- Aflyatumova, G. N., Nigmatullina, R. R., Sadykova, D. I., Chibireva, M. D., Fugetto, F., & Serra, R. (2018). Endothelin-1, nitric oxide, serotonin and high blood pressure in male adolescents. *Vascular Health and Risk Management*, 14, 213-223. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S170317>
- Ai, W., Zhang, M., & Hu, J. (2022). Effects of Endothelin-1 and nitric oxide levels on myocardial ischemia-reperfusion injury. *Annals of Translational Medicine*, 10(24), 1309. <https://doi.org/10.21037/atm-22-4998>
- Akiyama, K., Kimura, A., Suzuki, H., Takeyama, Y., Gluckman, T. L., Terhakopian, A., Katagiri, T., Suh, K. Y., Roseto, J., & Bing, R. J. (1998). Production of oxidative products of nitric oxide in infarcted human heart. *Journal of the American College of Cardiology*, 32(2), Article 2. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(98\)00270-8](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(98)00270-8)
- Akiyama, K., Suzuki, H., Grant, P., & Bing, R. J. (1997). Oxidation products of nitric oxide, NO₂ and NO₃, in plasma after experimental myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29(1), Article 1. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1996.9998>
- Aladağ, N., Asoğlu, R., Ozdemir, M., Asoğlu, E., Derin, A. R., Demir, C., & Demir, H. (2021). Oxidants and antioxidants in myocardial infarction (MI): Investigation of ischemia modified albumin, malondialdehyde, superoxide dismutase and catalase in individuals diagnosed with ST elevated myocardial infarction (STEMI) and non-STEMI (NSTEMI). *Journal of Medical Biochemistry*, 40(3), 286-294. <https://doi.org/10.5937/jomb0-28879>
- Aldasoro, M., Mauricio, M. D., Serna, E., Cortina, B., Medina, P., Segarra, G., Novella, S., & Vila, J. M. (2007). Aspirin and COX-2 inhibitor nimesulide potentiate adrenergic contractions of human gastroepiploic artery. *American*

- Journal of Hypertension*, 20(5), 514-519.
<https://doi.org/10.1016/j.amjhyper.2006.12.002>
- Alem, M. M. (2019). Endothelial Dysfunction in Chronic Heart Failure: Assessment, Findings, Significance, and Potential Therapeutic Targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133198>
- Al-Gburi, S., Deussen, A., Zatschler, B., Weber, S., Künzel, S., El-Armouche, A., Lorenz, K., Cybularz, M., Morawietz, H., & Kopaliani, I. (2017). Sex-difference in expression and function of beta-adrenoceptors in macrovessels: Role of the endothelium. *Basic Research in Cardiology*, 112(3), 29. <https://doi.org/10.1007/s00395-017-0617-2>
- Bambakidis, T., Dekker, S. E., Halaweish, I., Liu, B., Nikolian, V. C., Georgoff, P. E., Piascik, P., Li, Y., Sillesen, M., & Alam, H. B. (2017). Valproic acid modulates platelet and coagulation function ex vivo. *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis*, 28(6), 479-484. <https://doi.org/10.1097/MBC.0000000000000626>
- Baranov, D., & Armstead, W. M. (2005). Nitric oxide contributes to AT2 but not AT1 angiotensin II receptor-mediated vasodilatation of porcine pial arteries and arterioles. *European Journal of Pharmacology*, 525(1-3), 112-116. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.06.052>
- Bayrak, B. B., Yilmaz, S., Hacıhasanoglu Cakmak, N., & Yanardag, R. (2021). The effects of edaravone, a free-radical scavenger in lung injury induced by valproic acid demonstrated via different biochemical parameters. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(9), e22847. <https://doi.org/10.1002/jbt.22847>
- Beltrán-Sarmiento, E., Aragoitia-Sarabia, C. K., Floriano-Sánchez, E., Sandoval-Pacheco, R., Galván-Hernández, D. E., Coballase-Urrutia, E., Carmona-Aparicio, L., Ramos-Reyna, E., Rodríguez-Silverio, J., & Cárdenas-Rodríguez, N. (2018). Effects of Valproate Monotherapy on the Oxidant-Antioxidant Status in Mexican Epileptic Children: A Longitudinal Study. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 7954371. <https://doi.org/10.1155/2018/7954371>
- Bendall, J. K., Douglas, G., McNeill, E., Channon, K. M., & Crabtree, M. J. (2014). Tetrahydrobiopterin in Cardiovascular Health and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(18), 3040-3077. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5566>
- Benedetti, R., Conte, M., & Altucci, L. (2015). Targeting Histone Deacetylases in Diseases: Where Are We? *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(1), 99-126. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5776>
- Beñaldo F., F. A., Ferrada D, J. C., Castillo G., S., Ebensperger D., G., Beñaldo F., F. A., Ferrada D, J. C., Castillo G., S., & Ebensperger D., G. (2017). Mecanismos regulatorios del tono vascular pulmonar neonatal. Una perspectiva molecular. *Revista chilena de enfermedades respiratorias*, 33(4), 308-315. <https://doi.org/10.4067/S0717-73482017000400308>

- Berges, A., Van Nassauw, L., Timmermans, J.-P., & Vrints, C. (2005). Role of nitric oxide during coronary endothelial dysfunction after myocardial infarction. *European Journal of Pharmacology*, 516(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.04.028>
- Bergheanu, S. C., van der Laarse, A., van der Bom, J. G., van der Hoeven, B. L., le Cessie, S., de Jong, M. G., Liem, S.-S., Schalij, M. J., & Jukema, J. W. (2011). Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) Levels Display a Morning Peak in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Disease markers*, 30(5), 245-252. <https://doi.org/10.3233/DMA-2011-0781>
- Brás-Silva, C., & Leite-Moreira, A. F. (2008). Myocardial effects of endothelin-1. *Revista Portuguesa De Cardiologia: Orgao Oficial Da Sociedade Portuguesa De Cardiologia = Portuguese Journal of Cardiology: An Official Journal of the Portuguese Society of Cardiology*, 27(7-8), 925-951.
- Bravo Baptista, S., Faustino, M., Brizida, L., Loureiro, J., Augusto, J., Abecasis, J., Monteiro, C., Leal, P., Nédio, M., Farto e Abreu, P., Gil, V., & Morais, C. (2017). Early peripheral endothelial dysfunction predicts myocardial infarct extension and microvascular obstruction in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 36(10), 731-742. <https://doi.org/10.1016/j.repc.2017.01.006>
- Bruno, R. M., Sudano, I., Ghiadoni, L., Masi, L., & Taddei, S. (2011). Interactions between sympathetic nervous system and endogenous endothelin in patients with essential hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 57(1), 79-84. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.163584>
- Bryan, N. S., & Grisham, M. B. (2007). Methods to Detect Nitric Oxide and its Metabolites in Biological Samples. *Free radical biology & medicine*, 43(5), 645-657. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026>
- Burton, R. A. B., Schneider, J. E., Bishop, M. J., Hales, P. W., Bollensdorff, C., Robson, M. D., Wong, K. C. K., Morris, J., Quinn, T. A., & Kohl, P. (2012). Microscopic magnetic resonance imaging reveals high prevalence of third coronary artery in human and rabbit heart. *Europace: European Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Electrophysiology: Journal of the Working Groups on Cardiac Pacing, Arrhythmias, and Cardiac Cellular Electrophysiology of the European Society of Cardiology*, 14 Suppl 5, v73-v81. <https://doi.org/10.1093/europace/eus276>
- Cahill, P. A., & Redmond, E. M. (2016). Vascular endothelium – Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*, 248, 97-109. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007>
- Caimi, G., Montana, M., Calandrino, V., Caruso, M., Carollo, C., Catania, A., & Lo Presti, R. (2008). Nitric oxide metabolites (nitrite and nitrate) in young patients with recent acute myocardial infarction. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 40(2), Article 2.

- Caldwell, R. B., Toque, H. A., Narayanan, S. P., & Caldwell, R. W. (2015). Arginase: An old enzyme with new tricks. *Trends in pharmacological sciences*, 36(6), 395-405. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.03.006>
- Caldwell, R. W., Rodriguez, P. C., Toque, H. A., Narayanan, S. P., & Caldwell, R. B. (2018). Arginase: A Multifaceted Enzyme Important in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 98(2), 641-665. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2016>
- Cardinale, J. P., Sriramula, S., Pariaut, R., Guggilam, A., Mariappan, N., Elks, C., & Francis, J. (2010). HDAC Inhibition Attenuates Inflammatory, Hypertrophic and Hypertensive Responses in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*, 56(3), Article 3. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.154567>
- Causey, M. W., Salgar, S., Singh, N., Martin, M., & Stallings, J. D. (2012). Valproic acid reversed pathologic endothelial cell gene expression profile associated with ischemia-reperfusion injury in a swine hemorrhagic shock model. *Journal of Vascular Surgery*, 55(4), Article 4. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2011.08.060>
- Chalioti, V.-M., Giannakoulis, V. G., Papoutsis, E., Megalou, A., Kritikos, K., Konstantopoulos, P., Roussou, P., Toutouzas, K., & Perrea, D. N. (2020). Dimethylarginines in acute myocardial infarction: Association with lifestyle, sociodemographic, and somatometric factors. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 9(12), 6234-6239. https://doi.org/10.4103/jfmpe.jfmpe_1495_20
- Chandra, S., Romero, M., Shatanawi, A., Alkilany, A., Caldwell, R., & Caldwell, R. (2012). Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. *British Journal of Pharmacology*, 165(2), 506-519. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01584.x>
- Chapman, A. R., Adamson, P. D., & Mills, N. L. (2017). Assessment and classification of patients with myocardial injury and infarction in clinical practice. *Heart (British Cardiac Society)*, 103(1), 10-18. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2016-309530>
- Chen, H. (2018). Role of thromboxane A2 signaling in endothelium-dependent contractions of arteries. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 134, 32-37. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2017.11.004>
- Chen, J., Zhang, J., Shaik, N. F., Yi, B., Wei, X., Yang, X.-F., Naik, U. P., Summer, R., Yan, G., Xu, X., & Sun, J. (2019). The histone deacetylase inhibitor tubacin mitigates endothelial dysfunction by up-regulating the expression of endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(51), 19565-19576. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011317>
- Chen, S.-M., Tsai, T.-H., Hang, C.-L., Yip, H.-K., Fang, C.-Y., Wu, C.-J., & Guo, G. B.-F. (2011). Endothelial dysfunction in young patients with acute ST-elevation myocardial infarction. *Heart and Vessels*, 26(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s00380-010-0017-0>

- Cheng, P., Lian, F., Wang, X., Cai, G., Huang, G., Chen, M., Shen, A., & Gao, S. (2019). Xin-Ji-Er-Kang Alleviates Myocardial Infarction-Induced Cardiovascular Remodeling in Rats by Inhibiting Endothelial Dysfunction. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4794082>
- Chia, E., Kagota, S., Wijekoon, E. P., & McGuire, J. J. (2011). Protection of protease-activated receptor 2 mediated vasodilatation against angiotensin II-induced vascular dysfunction in mice. *BMC Pharmacology*, 11, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2210-11-10>
- Chiu, C.-T., Wang, Z., Hunsberger, J. G., & Chuang, D.-M. (2013). Therapeutic Potential of Mood Stabilizers Lithium and Valproic Acid: Beyond Bipolar Disorder. *Pharmacological Reviews*, 65(1), 105-142. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005512>
- Cho, D.-H., Park, J.-H., Joo Lee, E., Jong Won, K., Lee, S.-H., Kim, Y.-H., Hwang, S., Ja Kwon, K., Young Shin, C., Song, K.-H., Jo, I., & Han, S.-H. (2014a). Valproic acid increases NO production via the SH-PTP1-CDK5-eNOS-Ser(116) signaling cascade in endothelial cells and mice. *Free Radical Biology & Medicine*, 76, 96-106. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.043>
- Cho, D.-H., Park, J.-H., Joo Lee, E., Jong Won, K., Lee, S.-H., Kim, Y.-H., Hwang, S., Ja Kwon, K., Young Shin, C., Song, K.-H., Jo, I., & Han, S.-H. (2014b). Valproic acid increases NO production via the SH-PTP1-CDK5-eNOS-Ser(116) signaling cascade in endothelial cells and mice. *Free Radical Biology & Medicine*, 76, 96-106. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.043>
- Choi, J., Park, S., Kwon, T. K., Sohn, S. I., Park, K. M., & Kim, J. I. (2017). Role of the histone deacetylase inhibitor valproic acid in high-fat diet-induced hypertension via inhibition of HDAC1/angiotensin II axis. *International Journal of Obesity*, 41, 1702-1709. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.166>
- Chuang, Y.-F., Yang, H.-Y., Ko, T.-L., Hsu, Y.-F., Sheu, J.-R., Ou, G., & Hsu, M.-J. (2014). Valproic acid suppresses lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression via MKP-1 in murine brain microvascular endothelial cells. *Biochemical Pharmacology*, 88(3), 372-383. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.02.004>
- Csanyi, G., Bauer, M., Dietl, W., Lomnicka, M., Stepuro, T., Podesser, B. K., & Chlopicki, S. (2006). Functional alterations in NO, PGI2 and EDHF pathways in the aortic endothelium after myocardial infarction in rats. *European Journal of Heart Failure*, 8(8), Article 8. <https://doi.org/10.1016/j.ejheart.2006.09.011>
- Dąbek, J., Piotrkowicz, J., Głogowska-Ligus, J., Domagalska-Szopa, M., Szopa, A., & Schreiber, L. (2022). Expression of the Endothelin-1 Gene and Its Type a Receptor including Physical Activity among Patients with Acute Myocardial Infarction. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ijerph19127289>

- Daiber, A., Steven, S., Weber, A., Shuvaev, V. V., Muzykantov, V. R., Laher, I., Li, H., Lamas, S., & Münzel, T. (2017). Targeting vascular (endothelial) dysfunction. *British Journal of Pharmacology*, 174(12), 1591-1619. <https://doi.org/10.1111/bph.13517>
- Dardi, P., Perazza, L. R., Couto, G. K., Campos, G. P., Capettini, L. dos S. A., & Rossoni, L. V. (2021). Vena cava presents endothelial dysfunction prior to thoracic aorta in heart failure: The pivotal role of nNOS uncoupling/oxidative stress. *Clinical Science*, 135(23), 2625-2641. <https://doi.org/10.1042/CS20210810>
- Dawson, T. A., Li, D., Woodward, T., Barber, Z., Wang, L., & Paterson, D. J. (2008). Cardiac cholinergic NO-cGMP signaling following acute myocardial infarction and nNOS gene transfer. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 295(3), H990-H998. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00492.2008>
- de Miguel-Yanes, J. M., Jiménez-García, R., Hernandez-Barrera, V., de Miguel-Díez, J., Muñoz-Rivas, N., Méndez-Bailón, M., Pérez-Farinós, N., López-Herranz, M., & Lopez-de-Andres, A. (2021). Sex Differences in the Incidence and Outcomes of Acute Myocardial Infarction in Spain, 2016-2018: A Matched-Pair Analysis. *Journal of Clinical Medicine*, 10(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/jcm10081795>
- Dimitrijevic, I., Edvinsson, M.-L., Chen, Q., Malmjö, M., Kimblad, P.-O., & Edvinsson, L. (2009). Increased expression of vascular endothelin type B and angiotensin type 1 receptors in patients with ischemic heart disease. *BMC Cardiovascular Disorders*, 9, 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2261-9-40>
- Doggrell, S. A. (2004). The endothelin system and its role in acute myocardial infarction. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 8(3), 191-201. <https://doi.org/10.1517/14728222.8.3.191>
- Donato, A. J., Morgan, R. G., Walker, A. E., & Lesniewski, L. A. (2015). Cellular and Molecular Biology of Aging Endothelial Cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 89(0), 122-135. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.01.021>
- Edwards, J. M., McCarthy, C. G., & Wenceslau, C. F. (2020). The Obligatory Role of the Acetylcholine-Induced Endothelium-Dependent Contraction in Hypertension: Can Arachidonic Acid Resolve this Inflammation? *Current pharmaceutical design*, 26(30), 3723-3732. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200417150121>
- Ellinworth, D. C., Shukla, N., Fleming, I., & Jeremy, J. Y. (2014). Interactions between thromboxane A2, thromboxane/prostaglandin (TP) receptors, and endothelium-derived hyperpolarization. *Cardiovascular Research*, 102(1), 9-16. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu015>

- Emeksiz, H. C., Serdaroglu, A., Biberoglu, G., Gulbahar, O., Arhan, E., Cansu, A., Arga, M., & Hasanoglu, A. (2013). Assessment of atherosclerosis risk due to the homocysteine-asymmetric dimethylarginine-nitric oxide cascade in children taking antiepileptic drugs. *Seizure*, 22(2), 124-127. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2012.11.007>
- English, J. D., Tian, S., Wang, Z., & Luzum, J. A. (2022). Association of Valproic Acid Use With Post-Myocardial Infarction Heart Failure Development: A Meta-Analysis of Two Retrospective Case–Control Studies. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*, 27, 10742484221140303. <https://doi.org/10.1177/10742484221140303>
- Fathil, M. F. M., Md Arshad, M. K., Gopinath, S. C. B., Hashim, U., Adzhri, R., Ayub, R. M., Ruslinda, A. R., Nuzaihan M N, M., Azman, A. H., Zaki, M., & Tang, T.-H. (2015). Diagnostics on acute myocardial infarction: Cardiac troponin biomarkers. *Biosensors & Bioelectronics*, 70, 209-220. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.03.037>
- Fereja, T. H., Wang, C., Liu, F., Guan, Y., & Xu, G. (2020). A high-efficiency cathodic sodium nitroprusside/luminol/H₂O₂ electrochemiluminescence system in neutral media for the detection of sodium nitroprusside, glucose, and glucose oxidase. *Analyst*, 145(20), 6649-6655. <https://doi.org/10.1039/D0AN01178A>
- Fernandez Rico, C., Konate, K., Josse, E., Nargeot, J., Barrère-Lemaire, S., & Boisguérin, P. (2022). Therapeutic Peptides to Treat Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9, 792885. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.792885>
- Forrester, S. J., Booz, G. W., Sigmund, C. D., Coffman, T. M., Kawai, T., Rizzo, V., Scalia, R., & Eguchi, S. (2018). Angiotensin II Signal Transduction: An Update on Mechanisms of Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 98(3), 1627-1738. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2017>
- Frantz, S., Hundertmark, M. J., Schulz-Menger, J., Bengel, F. M., & Bauersachs, J. (2022). Left ventricular remodelling post-myocardial infarction: Pathophysiology, imaging, and novel therapies. *European Heart Journal*, 43(27), 2549-2561. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehac223>
- Garcia, B., Zarbock, A., Bellomo, R., & Legrand, M. (2023). The alternative renin–angiotensin system in critically ill patients: Pathophysiology and therapeutic implications. *Critical Care*, 27(1), 453. <https://doi.org/10.1186/s13054-023-04739-5>
- Garland, C. J., & Dora, K. A. (2017). EDH: Endothelium-dependent hyperpolarization and microvascular signalling. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 219(1), 152-161. <https://doi.org/10.1111/apha.12649>
- Gavriilaki, E., Anyfanti, P., Gavriilaki, M., Lazaridis, A., Douma, S., & Gkaliagkousi, E. (2020). Endothelial Dysfunction in COVID-19: Lessons

- Learned from Coronaviruses. *Current Hypertension Reports*, 22(9). <https://doi.org/10.1007/s11906-020-01078-6>
- Genovés, P., Arias-Mutis, Ó. J., Parra, G., Such-Miquel, L., Zarzoso, M., Del Canto, I., Soler, C., Díaz, A., Blanch, E., Alberola, A., Such, L., & Chorro, F. J. (2020). Development and Long-Term Follow-Up of an Experimental Model of Myocardial Infarction in Rabbits. *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/ani10091576>
- Gezginci-Oktayoglu, S., Turkyilmaz, I. B., Ercin, M., Yanardag, R., & Bolkent, S. (2016). Vitamin U has a protective effect on valproic acid-induced renal damage due to its anti-oxidant, anti-inflammatory, and anti-fibrotic properties. *Protoplasma*, 253(1), 127-135. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0796-3>
- Gonon, A. T., Jung, C., Katz, A., Westerblad, H., Shemyakin, A., Sjöquist, P.-O., Lundberg, J. O., & Pernow, J. (2012a). Local arginase inhibition during early reperfusion mediates cardioprotection via increased nitric oxide production. *PloS One*, 7(7), e42038. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042038>
- Gonon, A. T., Jung, C., Katz, A., Westerblad, H., Shemyakin, A., Sjöquist, P.-O., Lundberg, J. O., & Pernow, J. (2012b). Local arginase inhibition during early reperfusion mediates cardioprotection via increased nitric oxide production. *PloS One*, 7(7), Article 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042038>
- Goto, K., Ohtsubo, T., & Kitazono, T. (2018). Endothelium-Dependent Hyperpolarization (EDH) in Hypertension: The Role of Endothelial Ion Channels. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 315. <https://doi.org/10.3390/ijms19010315>
- Granado, M., González-Hedström, D., Amor, S., Fajardo-Vidal, A., Villalva, M., de la Fuente-Fernández, M., Tejera-Muñoz, A., Jaime, L., Santoyo, S., & García-Villalón, A. L. (2022). Marjoram extract prevents ischemia reperfusion-induced myocardial damage and exerts anti-contractile effects in aorta segments of male wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 282, 114660. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114660>
- Grandl, G., & Wolfrum, C. (2018). Hemostasis, endothelial stress, inflammation, and the metabolic syndrome. *Seminars in Immunopathology*, 40(2), 215-224. <https://doi.org/10.1007/s00281-017-0666-5>
- Gray, M. P., Vogel, B., Mehran, R., Leopold, J. A., & Figtree, G. A. (2024). Primary prevention of cardiovascular disease in women. *Climacteric: The Journal of the International Menopause Society*, 27(1), 104-112. <https://doi.org/10.1080/13697137.2023.2282685>
- Grönros, J., Kiss, A., Palmér, M., Jung, C., Berkowitz, D., & Pernow, J. (2013). Arginase inhibition improves coronary microvascular function and reduces infarct size following ischaemia-reperfusion in a rat model. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 208(2), 172-179. <https://doi.org/10.1111/apha.12097>

- Guerra-Ojeda, S., Marchio, P., Gimeno-Raga, M., Arias-Mutis, Ó. J., San-Miguel, T., Valles, S., Aldasoro, M., Vila, J. M., Zarzoso, M., & Mauricio, M. D. (2021). PPAR γ as an indicator of vascular function in an experimental model of metabolic syndrome in rabbits. *Atherosclerosis*, 332, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2021.08.006>
- Guimarães, S., & Moura, D. (2001). Vascular Adrenoceptors: An Update. *Pharmacological Reviews*, 53(2), 319-356. [https://doi.org/10.1016/S0031-6997\(24\)01495-9](https://doi.org/10.1016/S0031-6997(24)01495-9)
- Gumanova, N. G., Bogdanova, N. L., Metelskaya, V. A., Tarasov, V. I., Kots, A. Ya., Kutsenko, V. A., Kontsevaya, A. V., & Drapkina, O. M. (2022). Serum biomarkers, including nitric oxide metabolites (NOx), for prognosis of cardiovascular death and acute myocardial infarction in an ESSE-RF case-control cohort with 6.5-year follow up. *Scientific Reports*, 12(1), 18177. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-22367-x>
- Hamed, S. A., Hamed, E. A., Hamdy, R., & Nabeshima, T. (2007). Vascular risk factors and oxidative stress as independent predictors of asymptomatic atherosclerosis in adult patients with epilepsy. *Epilepsy Research*, 74(2-3), 183-192. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.03.010>
- Hausenloy, D. J., Chilian, W., Crea, F., Davidson, S. M., Ferdinandy, P., Garcia-Dorado, D., van Royen, N., Schulz, R., & Heusch, G. (2019). The coronary circulation in acute myocardial ischaemia/reperfusion injury: A target for cardioprotection. *Cardiovascular Research*, 115(7), Article 7. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy286>
- Hayashi, D., Okubo, T., Suzuki, T., Miyazaki, Y., Tanaka, K., Usami, M., & Takizawa, T. (2021). Valproic acid up-regulates the whole NO-citrulline cycle for potent iNOS-NO signaling to promote neuronal differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Nitric Oxide*, 106, 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.10.006>
- Hernández-Reséndiz, S., Muñoz-Vega, M., Contreras, W. E., Crespo-Avilan, G. E., Rodríguez-Montesinos, J., Arias-Carrión, O., Pérez-Méndez, O., Boisvert, W. A., Preissner, K. T., & Cabrera-Fuentes, H. A. (2018). Responses of Endothelial Cells Towards Ischemic Conditioning Following Acute Myocardial Infarction. *Conditioning medicine*, 1(5), 247-258.
- Horikoshi, T., Nakamura, T., Yoshizaki, T., Watanabe, Y., Uematsu, M., Kobayashi, T., Nakamura, K., Saito, Y., Obata, J., & Kugiyama, K. (2021). Impact of persistent endothelial dysfunction in an infarct-related coronary artery on future major adverse cardiovascular event occurrence in STEMI survivors. *Heart and Vessels*, 36(4), 472-482. <https://doi.org/10.1007/s00380-020-01723-9>
- Horikoshi, T., Obata, J., Nakamura, T., Fujioka, D., Watanabe, Y., Nakamura, K., Watanabe, K., Saito, Y., & Kugiyama, K. (2019). Persistent Dysfunction of Coronary Endothelial Vasomotor Responses is Related to Atheroma Plaque

- Progression in the Infarct-Related Coronary Artery of AMI Survivors. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 26(12), 1062-1074. <https://doi.org/10.5551/jat.48249>
- Houde, M., Desbiens, L., & D'Orléans-Juste, P. (2016). Chapter Five - Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity. En R. A. Khalil (Ed.), *Advances in Pharmacology* (Vol. 77, pp. 143-175). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.05.002>
- Humeres, C., & Frangogiannis, N. G. (2019). Fibroblasts in the Infarcted, Remodeling, and Failing Heart. *JACC: Basic to Translational Science*, 4(3), 449-467. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2019.02.006>
- Hwabejire, J. O., Lu, J., Liu, B., Li, Y., Halaweish, I., & Alam, H. B. (2014). Valproic Acid for the Treatment of Hemorrhagic Shock: A Dose Optimization Study. *The Journal of surgical research*, 186(1), 363-370. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2013.09.016>
- Incalza, M. A., D'Oria, R., Natalicchio, A., Perrini, S., Laviola, L., & Giorgino, F. (2018). Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascular Pharmacology*, 100, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.05.005>
- Isaka, M., Kudo, A., Imamura, M., Kawakami, H., & Yasuda, K. (2007). Endothelin receptors, localized insympathetic nerve terminals of the heart, modulate norepinephrine release and reperfusion arrhythmias. *Basic Research in Cardiology*, 102(2), 154-162. <https://doi.org/10.1007/s00395-006-0623-2>
- Jackson, W. F. (2022). Endothelial Ion Channels and Cell-Cell Communication in the Microcirculation. *Frontiers in Physiology*, 13, 805149. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.805149>
- Janaszak-Jasiecka, A., Płoska, A., Wierońska, J. M., Dobrucki, L. W., & Kalinowski, L. (2023). Endothelial dysfunction due to eNOS uncoupling: Molecular mechanisms as potential therapeutic targets. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 28(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s11658-023-00423-2>
- Jung, B., Odening, K. E., Dall'Armellina, E., Föll, D., Menza, M., Markl, M., & Schneider, J. E. (2012). A quantitative comparison of regional myocardial motion in mice, rabbits and humans using in-vivo phase contrast CMR. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, 14(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1532-429X-14-87>
- Jung, H., Lee, E., Kim, I., Song, J. H., & Kim, G. J. (2019a). Histone deacetylase inhibition has cardiac and vascular protective effects in rats with pressure overload cardiac hypertrophy. *Physiological Research*, 68(5), Article 5. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934110>
- Jung, H., Lee, E., Kim, I., Song, J. H., & Kim, G. J. (2019b). Histone deacetylase inhibition has cardiac and vascular protective effects in rats with pressure

- overload cardiac hypertrophy. *Physiological Research*, 68(5), 727-737. <https://doi.org/10.33549/physiolres.934110>
- Kalkman, H. O. (2020). The Association Between Vascular Inflammation and Depressive Disorder. Causality, Biomarkers and Targeted Treatment. *Pharmaceuticals*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/ph13050092>
- Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M., & Korthuis, R. J. (2012). Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 298, 229-317. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7>
- Karabiber, H., Yakinci, C., Durmaz, Y., Temel, I., & Mehmet, N. (2004). Serum nitrite and nitrate levels in epileptic children using valproic acid or carbamazepine. *Brain & Development*, 26(1), 15-18. [https://doi.org/10.1016/s0387-7604\(03\)00076-7](https://doi.org/10.1016/s0387-7604(03)00076-7)
- Kaschina, E., Namsolleck, P., & Unger, T. (2017). AT2 receptors in cardiovascular and renal diseases. *Pharmacological Research*, 125, 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.07.008>
- Kee, H. J., Sohn, I. S., Nam, K. I., Park, J. E., Qian, Y. R., Yin, Z., Ahn, Y., Jeong, M. H., Bang, Y.-J., Kim, N., Kim, J.-K., Kim, K. K., Epstein, J. A., & Kook, H. (2006). Inhibition of histone deacetylation blocks cardiac hypertrophy induced by angiotensin II infusion and aortic banding. *Circulation*, 113(1), 51-59. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.559724>
- Kim, H. K., Kim, H. B., Lee, J. M., Kim, S. S., Bae, I. H., Park, D. S., Park, J.-K., Shim, J. W., Na, J.-Y., Lee, M. Y., Kim, J. S., Sim, D. S., Hong, Y. J., Nam, C.-W., Doh, J.-H., Park, J., Koo, B.-K., Kim, S.-U., Lim, K. S., & Jeong, M. H. (2019). Influence of Local Myocardial Infarction on Endothelial Function, Neointimal Progression, and Inflammation in Target and Non-Target Vascular Territories in a Porcine Model of Acute Myocardial Infarction. *Journal of Korean Medical Science*, 34(19), Article 19. <https://doi.org/10.3346/jkms.2019.34.e145>
- Klinger, J. R., Abman, S. H., & Gladwin, M. T. (2013). Nitric oxide deficiency and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(6), 639-646. <https://doi.org/10.1164/rccm.201304-0686PP>
- Kolettis, T. M., Oikonomidis, D. L., Baibaki, M.-E. E., Barka, E., Kontonika, M., Tsalikakis, D. G., Papalois, A., & Kyriakides, Z. S. (2014). Endothelin B-receptors and sympathetic activation: Impact on ventricular arrhythmogenesis during acute myocardial infarction. *Life Sciences*, 118(2), 281-287. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.01.069>
- Korandji, C., Zeller, M., Guillard, J.-C., Vergely, C., Sicard, P., Duvillard, L., Gambert, P., Moreau, D., Cottin, Y., & Rochette, L. (2007). Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and hyperhomocysteinemia in patients with acute

- myocardial infarction. *Clinical Biochemistry*, 40(1-2), 66-72.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2006.08.004>
- Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., & Chlubek, D. (2014). Cyclooxygenase pathways. *Acta Biochimica Polonica*, 61(4).
https://doi.org/10.18388/abp.2014_1825
- Krämer, O. H., Zhu, P., Ostendorff, H. P., Golebiewski, M., Tiefenbach, J., Peters, M. A., Brill, B., Groner, B., Bach, I., Heinzl, T., & Göttlicher, M. (2003). The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *The EMBO Journal*, 22(13), 3411-3420.
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg315>
- Kristiansen, S. B., Sheykhzade, M., Edvinsson, L., & Haanes, K. A. (2017). Changes in vasodilation following myocardial ischemia/reperfusion in rats. *Nitric Oxide*, 70, 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.09.002>
- Larsson, P., Alwis, I., Niego, B., Sashindranath, M., Fogelstrand, P., Wu, M. C. L., Glise, L., Magnusson, M., Daglas, M., Bergh, N., Jackson, S. P., Medcalf, R. L., & Jern, S. (2016). Valproic acid selectively increases vascular endothelial tissue-type plasminogen activator production and reduces thrombus formation in the mouse. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 14(12), Article 12.
<https://doi.org/10.1111/jth.13527>
- Lee, T.-M., Lin, M.-S., & Chang, N.-C. (2007a). Inhibition of histone deacetylase on ventricular remodeling in infarcted rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293(2), H968-977.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00891.2006>
- Lee, T.-M., Lin, M.-S., & Chang, N.-C. (2007b). Inhibition of histone deacetylase on ventricular remodeling in infarcted rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293(2), Article 2.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00891.2006>
- Lehmann, L. H., Stanmore, D. A., & Backs, J. (2014). The role of endothelin-1 in the sympathetic nervous system in the heart. *Life Sciences*, 118(2), 165-172.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.03.005>
- Lekkas, P., Kontonika, M., Georgiou, E. S., La Rocca, V., Mouchtouri, E.-T., Mourouzis, I., Pantos, C., & Kolettis, T. M. (2019). Endothelin receptors in the brain modulate autonomic responses and arrhythmogenesis during acute myocardial infarction in rats. *Life Sciences*, 239, 117062.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117062>
- Li, Z., Wang, L., Ren, Y., Huang, Y., Liu, W., Lv, Z., Qian, L., Yu, Y., & Xiong, Y. (2022a). Arginase: Shedding light on the mechanisms and opportunities in cardiovascular diseases. *Cell Death Discovery*, 8(1), Article 1.
<https://doi.org/10.1038/s41420-022-01200-4>

- Li, Z., Wang, L., Ren, Y., Huang, Y., Liu, W., Lv, Z., Qian, L., Yu, Y., & Xiong, Y. (2022b). Arginase: Shedding light on the mechanisms and opportunities in cardiovascular diseases. *Cell Death Discovery*, 8(1), 413. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01200-4>
- Liu, R., Fu, Y.-T., Jiang, F.-Q., Ye, Y.-J., & Wang, S.-M. (2023). Valproic Acid Treatment Improves Organ Function, Survival Rate, and Lipid Peroxidation in Fatally Scalded Rats. *Pharmacognosy Magazine*, 09731296231211466. <https://doi.org/10.1177/09731296231211466>
- Liu, X., & Tao, G.-Z. (2013). Effects of tirofiban on the reperfusion-related no-reflow in rats with acute myocardial infarction. *Journal of Geriatric Cardiology: JGC*, 10(1), 52-58. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-5411.2013.01.009>
- Liu, Y., Li, S., Zhang, Z., Lv, Z., Jiang, H., Tan, X., & Liu, F. (2017). Effects of valproic acid on sympathetic activity and left ventricular myocardial remodelling in rats during pressure overload. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 47(5), 1651-1660. <https://doi.org/10.3906/sag-1704-142>
- Lu, J., Ling, Z., Chen, W., Du, H., Xu, Y., Fan, J., Long, Y., Chen, S., Xiao, P., Liu, Z., Zrenner, B., & Yin, Y. (2014). Effects of renal sympathetic denervation using saline-irrigated radiofrequency ablation catheter on the activity of the renin-angiotensin system and endothelin-1. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 15(4), 532-539. <https://doi.org/10.1177/1470320313506480>
- Lu, Y., & Yang, S. (2009). Angiotensin II induces cardiomyocyte hypertrophy probably through histone deacetylases. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 219(1), 17-23. <https://doi.org/10.1620/tjem.219.17>
- Lubrano, V., Pingitore, A., Traghella, I., Storti, S., Parri, S., Berti, S., Ndreu, R., Andrenelli, A., Palmieri, C., Iervasi, G., Mastorci, F., & Vassalle, C. (2019). Emerging Biomarkers of Oxidative Stress in Acute and Stable Coronary Artery Disease: Levels and Determinants. *Antioxidants*, 8(5), 115. <https://doi.org/10.3390/antiox8050115>
- Lyu, X., Hu, M., Peng, J., Zhang, X., & Sanders, Y. Y. (2019). HDAC inhibitors as antifibrotic drugs in cardiac and pulmonary fibrosis. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 10, 2040622319862697. <https://doi.org/10.1177/2040622319862697>
- Ma, T. K., Kam, K. K., Yan, B. P., & Lam, Y.-Y. (2010). Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: Current status. *British Journal of Pharmacology*, 160(6), 1273-1292. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00750.x>
- Maaliki, D., Issa, K., Al Shehabi, T., El-Yazbi, A., & Eid, A. H. (2019). The role of α_2 -adrenergic receptors in hypertensive preeclampsia: A hypothesis. *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)*, 26(1), e12511. <https://doi.org/10.1111/micc.12511>

- Mahapatra, S., Firpo, M. T., & Bacanamwo, M. (2010). Inhibition of DNA Methyltransferases and Histone Deacetylases Induces Bone Marrow-derived Multipotent Adult Progenitor Cells to Differentiate into Endothelial Cells. *Ethnicity & disease*, 20(1 Suppl 1), S1-60-64.
- Mahdi, A., Kövamees, O., & Pernow, J. (2020). Improvement in endothelial function in cardiovascular disease—Is arginase the target? *International Journal of Cardiology*, 301, 207-214. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2019.11.004>
- Mauricio, M. D., Aldasoro, M., Ortega, J., & Vila, J. M. (2013). Endothelial Dysfunction in Morbid Obesity. *Current Pharmaceutical Design*, 19(32), Article 32.
- Mazucca, M. Q., & Khalil, R. A. (2012). Vascular Endothelin Receptor Type B: Structure, Function and Dysregulation in Vascular Disease. *Biochemical Pharmacology*, 84(2), 147-162. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.03.020>
- McDowell, K. S., Arevalo, H. J., Maleckar, M. M., & Trayanova, N. A. (2011). Susceptibility to arrhythmia in the infarcted heart depends on myofibroblast density. *Biophysical Journal*, 101(6), 1307-1315. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.08.009>
- McKinsey, T. (2011). Therapeutic Potential for HDAC Inhibitors in the Heart. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 52, 303-319. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134712>
- Mehta, P. K., & Griendling, K. K. (2007). Angiotensin II cell signaling: Physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 292(1), C82-97. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00287.2006>
- Mendez, J. I., Nicholson, W. J., & Taylor, W. R. (2005). SOD Isoforms and Signaling in Blood Vessels. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(5), 887-888. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000164043.24549.50>
- Méndez-Valdés, G., Pérez-Carreño, V., Bragato, M. C., Hundahl, M., Chichiarelli, S., Saso, L., & Rodrigo, R. (2022). Cardioprotective Mechanisms against Reperfusion Injury in Acute Myocardial Infarction: Targeting Angiotensin II Receptors. *Biomedicines*, 11(1), 17. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11010017>
- Mendis, S., Thygesen, K., Kuulasmaa, K., Giampaoli, S., Mähönen, M., Ngu Blackett, K., Lisheng, L., & Writing group on behalf of the participating experts of the WHO consultation for revision of WHO definition of myocardial infarction. (2011). World Health Organization definition of myocardial infarction: 2008–09 revision. *International Journal of Epidemiology*, 40(1), 139-146. <https://doi.org/10.1093/ije/dyq165>
- Michaelis, M., Michaelis, U. R., Fleming, I., Suhan, T., Cinatl, J., Blaheta, R. A., Hoffmann, K., Kotchekov, R., Busse, R., Nau, H., & Cinatl, J. (2004). Valproic

- acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Molecular Pharmacology*, 65(3), Article 3. <https://doi.org/10.1124/mol.65.3.520>
- Mirabito Colafella, K. M., Bovée, D. M., & Danser, A. H. J. (2019). The renin-angiotensin-aldosterone system and its therapeutic targets. *Experimental Eye Research*, 186, 107680. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.05.020>
- Moccia, F., Negri, S., Shekha, M., Faris, P., & Guerra, G. (2019). Endothelial Ca²⁺ Signaling, Angiogenesis and Vasculogenesis: Just What It Takes to Make a Blood Vessel. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16). <https://doi.org/10.3390/ijms20163962>
- Molek, P., Zmudski, P., Włodarczyk, A., Nessler, J., & Zalewski, J. (2021). The shifted balance of arginine metabolites in acute myocardial infarction patients and its clinical relevance. *Scientific Reports*, 11(1), 83. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80230-3>
- Mount, P. F., Kemp, B. E., & Power, D. A. (2007). Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42(2), 271-279. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.05.023>
- Murugavel, S., Bugyei-Twum, A., Matkar, P. N., Al-Mubarak, H., Chen, H. H., Adam, M., Jain, S., Narang, T., Abdin, R. M., Qadura, M., Connelly, K. A., Leong-Poi, H., & Singh, K. K. (2018). Valproic Acid Induces Endothelial-to-Mesenchymal Transition-Like Phenotypic Switching. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 737. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00737>
- Nural-Guvener, H. F., Zakharova, L., Nimlos, J., Popovic, S., Mastroeni, D., & Gaballa, M. A. (2014). HDAC class I inhibitor, Mocetinostat, reverses cardiac fibrosis in heart failure and diminishes CD90⁺ cardiac myofibroblast activation. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 7(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1755-1536-7-10>
- Oikonomidis, D. L., Tsalikakis, D. G., Baltogiannis, G. G., Tzallas, A. T., Xourgia, X., Agelaki, M. G., Megalou, A. J., Fotopoulos, A., Papalois, A., Kyriakides, Z. S., & Kolettis, T. M. (2010). Endothelin-B receptors and ventricular arrhythmogenesis in the rat model of acute myocardial infarction. *Basic Research in Cardiology*, 105(2), 235-245. <https://doi.org/10.1007/s00395-009-0066-7>
- Olesen, J. B., Hansen, P. R., Abildstrøm, S. Z., Andersson, C., Weeke, P., Schmiegelow, M., Erdal, J., Torp-Pedersen, C., & Gislason, G. H. (2011). Valproate attenuates the risk of myocardial infarction in patients with epilepsy: A nationwide cohort study. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 20(2), 146-153. <https://doi.org/10.1002/pds.2073>
- Ostrowski, S. R., Pedersen, S. H., Jensen, J. S., Mogelvang, R., & Johansson, P. I. (2013). Acute myocardial infarction is associated with endothelial glycocalyx and cell damage and a parallel increase in circulating catecholamines. *Critical Care*, 17(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/cc12532>

- Oz, O., Gökçil, Z., Bek, S., Cakir, E., & Odabaşı, Z. (2009). Is asymmetric dimethylarginine responsible for the vascular events in patients under antiepileptic drug treatment? *Epilepsy Research*, 87(1), 54-58. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2009.07.011>
- Ozdemir, O., Yakut, A., Dinleyici, E. C., Aydogdu, S. D., Yazar, C., & Colak, O. (2011). Serum asymmetric dimethylarginine (ADMA), homocysteine, vitamin B(12), folate levels, and lipid profiles in epileptic children treated with valproic acid. *European Journal of Pediatrics*, 170(7), 873-877. <https://doi.org/10.1007/s00431-010-1366-5>
- Palm, F., Onozato, M. L., Luo, Z., & Wilcox, C. S. (2007). Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): Expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 293(6), H3227-3245. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00998.2007>
- Park, J. H., Nho, K. J., Lee, J. Y., Yoo, Y. J., Park, W. J., Cho, C., & Kim, D. H. (2022). Anti-Ischemic Effects of PIK3IP1 Are Mediated through Its Interactions with the ETA-PI3K γ -AKT Axis. *Cells*, 11(14), 2162. <https://doi.org/10.3390/cells11142162>
- Parrish, D. C., Gritman, K., Van Winkle, D. M., Woodward, W. R., Bader, M., & Habecker, B. A. (2008). Postinfarct sympathetic hyperactivity differentially stimulates expression of tyrosine hydroxylase and norepinephrine transporter. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 294(1), H99-H106. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00533.2007>
- Pautz, A., Li, H., & Kleinert, H. (2021). Regulation of NOS expression in vascular diseases. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 26(5), Article 5. <https://doi.org/10.52586/4926>
- Peker, E., Oktar, S., Ari, M., Kozan, R., Doğan, M., Cağan, E., & Söğüt, S. (2009). Nitric oxide, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme levels in epileptic children using valproic acid. *Brain Research*, 1297, 194-197. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.08.048>
- Pernow, J., & Jung, C. (2013). Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: Reversal of arginine steal? *Cardiovascular Research*, 98(3), 334-343. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt036>
- Pickell, Z., Williams, A. M., Alam, H. B., & Hsu, C. H. (2020). Histone Deacetylase Inhibitors: A Novel Strategy for Neuroprotection and Cardioprotection Following Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of the American Heart Association*, 9(11), e016349. <https://doi.org/10.1161/JAHA.120.016349>
- Pillay-Fuentes Lorente, V., Van Rensburg, R., Cloete, D. A., Lahri, S., & Decloedt, E. H. (2020). Vasopressor therapy in atypical antipsychotic overdose. *South*

- African Medical Journal* = *Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde*, 110(10), 1003-1005. <https://doi.org/10.7196/SAMJ.2020.v110i10.14771>
- Poeggeler, B., Singh, S. K., Sambamurti, K., & Pappolla, M. A. (2023). Nitric Oxide as a Determinant of Human Longevity and Health Span. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19), 14533. <https://doi.org/10.3390/ijms241914533>
- Prabhu, S. D., & Frangogiannis, N. G. (2016). The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circulation research*, 119(1), 91-112. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303577>
- Quitter, F., Figulla, H. R., Ferrari, M., Pernow, J., & Jung, C. (2013). Increased arginase levels in heart failure represent a therapeutic target to rescue microvascular perfusion. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 54(1), 75-85. <https://doi.org/10.3233/CH-2012-1617>
- Rabadiya, S. O., & Dudhrejiya, A. (2019). *The multifaceted therapeutic potential of valproic acid beyond CNS axis*. 10.
- Radenković, M., Stojanović, M., Nešić, I. M., & Prostran, M. (2016). Angiotensin receptor blockers & endothelial dysfunction: Possible correlation & therapeutic implications. *The Indian Journal of Medical Research*, 144(2), 154-168. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.195022>
- Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., & Nishigaki, I. (2013). The Vascular Endothelium and Human Diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 9(10), 1057-1069. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7502>
- Rajeshwari, T., Raja, B., Manivannan, J., & Silambarasan, T. (2014). Valproic acid attenuates blood pressure, vascular remodeling and modulates ET-1 expression in L-NAME induced hypertensive rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4(2), 195-202. <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2013.09.002>
- Rawat, C., Kutum, R., Kukal, S., Srivastava, A., Dahiya, U. R., Kushwaha, S., Sharma, S., Dash, D., Saso, L., Srivastava, A. K., & Kukreti, R. (2020). Downregulation of peripheral PTGS2/COX-2 in response to valproate treatment in patients with epilepsy. *Scientific Reports*, 10, 2546. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59259-x>
- Rexhaj, E., Bloch, J., Jayet, P.-Y., Rimoldi, S. F., Dessen, P., Mathieu, C., Tolsa, J.-F., Nicod, P., Scherrer, U., & Sartori, C. (2011). Fetal programming of pulmonary vascular dysfunction in mice: Role of epigenetic mechanisms. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 301(1), H247-H252. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01309.2010>
- Richardson, W. J., Clarke, S. A., Quinn, T. A., & Holmes, J. W. (2015). Physiological Implications of Myocardial Scar Structure. En *Comprehensive Physiology* (pp. 1877-1909). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140067>

- Rizzacasa, B., Amati, F., Romeo, F., Novelli, G., & Mehta, J. L. (2019). Epigenetic Modification in Coronary Atherosclerosis: JACC Review Topic of the Week. *Journal of the American College of Cardiology*, 74(10), 1352-1365. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.07.043>
- Roumeliotis, S., Mallamaci, F., & Zoccali, C. (2020). Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease, from Biology to Clinical Outcomes: A 2020 Update. *Journal of Clinical Medicine*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/jcm9082359>
- Roy, R., Wilcox, J., Webb, A. J., & O’Gallagher, K. (2023). Dysfunctional and Dysregulated Nitric Oxide Synthases in Cardiovascular Disease: Mechanisms and Therapeutic Potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20), Article 20. <https://doi.org/10.3390/ijms242015200>
- Rucker, D., & Dhamoon, A. S. (2021). Physiology, Thromboxane A2. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539817/>
- Ruess, D. A., Probst, M., Marjanovic, G., Wittel, U. A., Hopt, U. T., Keck, T., & Bausch, D. (2016). HDACi Valproic Acid (VPA) and Suberoylanilide Hydroxamic Acid (SAHA) Delay but Fail to Protect against Warm Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury. *PloS One*, 11(8), e0161233. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161233>
- Russell, J. A., Gordon, A. C., Williams, M. D., Boyd, J. H., Walley, K. R., & Kissoon, N. (2021). Vasopressor Therapy in the Intensive Care Unit. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 42(1), 59-77. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1710320>
- Saenz-Medina, J., Muñoz, M., Rodriguez, C., Sanchez, A., Contreras, C., Carballido-Rodríguez, J., & Prieto, D. (2022). Endothelial Dysfunction: An Intermediate Clinical Feature between Urolithiasis and Cardiovascular Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 912. <https://doi.org/10.3390/ijms23020912>
- Sanada, S., Komuro, I., & Kitakaze, M. (2011). Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: Preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 301(5), H1723-1741. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00553.2011>
- Sanchez-Fernandez, E., Guerra-Ojeda, S., Suarez, A., Serna, E., & Mauricio, M. D. (2024). Histone Deacetylase Inhibitors as a Promising Treatment Against Myocardial Infarction: A Systematic Review. *Journal of Clinical Medicine*, 13(24), Article 24. <https://doi.org/10.3390/jcm13247797>
- Sartório, C. L., Pinto, V. D., Cutini, G. J. de S., Vassallo, D. V., & Stefanon, I. (2005). Effects of inducible nitric oxide synthase inhibition on the rat tail vascular bed reactivity three days after myocardium infarction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 45(4), Article 4. <https://doi.org/10.1097/01.fjc.0000156822.58081.be>

- Sereneri, G. G., Boddi, M., Cecioni, I., Vanni, S., Coppo, M., Papa, M. L., Bandinelli, B., Bertolozzi, I., Polidori, G., Toscano, T., Maccherini, M., & Modesti, P. A. (2001). Cardiac angiotensin II formation in the clinical course of heart failure and its relationship with left ventricular function. *Circulation Research*, 88(9), 961-968. <https://doi.org/10.1161/hh0901.089882>
- Serrano-Ponz, M., Rodrigo-Gasqué, C., Siles, E., Martínez-Lara, E., Ochoa-Callejero, L., & Martínez, A. (2016). Temporal profiles of blood pressure, circulating nitric oxide, and adrenomedullin as predictors of clinical outcome in acute ischemic stroke patients. *Molecular Medicine Reports*, 13(5), Article 5. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5001>
- Shah, A. K., Bhullar, S. K., Elimban, V., & Dhalla, N. S. (2021). Oxidative Stress as A Mechanism for Functional Alterations in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(6), 931. <https://doi.org/10.3390/antiox10060931>
- Sharma, B., & Sharma, P. M. (2013). Arsenic toxicity induced endothelial dysfunction and dementia: Pharmacological interdiction by histone deacetylase and inducible nitric oxide synthase inhibitors. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 273(1), 180-188. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.07.017>
- Shi, X., Liu, Y., Zhang, D., & Xiao, D. (2019). Valproic acid attenuates sepsis-induced myocardial dysfunction in rats by accelerating autophagy through the PTEN/AKT/mTOR pathway. *Life Sciences*, 232, 116613. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116613>
- Smiljic, S. (2017). The clinical significance of endocardial endothelial dysfunction. *Medicina*, 53(5), 295-302. <https://doi.org/10.1016/j.medici.2017.08.003>
- Soria-Castro, R., Schcolnik-Cabrera, A., Rodríguez-López, G., Campillo-Navarro, M., Puebla-Osorio, N., Estrada-Parra, S., Estrada-García, I., Chacón-Salinas, R., & Chávez-Blanco, A. D. (2019a). Exploring the Drug Repurposing Versatility of Valproic Acid as a Multifunctional Regulator of Innate and Adaptive Immune Cells. *Journal of Immunology Research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9678098>
- Soria-Castro, R., Schcolnik-Cabrera, A., Rodríguez-López, G., Campillo-Navarro, M., Puebla-Osorio, N., Estrada-Parra, S., Estrada-García, I., Chacón-Salinas, R., & Chávez-Blanco, A. D. (2019b). Exploring the Drug Repurposing Versatility of Valproic Acid as a Multifunctional Regulator of Innate and Adaptive Immune Cells. *Journal of Immunology Research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9678098>
- Spieker, L. E., Noll, G., & Lüscher, T. F. (2001). Therapeutic Potential for Endothelin Receptor Antagonists in Cardiovascular Disorders. *American Journal of Cardiovascular Drugs*, 1(4), 293-303. <https://doi.org/10.2165/00129784-200101040-00007>

- Stratton, M. S., & McKinsey, T. A. (2016). Epigenetic regulation of cardiac fibrosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 92, 206-213. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2016.02.011>
- Stuehr, D. J., & Haque, M. M. (2019). Nitric oxide synthase enzymology in the 20 years after the Nobel Prize. *British Journal of Pharmacology*, 176(2), 177-188. <https://doi.org/10.1111/bph.14533>
- Suda, S., Katsura, K., Kanamaru, T., Saito, M., & Katayama, Y. (2013). Valproic acid attenuates ischemia-reperfusion injury in the rat brain through inhibition of oxidative stress and inflammation. *European Journal of Pharmacology*, 707(1-3), 26-31. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.03.020>
- Sun, Y. (2010). Intracardiac renin-angiotensin system and myocardial repair/remodeling following infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(3), 483-489. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.08.002>
- Szabó, P. L., Dostal, C., Pilz, P. M., Hamza, O., Acar, E., Watzinger, S., Mathew, S., Kager, G., Hallström, S., Podesser, B. K., & Kiss, A. (2021). Remote Ischemic Perconditioning Ameliorates Myocardial Ischemia and Reperfusion-Induced Coronary Endothelial Dysfunction and Aortic Stiffness in Rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 26(6), 702-713. <https://doi.org/10.1177/10742484211031327>
- TAN, M.-Y., XIA, B., XIAO, Z., FAN, Z.-W., ZHOU, H., GUO, X., & HUANG, Y.-C. (2017). Development of a new model for acute myocardial infarction in rabbits. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 79(3), 467-473. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0114>
- Tang, J., & Zhuang, S. (2019). Histone acetylation and DNA methylation in ischemia/reperfusion injury. *Clinical science (London, England : 1979)*, 133(4), 597-609. <https://doi.org/10.1042/CS20180465>
- Teerlink, J. R., Clozel, M., Fischli, W., & Clozel, J. P. (1993). Temporal evolution of endothelial dysfunction in a rat model of chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 22(2), 615-620. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(93\)90073-a](https://doi.org/10.1016/0735-1097(93)90073-a)
- Thorin, E., & Webb, D. J. (2010). Endothelium-derived endothelin-1. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 459(6), 951-958. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0763-y>
- Tian, S., Lei, I., Gao, W., Liu, L., Guo, Y., Creech, J., Herron, T. J., Xian, S., Ma, P. X., Eugene Chen, Y., Li, Y., Alam, H. B., & Wang, Z. (2019a). HDAC inhibitor valproic acid protects heart function through Foxm1 pathway after acute myocardial infarction. *EBioMedicine*, 39, 83-94. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.12.003>
- Tian, S., Lei, I., Gao, W., Liu, L., Guo, Y., Creech, J., Herron, T. J., Xian, S., Ma, P. X., Eugene Chen, Y., Li, Y., Alam, H. B., & Wang, Z. (2019b). HDAC inhibitor

- valproic acid protects heart function through Foxm1 pathway after acute myocardial infarction. *EBioMedicine*, 39, 83-94. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.12.003>
- Tratsiakovich, Y., Gonon, A. T., Krook, A., Yang, J., Shemyakin, A., Sjöquist, P.-O., & Pernow, J. (2013a). Arginase inhibition reduces infarct size via nitric oxide, protein kinase C epsilon and mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels. *European Journal of Pharmacology*, 712(1-3), 16-21. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.04.044>
- Tratsiakovich, Y., Gonon, A. T., Krook, A., Yang, J., Shemyakin, A., Sjöquist, P.-O., & Pernow, J. (2013b). Arginase inhibition reduces infarct size via nitric oxide, protein kinase C epsilon and mitochondrial ATP-dependent K⁺ channels. *European Journal of Pharmacology*, 712(1-3), Article 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.04.044>
- Triebel, H., & Castrop, H. (2024). The renin angiotensin aldosterone system. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1007/s00424-024-02908-1>
- Tripodiadis, F., Xanthopoulos, A., Skoularigis, J., & Starling, R. C. (2022). Therapeutic augmentation of NO-sGC-cGMP signalling: Lessons learned from pulmonary arterial hypertension and heart failure. *Heart Failure Reviews*, 27(6), 1991-2003. <https://doi.org/10.1007/s10741-022-10239-5>
- Uriel, N., Sayer, G., Annamalai, S., Kapur, N. K., & Burkhoff, D. (2018). Mechanical Unloading in Heart Failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 72(5), 569-580. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.038>
- Valkonen, V.-P., & Laaksonen, R. (2004). Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and acute vascular events. *Clinica Chimica Acta*, 348(1), 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.05.020>
- Vanhoutte, P. M., & Miller, V. M. (1989). Alpha 2-adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. *The American Journal of Medicine*, 87(3C), 1S-5S. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(89\)90496-8](https://doi.org/10.1016/0002-9343(89)90496-8)
- Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Feletou, M., & Tang, E. H. C. (2017). Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. *Acta Physiologica*, 219(1), 22-96. <https://doi.org/10.1111/apha.12646>
- Vargas Vargas, R. A., Varela Millán, J. M., & Fajardo Bonilla, E. (2022). Renin-angiotensin system: Basic and clinical aspects—A general perspective. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición (English Ed.)*, 69(1), 52-62. <https://doi.org/10.1016/j.endien.2022.01.005>
- Vázquez-Oliva, G., Zamora, A., Ramos, R., Martí, R., Subirana, I., Grau, M., Dégano, I. R., Marrugat, J., & Elosua, R. (2018). Tasas de incidencia y mortalidad, y letalidad poblacional a 28 días del infarto agudo de miocardio en

- adultos mayores. Estudio REGICOR. *Revista Española de Cardiología*, 71(9), 718-725. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2017.10.019>
- Vrankova, S., Zemancikova, A., Torok, J., & Pechanova, O. (2019). Effect of low dose L-NAME pretreatment on nitric oxide/reactive oxygen species balance and vasoactivity in L-NAME/salt-induced hypertensive rats. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 70(4). <https://doi.org/10.26402/jpp.2019.4.05>
- Wahba, A., & Bergez, E. (2020). Severe Pancytopenia Induced by Valproic Acid. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.11252>
- Wang, S. Y. (2000). Vasoconstrictive versus Vasodilatory Effects of Alpha-2 Adrenergic Agonists on the Spinal Microcirculation. *Anesthesiology*, 92(5), 1488. <https://doi.org/10.1097/00000542-200005000-00043>
- Wang, Z., Li, S., Lai, H., Zhou, L., Meng, G., Wang, M., Lai, Y., Wang, Z., Chen, H., Zhou, X., & Jiang, H. (2019). Interaction between Endothelin-1 and Left Stellate Ganglion Activation: A Potential Mechanism of Malignant Ventricular Arrhythmia during Myocardial Ischemia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 6508328. <https://doi.org/10.1155/2019/6508328>
- Widmer, R. J., & Lerman, A. (2014). Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Global Cardiology Science & Practice*, 2014(3), 291-308. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2014.43>
- Won, K. J., Jung, S. H., Jung, S. H., Lee, K. P., Lee, H. M., Lee, D.-Y., Park, E.-S., Kim, J., & Kim, B. (2014). DJ-1/park7 modulates vasorelaxation and blood pressure via epigenetic modification of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovascular Research*, 101(3), 473-481. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt274>
- Wong, S. L., Leung, F. P., Lau, C. W., Au, C. L., Yung, L. M., Yao, X., Chen, Z.-Y., Vanhoutte, P. M., Gollasch, M., & Huang, Y. (2009). Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin F2 α mediates endothelium-dependent contractions in the aortae of hamsters with increased impact during aging. *Circulation Research*, 104(2), 228-235. Scopus. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.179770>
- Wu, H., Ding, J., Wang, L., Lin, J., Li, S., Xiang, G., Jiang, L., Xu, H., Gao, W., & Zhou, K. (2018). Valproic acid enhances the viability of random pattern skin flaps: Involvement of enhancing angiogenesis and inhibiting oxidative stress and apoptosis. *Drug Design, Development and Therapy*, 12, 3951-3960. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S186222>
- Wu, S.-Y., Tang, S.-E., Ko, F.-C., Wu, G.-C., Huang, K.-L., & Chu, S.-J. (2015). Valproic Acid Attenuates Acute Lung Injury Induced by Ischemia-Reperfusion in Rats. *Anesthesiology*, 122(6), 1327-1337. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000618>

- Wu, X., Rebooll, M. R., Korf-Klingebiel, M., & Wollert, K. C. (2021). Angiogenesis after acute myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 117(5), 1257-1273. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvaa287>
- Wu, Y., Yin, X., Wijaya, C., Huang, M.-H., & McConnell, B. K. (2011). Acute myocardial infarction in rats. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 48. <https://doi.org/10.3791/2464>
- Xie, Z., Ago, Y., Okada, N., & Tachibana, M. (2018). Valproic acid attenuates immunosuppressive function of myeloid-derived suppressor cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 137(4), 359-365. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2018.06.014>
- Xu, W., Kaneko, F. T., Zheng, S., Comhair, S. A. A., Janocha, A. J., Goggans, T., Thunnissen, F. B. J. M., Farver, C., Hazen, S. L., Jennings, C., Dweik, R. A., Arroliga, A. C., & Erzurum, S. C. (2004). Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(14), 1746-1748. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2317fje>
- Yang, M., Zhang, Y., & Ren, J. (2020). Acetylation in cardiovascular diseases: Molecular mechanisms and clinical implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(10), 165836. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165836>
- Yang, Z., Li, J., Kong, J., & Wu, S. (2013). Impairment of vascular endothelial function following reperfusion therapy in patients with acute myocardial infarction. *The Journal of International Medical Research*, 41(4), 1074-1078. <https://doi.org/10.1177/0300060513487650>
- Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2007). Myocardial reperfusion injury. *The New England Journal of Medicine*, 357(11), 1121-1135. <https://doi.org/10.1056/NEJMra071667>
- Yin, Y., Han, W., & Cao, Y. (2019). Association between activities of SOD, MDA and Na⁺-K⁺-ATPase in peripheral blood of patients with acute myocardial infarction and the complication of varying degrees of arrhythmia. *Hellenic Journal of Cardiology*, 60(6), 366-371. <https://doi.org/10.1016/j.hjc.2018.04.003>
- Yoon, S., Kang, G., & Eom, G. H. (2019). HDAC Inhibitors: Therapeutic Potential in Fibrosis-Associated Human Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061329>
- Yoon, Y., Song, J., Hong, S. H., & Kim, J. Q. (2000). Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. *Clinical Chemistry*, 46(10), Article 10.
- Zhang, L., Wang, H., Zhao, Y., Wang, J., Dubielecka, P. M., Zhuang, S., Qin, G., Chin, Y. E., Kao, R. L., & Zhao, T. C. (2018). Myocyte-specific overexpressing

- HDAC4 promotes myocardial ischemia/reperfusion injury. *Molecular Medicine*, 24. <https://doi.org/10.1186/s10020-018-0037-2>
- Zhang, X., Ye, Y., Yang, C., Gong, H., Li, Y., Zhang, G., Yuan, J., & Zou, Y. (2018). Clinical Significance of Elevated Urotensin II Levels in Acute Myocardial Infarction. *Discovery Medicine*, 26(141), 7-20.
- Zhao, W., Zhao, L., Guo, Z., Hou, Y., Jiang, J., & Song, Y. (2020). Valproate Sodium Protects Blood Brain Barrier Integrity in Intracerebral Hemorrhage Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8884320>
- Zhao, Y. B., Wang, Y. Z., Yue, Y. H., Zhao, W. C., & Feng, G. X. (2015). Variation of plasma levels of endothelin, calcitonin gene-related peptide, nitric oxide, and malondialdehyde in acute myocardial ischemia reperfusion injury in a rabbit model. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 14(2), 5577-5584. <https://doi.org/10.4238/2015.May.25.9>
- Zhou, H., Wang, N., Xu, L., Huang, H.-L., & Yu, C.-Y. (2017). Clinical study on anti-epileptic drug with B vitamins for the treatment of epilepsy after stroke. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 21(14), 3327-3331.
- Zuber, S. M., Kantorovich, V., & Pacak, K. (2011). Hypertension in Pheochromocytoma: Characteristics and Treatment. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 40(2), 295-311. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2011.02.002>
- Zuchi, C., Tritto, I., Carluccio, E., Mattei, C., Cattadori, G., & Ambrosio, G. (2020). Role of endothelial dysfunction in heart failure. *Heart Failure Reviews*, 25(1), 21-30. <https://doi.org/10.1007/s10741-019-09881-3>
- Zuo, H., Cui, S., Wang, K., Wu, X., Zhou, J., Qu, Q., Tong, Y., Wu, S., & Zhou, M. (2022). Electroacupuncture Ameliorates Acute Myocardial Ischemic Injury and Long QT Interval in Mice through the $\alpha 1A$ -Adrenergic Receptor: Electrophysiological, Morphological, and Molecular Evidence. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 1984706. <https://doi.org/10.1155/2022/1984706>