



**DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGÍA Y ZOOLOGÍA**

**EFECTO CARDIOPROTECTOR DE LA L-CARNITINA
EN LAS RATAS HIPERTENSAS**

Memoria que presenta

JOSÉ LUÍS MIGUEL CARRASCO

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla

Directores

ALFONSO MATE BARRERO

CARMEN MARÍA VÁZQUEZ CUETO

Sevilla, 2009

ALFONSO MATE BARRERO, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Fisiología y Zoología de la Universidad de Sevilla y CARMEN MARÍA VÁZQUEZ CUETO, Profesora Titular del Departamento de Fisiología y Zoología de la Universidad de Sevilla,

INFORMAN

Que la Tesis titulada *Efecto cardioprotector de la L-carnitina en las ratas hipertensas*, presentada por el Ldo. JOSÉ LUÍS MIGUEL CARRASCO para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología y Zoología de la Universidad de Sevilla y, considerándola concluida, autorizan su presentación a fin de que pueda ser defendida ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firman la presente en Sevilla, a 11 de Diciembre de 2008.

Fdo.: Dr. Alfonso Mate Barrero
Cueto

Fdo.: Dra. Carmen María Vázquez

Este trabajo ha sido subvencionado por la ayuda FIS PI051026 del *Fondo de Investigación Sanitaria*, Ministerio de Sanidad y Consumo.

Durante su realización, el autor ha disfrutado de contratos de apoyo de personal de investigación subvencionados por la Junta de Andalucía (CTS 257 y CTS 584).

Parte de los resultados obtenidos en esta memoria han dado lugar a las siguientes publicaciones:

- **Miguel-Carrasco JL, Mate A, Vazquez CM:** L-Carnitina Disminuye la Producción de Anión Superóxido en las Ratas Hipertensas. *Hipertension*. 2006. Pag. 92-92
- **Miguel-Carrasco JL, Monserrat MT, Mate A, Arias JL, Aramburu O, Vazquez CM:** Papel del Estrés Oxidativo en el Efecto Hipotensor de la L-Carnitina. *Hipertension*. 2007. Pag. 26-27
- **Gómez-Amores L, Mate A, Miguel-Carrasco JL, Jiménez L, Jos A, Cameán AM, Revilla E, Santa-María C, Vázquez CM** (2008). L-carnitine attenuates oxidative stress un hypertensive rats. *J Nutr Biochem*. 28 (8): 533-540.
- **Mate A, Miguel-Carrasco JL, Monserrat MT, Arias JL, Aramburu O, Vazquez CM:** Antioxidant Enzymes and Effects of L-Carnitine in L-Name-Induced Hypertension. *Acta Physiologica*. 2007. Pag.52-52
- **Monserrat MT, Miguel-Carrasco JL, Mate A, Arias JL, Aramburu O, Vazquez CM:** Antihypertensive Effect of L-Carnitine. *Journal of Hypertension*. Vol. 25 (2) 2007
- **Miguel-Carrasco JL, Mate A, Monserrat MT, Arias JL, Aramburu O, Vázquez CM** (2008). The role of inflammatory markers in the cardioprotective effect of L-carnitine in L-NAME induced hypertension. *Am J. Hypertens*. 21(11): 1231-1237.
- **Aramburu O, Miguel-Carrasco JL, Mate A, Monserrat MT, Arias JL, Vázquez CM:** Papel del Sistema Renina-Angiotensina en el Efecto Antiinflamatorio y Cardioprotector de la L-Carnitina en la Hipertensión Arterial. *Rev Clin ESP*. 2008. Pag. 1-1.
- **Miguel-Carrasco JL, Mate A, Monserrat MT, Arias JL, Aramburu O, Vázquez CM:** Effects of L-Carnitine on the Regulation of Antioxidant Enzymes in the Heart of Rats With Hypertension Induced By Nitric Oxide Deficiency. *Journal of Hypertension*. 2008
- **Miguel-Carrasco JL, Mate A, Monserrat MT, Arias JL, Aramburu O, Vázquez CM:** Efecto Cardioprotector y Antiinflamatorio de la L-Carnitina en la Hipertensión Arterial. *Hipertension*. 2008. Pag. 228-229

Y a la patente:

- **Alfonso Mate Barrero, Carmen Maria Vazquez Cueto, Jose Luis Miguel Carrasco, Lucia Gómez Amores.** Uso de la L-Carnitina para el Tratamiento de la Hipertensión Arterial, Solicitud: 2007-04-19 00:00:00, Nr.:P200701091.

A mi madre y a mi padre

Quisiera aprovechar estas primeras líneas para expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que, de un modo u otro, han contribuido a la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar quisiera tener una mención especial con mis directores de tesis, Carmen Vázquez y Alfonso Mate, por su dedicación, esfuerzo y tiempo extraído de sus obligaciones para la elaboración de este trabajo, tanto en la investigación realizada como en el desarrollo de esta memoria.

Gracias Carmen por acogerme en tu grupo de investigación, por saberme transmitir tu pasión por la investigación, por tu enorme esfuerzo en mejorar mis condiciones de trabajo, y por tantas y tantas cosas que serían imposibles enumerar en unas pocas palabras. Tus oportunas observaciones siempre han hecho surgir en mí nuevas preguntas, reflexiones e ideas.

Gracias Alfonso, porque siempre te he tenido al lado para afrontar cualquier problema, por ayudarme a encontrar la clave de mis dificultades, por estar siempre disponible, por el afecto que siempre me has demostrado, por tu atención y tus consejos.

Muchas gracias a los dos porque estos últimos cuatro años a vuestro lado me han servido para crecer tanto intelectual como personalmente.

Quisiera agradecer también:

A Juan Mellado, por ser mi amigo en el laboratorio. Espero que en esta nueva etapa que inicias todo te vaya tal y como esperas; te lo mereces.

A la próxima Dra. M^a José por su apoyo y comprensión, sobre todo en este último periodo donde hemos coincidido en la escritura de nuestras tesis.

A los Dres. Ana Ilundain, M^a José Delgado, M^a Luisa Calonge, Olimpia Carreras, M^a Luisa Murillo, Pedro Núñez, Mercedes Cano, M^a José Peral, M^a Luisa Ojeda, Livia Carrascal, Fátima Nogales y Pablo García por crear un inmejorable ambiente de trabajo en el departamento.

A las Dras. M^a Ángeles y Anabel, del departamento de Toxicología, por su colaboración en la determinación de las enzimas antioxidantes.

A Sebastián, Manolo y Cristina del Departamento de Bioquímica, por su inestimable ayuda en las técnicas de Biología Molecular.

A mis padres, porque me lo han dado todo. Ellos son la piedra sobre la que he apoyado todo este trabajo. Gracias por el apoyo día a día, por vuestra paciencia y comprensión, por brindarme un hogar cálido y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr los objetivos. Gracias mamá por tus ánimos, sobre todo en esta última etapa, que me daban el impulso necesario para continuar.

A mis hermanos Mónica y Adrián y a mi abuela Trini, por saber que puedo contar con ellos siempre, por estar a mi lado y brindarme ánimo, apoyo y alegría.

A mis amigos por ayudarme a crecer y por darme muchos días felices y llenos de risas.

A mi abuelo Antonio, por sentirlo en todo momento a mi lado. Seguro hubiera estado muy orgulloso en estos momentos.

ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$: oxígeno singulete

4-AA: 4-aminoantipirina

4-AF: 4-aminofenazona

AACT: translocasa de acilcarnitina/carnitina

AAPH: ácido 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro

ACE: enzima convertidora de angiotensina

ACTH: adrenocorticotropa

ADP: adenina difosfato

Ang II: angiotensina II

AP-1: proteína activadora 1

APS: persulfato de amonio

ARA II: antagonistas de los receptores de angiotensina II

AT-1: receptor tipo 1 de la angiotensina II

AT-2: receptor tipo 2 de la angiotensina II

ATP: adenina trifosfato

ATP: adenina tri-fosfato

BBD: γ -butirotbetaína dioxigenasa

BH₄: tetrahidrobiopterina

BHT: butilhidroxitolueno

BSA: albúmina

CAT: catalasa

CHE: enzima colesterol esterasa

CHO: enzima colesterol oxidasa

CI: cardiopatía isquémica

CoA: coenzima A

CPT I: carnitina palmitoil transferasa I
CPT II: carnitina palmitoil transferasa II
CTGF: factor de crecimiento de tejido conectivo
CV: cardiovascular
DEPC: dietilpirocarbonato
DTNB: ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico
eNOS: óxido nítrico sintetasa endotelial
ERK $\frac{1}{2}$: proteína quinasa reguladora de señal $\frac{1}{2}$
FA: fibrilación auricular
FAD: flavín adenín dinucleótido
FATP: proteína transportadora de ácidos grasos
FSH: factor estimulante de hepatocitos
G-3-P: glicerol 3-fosfato
G6P: glucosa 6 fosfato
G6PDH: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
GAPDH: gliceraldehido fosfato deshidrogenasa
GK: glicerol quinasa
GPO: glicerolfosfato deshidrogenasa
GPx: glutatión peroxidasa
GR: glutatión reductasa
GSH: glutatión reducido
GSSG: glutatión oxidado
H₂O₂: peróxido de hidrógeno
Hb: hemoglobina
HIF-1: factor inducible por hipoxia 1

HOCl: ácido hipocloroso
HTA: hipertensión arterial
HTML: 3-hidroxi-N-trimetil-lisina
HTMLA: 3-hidroxi-N-trimetil-lisina aldolasa
HVI: hipertrofia ventricular izquierda
IC: insuficiencia cardiaca
ICAM: molécula de adhesión intercelular
IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
IGFR: receptor del factor de crecimiento sensible a insulina
IL-1 β : interleucina 1 β
IL-6: interleucina 6
I κ B: inhibidor κ B
KCN: cianuro potásico
LC: L-carnitina
L-NAME: N^o-nitro-L-arginina metil éster
LOS: lesión orgánica subclínica
LPL: lipoproteín lipasa
MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos
MDA: malondialdehido
MMP: metaloproteinasas de la matriz
MPA: ácido metafosfórico
NADPH: nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido
NADP⁺: nicotinamín adenín dinucleótido fosfato
NEDDC: N-1-naftiletlenodiamida dihidrocloro
NF- κ B: factor de activación nuclear κ B
NO: óxido nítrico
NOX: NADPH oxidasa

O_2^- : anión superóxido

OCTN₂: *novel organic cation transporter*

OH·: radical hidroxilo

OMS: organización mundial de la salud

OONO⁻: anión peroxinitrito

ORAC-FL: capacidad de absorbanca de los radicales de oxígeno usando fluoresceína

PA: presión arterial

PAD: presión arterial diastólica

PAF: factor activador de plaquetas

PAI-1: inhibidor del activador tisular del plasminógeno

PAS: presión arterial sistólica

PCR: proteína C reactiva

PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de plaqueta

PI3K: fosfatidil inositol 3-quinasa

PKC: proteína quinasa C

PLA₂: fosfolipasa A₂

PLC: propionil L-carnitina

PLD: fosfolipasa D

PTK: proteína tirosina quinasa

ROOH: peróxidos orgánicos

ROO·: radical peroxilo

ROS: *reactive oxygen species*

RVP: resistencias vasculares periféricas

SDS: dodecil sulfato de sodio

SHR: *spontaneously hypertensive rats*

SM: síndrome metabólico

SOD: superóxido dismutasa
SRA: sistema renina-angiotensina
TBA: ácido tiobarbitúrico
TBST: solución de lavado
TBST-M: solución de bloqueo
TEMED: N,N,N,N'- tetrametil etileno diamina
TMABA: 4-trimetil-amonio-butiraldehido
TMABADH: 4-trimetil-amonio-butiraldehido deshidrogenasa
TMB: tetrametilbenzidina
TML: N-trimetil-lisina
TMLD: N-trimetil-lisina dioxigenasa
TMP: 1,1,3,3-tetrametoxipropano
TNF- α : factor de necrosis tumoral α
Trolox: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
VCAM: molécula de adhesión de célula vascular
VI: ventrículo izquierdo
VM: volumen minuto cardiaco
WKY: *Wistar-Kyoto rats*
WLN: ratas wistar tratadas con L-carnitina
WLN: ratas wistar tratadas con L-NAME
WLNLC: ratas wistar tratadas con L-NAME y L-carnitina
XOD: xantina oxidasa

<u>ÍNDICE DE FIGURAS</u>	IX
<u>ÍNDICE DE TABLAS</u>	XVI
1. <u>OBJETIVOS</u>	1
2. <u>INTRODUCCIÓN</u>	7
2.1. <u>L-CARNITINA</u>	9
2.1.1. Funciones fisiológicas.....	9
2.1.2. Metabolismo	14
2.1.3. Deficiencias.....	16
2.1.3.1. Deficiencia primaria de carnitina.....	16
2.1.3.2. Deficiencia secundaria de carnitina	18
2.1.3.3. Deficiencia de carnitina palmitoil transferasa.....	18
2.1.4. Aplicaciones clínicas	19
2.2. <u>ESTRÉS OXIDATIVO</u>	21
2.2.1. Daño oxidativo.....	21
2.2.2. Consecuencias del estrés oxidativo.....	25
2.2.3. Mecanismos de defensa antioxidante.....	27
2.2.3.1. Antioxidantes enzimáticos	27
2.2.3.2. Antioxidantes no enzimáticos	30
2.3. <u>INFLAMACIÓN</u>	32

2.3.1. Definición	32
2.3.2. Inflamación aguda.....	33
2.3.3. Inflamación crónica	34
2.3.4. Mediadores de la inflamación.....	35
2.3.5. Factor de activación nuclear (NF-κB).....	39
2.4. <u>HIPERTENSIÓN ARTERIAL Y DAÑO CARDIACO ASOCIADO</u>	40
2.4.1. Definición de Hipertensión arterial (HTA).....	40
2.4.2. Órganos diana de la HTA	47
2.4.3. Estrés oxidativo e inflamación en la fisiopatología del daño cardiaco asociado a la HTA	48
2.5. <u>PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTIINFLAMATORIAS DE LA L-CARNITINA</u>	62
3. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	69
3.1. <u>ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y TRATAMIENTOS</u>	71
3.2. <u>PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS</u>	72
3.3. <u>CONTROLES DE PESO, VOLUMEN DE INGESTA LÍQUIDA Y PRESIÓN ARTERIAL</u>	78
3.4. <u>OBTENCIÓN DE SANGRE HEPARINIZADA Y PLASMA</u>	79
3.5. <u>OBTENCIÓN DEL CORAZÓN</u>	80
3.6. <u>DETERMINACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO</u>	81

3.6.1. Determinación de colesterol total en plasma	81
3.6.2. Determinación de triglicéridos en plasma.....	83
<u>3.7. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA L-CARNITINA EN ERITROCITOS</u>	<u>85</u>
3.7.1. Determinación de hemoglobina	85
3.7.2. Determinación de la actividad glutathion peroxidasa en eritrocitos.....	87
3.7.3. Determinación de la actividad glutathion reductasa en eritrocitos	89
3.7.4. Determinación de la actividad superóxido dismutasa en eritrocitos.....	92
3.7.5. Determinación de la relación GSH/GSSG en sangre heparinizada	95
<u>3.8. DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) EN PLASMA.....</u>	<u>98</u>
<u>3.9. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN PLASMA</u>	<u>100</u>
<u>3.10. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA L-CARNITINA EN CORAZÓN.....</u>	<u>104</u>
3.10.1. Homogeneización del corazón.....	104
3.10.2. Determinación de la concentración de proteínas en homogeneizados de corazón	105

3.10.3. Determinación de la actividad GPx en homogeneizados de corazón ...	105
3.10.4. Determinación de la actividad GR en homogeneizados de corazón.....	106
3.10.5. Determinación de la actividad SOD en homogeneizados de corazón ..	106
3.10.6. Determinación de la relación GSH/GSSG en homogeneizados de corazón.....	106
3.10.7. Determinación de la Peroxidación lipídica en homogeneizados de corazón.....	107
3.10.8. Determinación de la cantidad de NO en homogeneizados de corazón.	109
3.10.9. Análisis de los niveles de proteínas por <i>Western Blotting</i> de las enzimas antioxidantes, y eNOS en corazón.....	110
3.10.9.1. Fundamento del <i>Western Blotting</i>	110
3.10.9.2. Preparación de las muestras.....	111
3.10.9.3. Electroforesis.....	112
3.10.9.4. Transferencia.....	115
3.10.9.5. Inmunodetección.....	116
3.10.10. Estudio de la expresión del ARNm de las enzimas antioxidantes, eNOS y p22phox en corazón.....	119
3.10.10.1. Extracción de ARN total.....	119
3.10.10.2. Fundamento de la extracción de ARN.....	120

3.10.10.3. Preparación el gel de agarosa al 2 %	124
3.10.10.4. Retrotranscripción.....	125
3.10.10.5. PCR en tiempo real	129
3.11. <u>ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LA L-CARNITINA EN CORAZÓN</u>	137
3.11.1. Estudio de la actividad plasmática de los marcadores inflamatorios... 137	
3.11.1.1. Actividad plasmática del marcador inflamatorio TNF- α	137
3.11.1.2. Actividad plasmática del marcador inflamatorio IL-1 β	138
3.11.1.3. Actividad plasmática del marcador inflamatorio IL-6.....	140
3.11.2. Estudio de la expresión del ARNm de los marcadores inflamatorios y del sistema NF- κ B/I κ B en corazón.....	141
3.12. <u>VALORACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA (SRA)</u> ...	142
3.12.1. Estudio de la expresión del ARNm de ACE y AT-1 en corazón.....	142
3.13. <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u>	142
4. <u>RESULTADOS</u>	145
4.1. <u>CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANIMALES</u>	147
4.1.1. Peso corporal.....	147
4.1.2. Peso corazón/peso corporal.....	147
4.1.3. Presión sanguínea.....	148
4.2. <u>PERFIL LIPÍDICO</u>	152

4.2.1. Colesterol total	152
4.2.2. Triglicéridos totales	153
<u>4.3. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA L-CARNITINA</u>	154
4.3.1. Estado antioxidante total.....	154
4.3.2. Niveles de óxido nítrico	156
4.3.3. Enzimas antioxidantes en eritrocitos	158
4.3.3.1. Glutation peroxidasa en eritrocitos	158
4.3.3.2. Glutation reductasa en eritrocitos	159
4.3.3.3. Superóxido dismutasa en eritrocitos	159
4.3.3.4. Relación GSH/GSSG en sangre heparinizada	160
4.3.4. Enzimas antioxidantes en corazón.....	162
4.3.4.1. Glutation peroxidasa en homogeneizados de corazón	162
4.3.4.2. Glutation reductasa en homogeneizados de corazón	163
4.3.4.3. Superóxido dismutasa en homogeneizados de corazón	164
4.3.4.4. Relación GSH/GSSG en homogeneizados de corazón.....	165
4.3.5. Expresión proteica relativa de las enzimas antioxidantes y eNOS en corazón.....	166
4.3.5.1. <i>Western Blotting</i> de glutacion peroxidasa	167
4.3.5.2. <i>Western Blotting</i> de glutacion reductasa	168
4.3.5.3. <i>Western Blotting</i> de superóxido dismutasa	169

4.3.5.4. Western Blotting de eNOS.....	170
4.3.6. Expresión relativa de ARNm de las enzimas antioxidantes, eNOS y p22phox en corazón	171
4.3.6.1. RT-PCR en tiempo real de glutathion peroxidasa	171
4.3.6.2. RT-PCR en tiempo real de glutathion reductasa.....	172
4.3.6.3. RT-PCR en tiempo real de superóxido dismutasa	173
4.3.6.4. RT-PCR en tiempo real de eNOS	174
4.3.6.5. RT-PCR en tiempo real de p22phox.....	175
<u>4.4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LA L-CARNITINA.....</u>	<u>176</u>
4.4.1. Actividad plasmática de los marcadores inflamatorios	176
4.4.1.1. Niveles plasmáticos de IL-1 β	176
4.4.1.2. Niveles plasmáticos de IL-6.....	176
4.4.1.3. Niveles plasmáticos de TNF- α	178
4.4.2. Expresión relativa de ARNm de los marcadores inflamatorios, NF- κ B e I κ B en corazón.....	179
4.4.2.1. Expresión relativa de ARNm de IL-1 β	179
4.4.2.2. Expresión relativa de ARNm de IL-6	180
4.4.2.3. Expresión relativa de ARNm de TNF- α	181
4.4.2.4. Expresión relativa de ARNm de NF- κ B	182
4.4.2.5. Expresión relativa de ARNm de I κ B	182

4.5. <u>VALORACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA</u>	183
4.5.1. Expresión relativa de ARNm de ACE en corazón.....	184
4.5.2. Expresión relativa de ARNm de AT-1 en corazón	185
5. <u>DISCUSIÓN</u>	187
5.1. <u>CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANIMALES</u>	191
5.2. <u>PERFIL LIPÍDICO</u>	193
5.3. <u>CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA L-CARNITINA EN EL TEJIDO CARDIACO Y A NIVEL SISTÉMICO</u>	193
5.4. <u>CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LA L-CARNITINA EN EL TEJIDO CARDIACO</u>	199
5.5. <u>IMPLICACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA Y DEL SISTEMA NF-κB/IκB EN EL PAPEL CARDIOPROTECTOR DE LA L- CARNITINA</u>	201
6. <u>CONCLUSIONES</u>	205
7. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	211

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Estructura química de la L-carnitina	9
Figura 2.2. Transporte de los ácidos grasos al interior de la mitocondria	10
Figura 2.3. Fracciones de carnitina	15
Figura 2.4. Especies reactivas del oxígeno (ROS)	22
Figura 2.5. Esquema general de la inflamación/reparación	34
Figura 2.6. Mediadores de la respuesta inflamatoria local y sistémica	36
Figura 2.7. Posibles combinaciones entre algunos grupos antihipertensivos	46
Figura 2.8. Componentes del sistema renina-angiotensina (SRA)	52
Figura 2.9. Activación y ensamblaje de la enzima NADPH oxidasa en la célula cardiaca.....	54
Figura 2.10. Generación de los cambios estructurales y funcionales en la célula cardiaca mediados por la Ang II.....	56
Figura 3.1. Imágenes del instrumental utilizado para la medición de la presión sanguínea en los cuatro grupos experimentales de ratas	79
Figura 3.2. Fluorescencia relativa de fluoresceína incubada con AAPH frente al tiempo en presencia de tampón fosfato (blanco), Trolox o una muestra	103
Figura 3.3. Equipo necesario para la realización de la técnica de <i>Western Blotting</i>	110

Figura 3.4: Electroforesis en gel de agarosa de muestras de ARN.....	124
Figura 3.5: Puesta a punto de la cantidad de ARN a utilizar en la retrotranscripción	128
Figura 3.6: ABI 7000 de Applied Biosystems	130
Figura 3.7: Colorante SYBR Green insertado en la doble hélice	131
Figura 3.8: Curva de amplificación de la GAPDH.....	134
Figura 3.9: Curva de amplificación de uno de los marcadores problema (GPx). 134	
Figura 3.10: Determinación de las eficiencias de amplificación de la GAPDH, GPx, GR y SOD	136
Figura 4.1. Peso corporal en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC).....	147
Figura 4.2. Relación entre el peso del corazón y el peso corporal.....	148
Figura 4.3. Evolución semanal de la presión arterial sistólica en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC).....	149
Figura 4.4. Evolución semanal de la presión arterial sistólica en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC).....	150
Figura 4.5. Presión arterial sistólica final en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC)	150

Figura 4.6. Presión arterial diastólica final en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC) 151

Figura 4.7. Concentración de colesterol total en plasma de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y ratas tratadas con LC (WLC y WLNLC)..... 152

Figura 4.8. Concentración de triglicéridos en plasma de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y ratas tratadas con LC (WLC y WLNLC)..... 153

Figura 4.9. Capacidad antioxidante total en plasma de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC) 155

Figura 4.10. Peroxidación lipídica en homogeneizados de corazón procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC) 156

Figura 4.11. Concentración de NO en el plasma de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC) 157

Figura 4.12. Concentración de NO en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC) 158

Figura 4.13. Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en eritrocitos procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC) 159

Figura 4.14. Actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) en eritrocitos procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC) 160

Figura 4.15. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en eritrocitos procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC).....	161
Figura 4.16. Relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) en sangre heparinizada procedente de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC).....	162
Figura 4.17. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en homogeneizados de corazón procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC)	163
Figura 4.18. Actividad de la enzima glutatión reductasa en homogeneizados de corazón procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC).....	164
Figura 4.19. Actividad de la enzima superóxido dismutasa en homogeneizados de corazón procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC)	165
Figura 4.20. Determinación de la relación GSH/GSSG en homogeneizados de corazón procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC).....	166
Figura 4.21. Niveles proteicos relativos de la enzima glutatión peroxidasa en homogeneizados de corazón procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC)	167

Figura 4.22. Niveles proteicos relativos de la enzima glutathion reductasa en homogeneizados de corazón procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC) 168

Figura 4.23. Niveles proteicos relativos de la enzima superóxido dismutasa en homogeneizados de corazón procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC) 169

Figura 4.24. Niveles proteicos relativos de la enzima eNOS en homogeneizados de corazón procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC) 170

Figura 4.25. Expresión relativa de ARNm de corazón de la enzima Glutathion Peroxidasa en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC) 171

Figura 4.26. Expresión relativa de ARNm de la enzima glutathion reductasa en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC) 172

Figura 4.27. Expresión relativa de ARNm de la enzima superóxido dismutasa en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC) 173

Figura 4.28. Expresión relativa de ARNm de la enzima eNOS en corazón ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC)..... 174

Figura 4.29. Expresión relativa de ARNm de la subunidad p22phox en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC)	175
Figura 4.30. Estudio de los niveles plasmáticos de IL-1 β en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC).....	177
Figura 4.31. Estudio de los niveles plasmáticos de IL-6 en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC)..	177
Figura 4.32. Estudio de los niveles plasmáticos de TNF- α en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC).....	178
Figura 4.33. Expresión relativa de ARNm de la citocina IL-1 β en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC).....	179
Figura 4.34. Expresión relativa de ARNm de la citocina IL-6 en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC).....	180
Figura 4.35. Expresión relativa de ARNm de la citocina proinflamatoria TNF- α en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC).....	181
Figura 4.36. Expresión relativa de ARNm de NF- κ B en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC).....	182

Figura 4.37. Expresión relativa de ARNm de IκB en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLN y WLNLC)..... 183

Figura 4.38. Expresión relativa de ARNm de ACE en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC)..... 184

Figura 4.39. Expresión relativa de ARNm de AT-1 en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC)..... 185

Figura 5.1. Mecanismos enzimáticos antioxidantes 195

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Principales defensas antioxidantes.....27

Tabla 2.2. Mediadores químicos de la inflamación 35

Tabla 2.3. Definiciones y clasificación de las cifras de presión arterial.....41

Tabla 2.4. Estratificación del riesgo cardiovascular en cuatro categorías 43

Tabla 2.5. Isoformas de la familia NOX de la NADPH oxidasa 55

Tabla 3.1. Reactivos necesarios para la realización de la PCR en tiempo real.... 132

Tabla 3.2. Secuencia de los cebadores utilizados 132

Tabla 3.3. Programa utilizado en ABI PRISM[®] Sequence Detection Systems 7000 para la realización de la PCR en tiempo real 133

Tabla 3.4. Secuencias de los cebadores objeto de estudio 141

Tabla 3.5. Secuencias de los cebadores objeto de estudio 142

1. OBJETIVOS

La Hipertensión arterial (HTA), que se define como una elevación permanente de las cifras de la presión arterial por encima de los límites normales, es una de las principales causas de las enfermedades cardiovasculares (Emberson y col., 2003), siendo responsable de más del 50% de los ataques al corazón y de las enfermedades coronarias (www.who.int/whr/2002/en/). Como consecuencia del desarrollo y mantenimiento de esta patología, se produce un daño en el corazón (llamado cardiopatía hipertensiva), que da lugar a la formación de hipertrofia ventricular izquierda (HVI), insuficiencia cardíaca (IC), cardiopatía isquémica (CI) y/o fibrilación auricular (Lorell y Carabelo, 2000).

Por todo ello, parece importante encaminar el objetivo terapéutico a la búsqueda de nuevas terapias que sean capaces, no sólo, de disminuir las cifras de la presión arterial, sino que además, posean una acción protectora frente al daño producido en el tejido cardíaco. Para poder lograrlo estos objetivos, es importante conocer los mecanismos moleculares implicados en el origen, desarrollo y mantenimiento de la cardiopatía hipertensiva.

A lo largo de los últimos años se han barajado diferentes hipótesis acerca de los sistemas fisiopatológicos involucrados en el daño cardíaco asociado a la HTA, adquiriendo una notable importancia el sistema renina-angiotensina (SRA) (Lahera y col., 2007; Cuspidi y col., 2008). Parece que este sistema, por medio de la angiotensina II (su principal molécula efectora), activa a la enzima NADPH oxidasa, desencadenando un exceso de formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y generando, por tanto, estrés oxidativo (definido como un desbalance entre las sustancias oxidantes y antioxidantes del organismo, a favor de las primeras). Las ROS, que actúan como moléculas de señalización intracelular, activan una serie de rutas enzimáticas que ponen en funcionamiento, entre otros, los procesos inflamatorios y generando todo ello fibrosis,

proliferación celular e hipertrofia en las células cardíacas (Marchesi y col., 2008; Paravicini y Touyz, 2008).

La L-carnitina (LC) es un derivado aminoacídico presente en la mayoría de los organismos eucarióticos (Stephens y col., 2007). Su función principal es la de actuar como cofactor esencial en el transporte de ácidos grasos de cadena larga hacia el interior de la mitocondria, donde tras la β -oxidación de los mismos, se obtiene energía metabólica (Belay y col., 2006). Por tanto, la LC se encuentra mayoritariamente en todos aquellos tejidos que utilizan los ácidos grasos como fuente principal de energía, como es el caso del corazón (Valko y col., 2007). La LC está adquiriendo en los últimos años un gran interés debido a su uso en distintas enfermedades cardiovasculares (como distintas cardiomiopatías e isquemias miocárdicas), aunque no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares implicados.

Por todo lo anteriormente citado, y teniendo en cuenta tanto la necesidad de buscar nuevas terapias farmacológicas para prevenir y paliar el desarrollo del daño cardíaco asociado a la HTA, así como el empleo de la LC en el tratamiento de diversas enfermedades cardiovasculares, el objetivo de nuestro estudio ha sido evaluar el efecto cardioprotector de la LC en ratas con hipertensión arterial inducida por la administración crónica de L-NAME (N° -nitro-L-arginina metil éster). Esta sustancia actúa inhibiendo la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), productora de óxido nítrico (NO), generando un modelo de hipertensión arterial caracterizado por producir cambios estructurales y funcionales en el corazón (Takemoto y col., 1997).

En primer lugar hemos analizado el efecto de la LC en los valores de presión sanguínea, mediante un control semanal de la presión arterial sistólica y diastólica de los animales de experimentación.

En segundo lugar hemos evaluado el efecto de la LC en el corazón de animales hipertensos, estudiando su capacidad antioxidante y antiinflamatoria.

Por último, y con el propósito de ahondar en los posibles mecanismos de acción de la LC, hemos estudiado su efecto en el SRA así como en el sistema NF- κ B/I κ B, (implicado en la respuesta inflamatoria).

Para la realización de este estudio hemos utilizado cuatro grupos experimentales de trabajo: 1) animales controles; 2) animales con hipertensión arterial inducida por L-NAME; 3) un grupo control tratado con LC y 4) un grupo con hipertensión arterial inducida por L-NAME tratado con LC.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. L-CARNITINA

La L-carnitina (L-3-hidroxi-4-N,N,N-trimetilaminobutirato) es una amina cuaternaria, similar en estructura a la colina (figura 2.1), soluble en agua y sintetizada por la mayor parte de los organismos eucarióticos a partir de dos aminoácidos esenciales: metionina y lisina (Stephens y colaboradores, 2007). Es un compuesto anfótero, ya que presenta un grupo trimetilamonio y un grupo carboxilo aniónico; pertenece al grupo de la betaína.

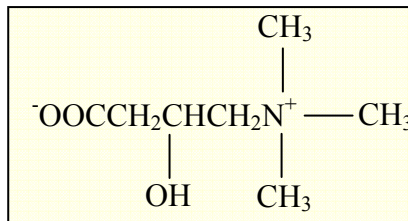


Figura 2.1. Estructura química de la L-carnitina.

2.1.1. Funciones fisiológicas

Entre las funciones fisiológicas de la L-carnitina (LC) se encuentran:

1) Transportar ácidos grasos al interior de la mitocondria. Desde la mitad del siglo XX, muchos han sido los trabajos que han puesto de manifiesto la principal función de la LC, que es el transporte de ácidos grasos de cadena larga hacia el interior de la mitocondria, donde tiene lugar la β -oxidación de los mismos para la formación de energía metabólica (Sener y col., 2004; Gramignano y col., 2006; Laviano y col., 2006; Calo y col., 2006; Belay y col., 2006).

Los ácidos grasos circulantes son transportados al citoplasma de las células en cantidades determinadas principalmente por su concentración en el plasma. Una vez en el interior celular, los ácidos grasos deben de atravesar la membrana mitocondrial. Para ello, deben ser primero activados conjugándose con el

coenzima A (CoA), consumiéndose en esta reacción ATP y siendo catalizada por la enzima Acil-CoA sintetasa (Schreiber, 2005), que se encuentra en la membrana mitocondrial externa.

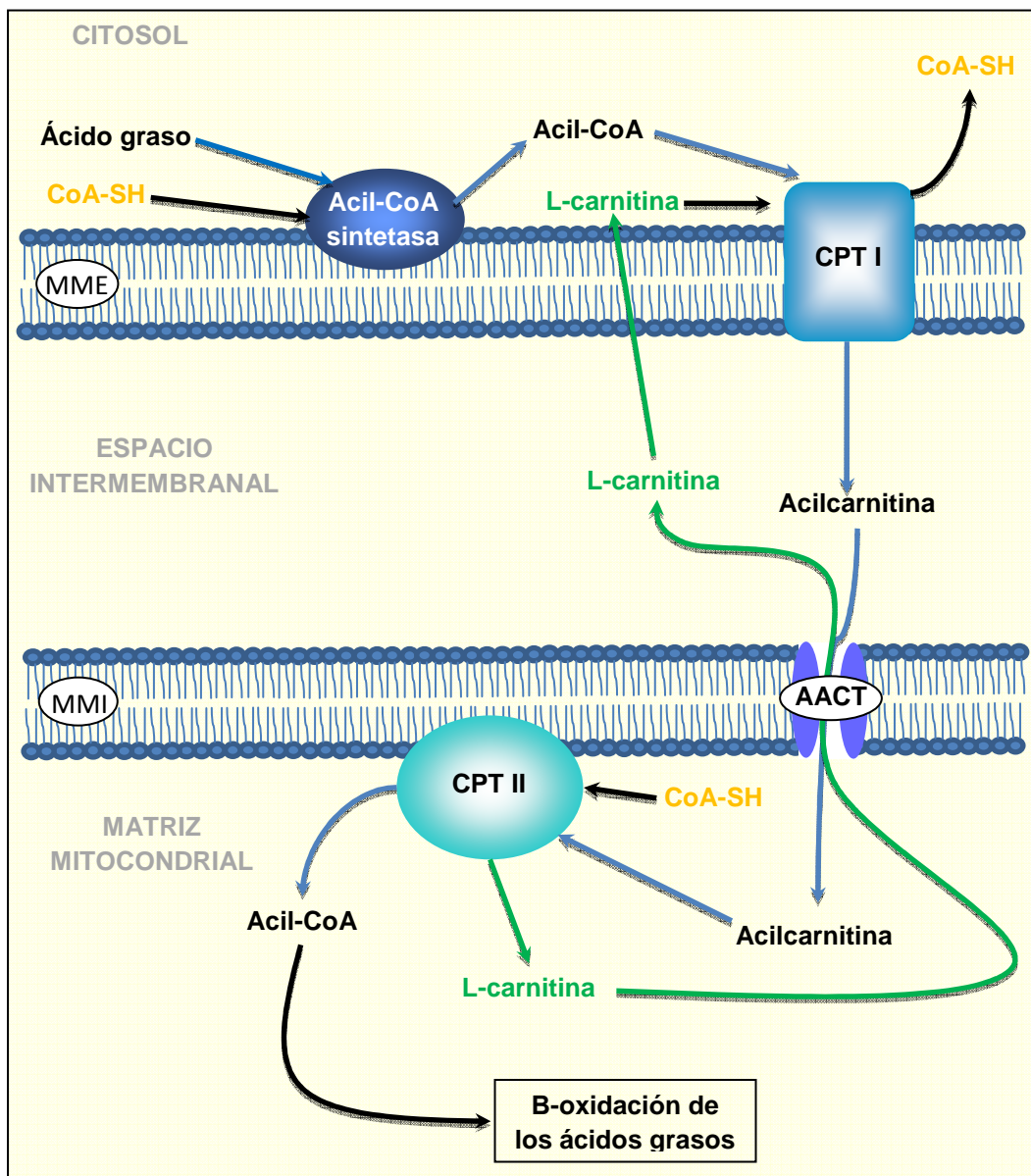


Figura 2.2. Transporte de los ácidos grasos al interior de la mitocondria. Acil graso-CoA (Acil-CoA). Carnitina palmitoil transferasa (CPT I). Membrana mitocondrial externa (MME).

Membrana mitocondrial interna (MMI). Acilcarnitina/carnitina translocasa (AACT). Carnitina palmitoil transferasa (CPT II).

Los ácidos grasos de cadena larga activados (Acil-CoA) son incapaces de pasar al interior de la mitocondria sin el transportador de carnitina, que es denominado carnitina palmitoil transferasa I (CPT I) (figura 2.2). La CPT I, que es una proteína localizada en la membrana mitocondrial externa, cataliza la formación de acilcarnitina, por unión del grupo acilo graso del acil-CoA y el grupo hidroxilo de la LC, liberándose en esta reacción CoA (Vaz y Wanders, 2002). La acilcarnitina formada atraviesa la membrana mitocondrial externa, y pasa desde el espacio intermembrana hasta la matriz mitocondrial por difusión facilitada, gracias a la translocasa de acilcarnitina/carnitina (AACT), situada en la membrana mitocondrial interna (Stephens y col., 2007). Por último, el grupo acilo graso de la acilcarnitina es transferido de nuevo al coenzima A, en una reacción catalizada por la carnitina palmitoil transferasa II (CPT II), liberándose acil-CoA y LC al interior de la matriz mitocondrial. La enzima CPT II se encuentra localizada en la cara interna de la membrana mitocondrial interna (Kerner y Hoppel, 2000; Longo y col., 2006). Finalmente, la acil-CoA formada puede ya incorporarse a la ruta de β -oxidación con objeto de obtener energía; por su parte, la LC vuelve a penetrar en el espacio existente entre las membranas mitocondriales interna y externa mediante el transportador acilcarnitina/carnitina translocasa (Bezaire y col., 2006), saliendo después al exterior mitocondrial por difusión simple.

El proceso de entrada mediado por la LC (más concretamente por el transportador CPT I) es limitante para la entrada de ácidos grasos de cadena larga en la mitocondria y su oxidación (Stephens y col., 2007).

2) Exportar derivados acilos de la mitocondria. A menudo se pasa por alto que la LC también sirve para exportar derivados acilos no metabolizados en la mitocondria, evitando su acúmulo dentro del orgánulo (Schreiber, 2005).

3) Restaurar los niveles de CoA libre. Kobayashi y Fujisawa (1994) publicaron un trabajo que ponía de manifiesto que había acúmulos de acil-CoA en el citoplasma y mitocondria de las células cardiacas de corazones con isquemia. Cuando realizaban perfusiones con LC, la concentración intracelular de las especies de acil-CoA fue reducida de una forma dosis dependiente. Suzuki y col. (1981) también demostraron una reducción de acil-CoA y acilcarnitina en corazones isquémicos de perros tras la administración de LC, con aumento en la producción de ATP en el miocardio. Ambos estudios revelaron que la reducción de acil-CoA y acilcarnitina inducida por LC estaba acompañada por la restauración de los niveles normales de CoA libre. Esta habilidad de la LC de reducir la concentración de los grupos acilos unidos al coenzima A y restaurar los niveles de CoA libre para que puedan ser utilizados en próximas funciones metabólicas, es reconocida como la tercera acción importante de la LC (Schreiber, 2005).

4) Cetogénesis. La LC desempeña un papel importante en la cetogénesis, proceso por el que se suministra energía al corazón y al cerebro (Tein, 2003). Como hemos mencionado, la enzima CPT I es el punto más importante en la regulación de la oxidación de los ácidos grasos (Stephens y col., 2007). El acil-CoA producido por la oxidación de los ácidos grasos en las mitocondrias puede ser completamente oxidado mediante el ciclo del ácido cítrico. Sin embargo, una fracción significativa de este acil-CoA es convertido en acetoacetato o D- β -hidroxibutirato. Estos compuestos, junto con la acetona, son referidos como cuerpos cetónicos, que sirven como importantes combustibles metabólicos para

muchos tejidos periféricos. Por ejemplo, el cerebro normalmente utiliza glucosa como fuente de energía (los ácidos grasos no pueden atravesar la barrera hematoencefálica), pero, durante ayuno prolongado, los cuerpos cetónicos son la mayor fuente de energía del cerebro. Los cuerpos cetónicos son los equivalentes hidrosolubles de los ácidos grasos (Kelly, 1998 y Tein, 2003).

5) En el ejercicio físico. La LC, como ya se ha mencionado anteriormente, es el principal sustrato de CPT I, así que también desempeña un importante papel en la regulación de la oxidación de las grasas durante el ejercicio (Roepstorff y col., 2005).

6) Participación en la transferencia de los productos de la β -oxidación peroxisomal. La LC participa en la transferencia de los productos de la β -oxidación peroxisomal (incluyendo acetil-CoA) a la mitocondria, donde se produce su oxidación a CO₂ y H₂O en el ciclo del ácido cítrico (Roermund y col., 1999; Stephens y col., 2006). Otros estudios han demostrado la existencia en peroxisomas de hígado de una proteína idéntica a la proteína transportadora acil graso-carnitina/carnitina mitocondrial, implicando a la carnitina en el transporte de los ácidos grasos a través de la membrana peroxisomal (Fraser y Zammit, 1999; Bezaire y col., 2006).

7) Otras funciones:

- Modificar la apoptosis, uno de los principales determinantes de la miopatía del músculo esquelético en el fallo cardiaco (Caló y col., 2006).
- Disminuir el daño orgánico oxidativo en modelos de animales con fallo renal crónico (Caló y col., 2006).

- Actuar como antioxidante, aunque no está claro su mecanismo de acción al respecto (Kart y col., 2007).
- Prevenir la acumulación tóxica de ácidos grasos en el interior de la mitocondria, ya que los expulsa en forma de ésteres de carnitina (Ilias y col., 2004).
- Intervenir en la proliferación de linfocitos (Ilias y col., 2004).
- Intervenir en la transcripción nuclear en el cardiomiocito (Kodde y col., 2007).
- Actuar como un tampón del grupo acetilo al principio del ejercicio, cuando la tasa de generación de Acetil-CoA es más elevada que su tasa de utilización por el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Stephens y col., 2007).
- Ejercer una acción neuromodulatoria en tejidos animales de avanzada edad (Thangasamy y col., 2008).

Es importante reseñar que, según acabamos de mencionar, la LC no sólo desempeña una función esencial en el metabolismo de los ácidos grasos para la obtención de energía metabólica, sino que además parece ser que ejerce una acción antioxidante y neuromoduladora.

2.1.2. Metabolismo

El 75% de la cantidad de LC requerida por el organismo proviene de la dieta (carne roja, huevos y productos lácteos). El resto se sintetiza endógenamente en el hígado y en menor cantidad en el riñón y cerebro, a partir de los

aminoácidos lisina y metionina (Tanphaichitr y Broquist, 1973; Calabrese y col., 2006).

La mayor parte de las reservas de LC están en el músculo esquelético y cardíaco (hasta el 98%), mientras que en el hígado hay tan sólo del 1 al 6%. El fluido extracelular del individuo normal contiene menos del 6% del total de la LC del organismo. La mayor parte de la LC del organismo está en forma libre; el resto se presenta esterificada en forma de acilcarnitinas de cadena corta y acilcarnitinas de cadena larga (figura 2.3).

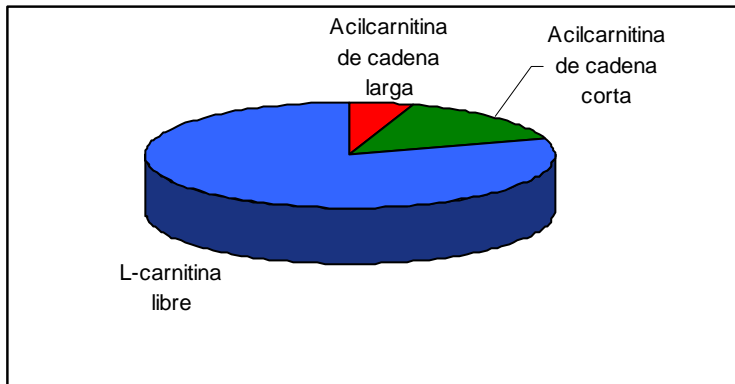


Figura 2.3. Fracciones de carnitina: L-carnitina libre y acilcarnitina de cadena corta (ácido solubles), y acilcarnitina de cadena larga (ácido insoluble).

La LC no es considerada normalmente como un nutriente esencial, debido a que el organismo, como acabamos de mencionar, es capaz de sintetizar las cantidades necesarias. Sin embargo, sí se requiere un aporte exógeno de LC en condiciones en las que existe demanda de ácidos grasos o deficiencia de carnitina, como ocurre por ejemplo en pacientes con tratamientos de hemodiálisis o en enfermedades cardiovasculares (Schreiber, 2005). En el apartado 2.1.4 se tratarán con detalle las aplicaciones clínicas de este compuesto.

2.1.3. Deficiencias

La deficiencia de LC es un estado metabólico en el cual las concentraciones de carnitina en el plasma o en los tejidos son menores a las requeridas para el funcionamiento normal del organismo. Los efectos biológicos no son clínicamente significativos hasta que los niveles no se encuentran por debajo de un 10-20% de los valores considerados como normales (Scaglia y col., 1998).

Los mecanismos por los que puede producirse una deficiencia de LC son:

- a) Reducción en la síntesis hepática y/o renal.
- b) Aumento de la excreción renal.
- c) Insuficiencia de LC en la dieta o mala absorción intestinal.
- d) Producción excesiva de carnitina esterificada, con una reducción importante de LC libre (Paulson, 1998).

Según Longo y col. (2006), las deficiencias de carnitina se clasifican en:

- Deficiencia primaria de carnitina:
 - Deficiencia muscular
 - Deficiencia sistémica
- Deficiencia secundaria de carnitina.
- Deficiencia de enzima carnitina palmitoil transferasa.

2.1.3.1 Deficiencia primaria de carnitina:

Una deficiencia primaria de carnitina sugiere un defecto de su metabolismo, disminuyendo como consecuencia los niveles de la misma en el plasma y/o en los tejidos (por defectos en la síntesis, en el transporte a los tejidos o en la excreción por los riñones de la carnitina libre o esterificada). Este tipo de deficiencia tiene una frecuencia de aparición de aproximadamente 1:40000 de los recién nacidos en Japón (Koizumi y col., 1999) y de 1:37000- 1:100000 en Australia. En Europa y Estados Unidos, la frecuencia de aparición de esta deficiencia no está definida, pero algunos investigadores la han estimado semejante a la de Japón (Longo y col., 2006: Am J Med Genet. Part C).

Existen dos tipos distintos de deficiencia primaria de carnitina, la sistémica y la muscular.

- Deficiencia muscular de carnitina: se produce cuando las concentraciones de carnitina a nivel sistémico son normales, pero existe una atenuada disminución de carnitina en el músculo esquelético. El origen de esta deficiencia podría deberse a una actividad defectuosa del transportador de carnitina en el músculo. La deficiencia muscular de carnitina tiene como consecuencias la debilidad muscular, intolerancia al ejercicio y depósitos de lípidos en fibras tipo I del músculo esquelético (Amat di San Filippo y col., 2006).

- Deficiencia sistémica de carnitina: la deficiencia sistémica de carnitina se presenta siempre en el recién nacido o durante la infancia, y se caracteriza por una miopatía progresiva con episodios de coma por encefalopatía hepática recurrente. El desenlace puede ser fatal en el 50% de los casos. La enfermedad viene determinada por la pérdida de LC por la orina, por una disminución de la concentración intracelular de la misma (este descenso se hace más acusado en plasma, hígado, músculo esquelético y otros tejidos) y por el almacenamiento de lípidos en hígado y tejidos (Scaglia y col., 1999).

2.1.3.2. Deficiencia secundaria de carnitina:

La deficiencia secundaria de carnitina se manifiesta como una disminución de carnitina, en el plasma o en los tejidos, que es debida a otras patologías o situaciones primarias subyacentes (Kelly, 1998; Paulson, 1998; Saudubray y col, 1999); así, podemos mencionar:

1) Diversas situaciones patológicas, como insuficiencia renal en pacientes con tratamiento de hemodiálisis (Bohmer y col., 1978), cirrosis (Rudman y col., 1977), síndrome de Fanconi (Bernardini y col, 1985), síndrome de Reye (Stumpf y col., 1985), nutrición parenteral prolongada, miopatías crónicas graves, desnutrición, sepsis, insuficiencias suprarrenales y pituitarias y anorexia nerviosa (Engel, 1986; Fukusako y col., 1995).

2) Situaciones fisiológicas, como el embarazo, lactancia, estrés, dieta inapropiada, etc. (Marzo y col., 1994).

3) Administración de determinados fármacos, como el valproato, el tratamiento con antibióticos que contengan ácido piválico en su molécula, emetina o zidovudina (Ito y col., 1995; Arrigoni Martelli y Caso, 2001).

2.1.3.3. Deficiencia de carnitina palmitoil transferasa:

En esta deficiencia, aunque exista una disponibilidad adecuada de carnitina, no es posible la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos de cadena larga activados, ya que la enzima carnitina palmitoil transferasa se encuentra inactiva (normalmente como consecuencia de una mutación). La acumulación de acil-CoA de cadena larga parece ser responsable de la mioglobinuria, considerada una expresión típica de la lesión de la membrana celular. En estos pacientes se

produce debilidad muscular durante la crisis mioglobinúrica, que puede incluso afectar a la musculatura respiratoria (Jautel y col., 1993; Venturinini y Pupeshi, 1994)

Ante las distintas situaciones enumeradas, la administración de L-carnitina puede curar total o parcialmente la enfermedad si los tejidos deficitarios logran utilizar el fármaco (Spiekerkaetter y col., 2003), mientras que en aquellos casos en los que un defecto metabólico impida el aprovechamiento de la LC la sintomatología no será paliada. La sustitución en la dieta de ácidos grasos de cadena larga por aquellos de cadena media puede aliviar los síntomas clínicos, siendo especialmente utilizada esta pauta en las deficiencias de carnitina palmitoil transferasa. Ante esta deficiencia, se recomienda evitar períodos prolongados de ayuno, especialmente si va a realizarse un ejercicio físico.

2.1.4. Aplicaciones clínicas

Como mencionamos en el apartado 2.1.2, la carnitina no es considerada normalmente como un nutriente esencial, debido a que el organismo en condiciones normales es capaz de sintetizar las cantidades necesarias. Sin embargo, en la mayoría de patologías producidas por deficiencia de este compuesto está justificada una suplementación con LC.

Las deficiencias de carnitina afectan principalmente al músculo esquelético y al corazón, ya que su principal fuente de energía son los ácidos grasos. Por esta razón, el tratamiento con LC está especialmente indicado en enfermedades musculares y cardiovasculares (Stephens y col., 2007). Según el Vademécum Médico Internacional (edición 49, 2008), las aplicaciones clínicas de la LC son:

- Pérdida secundaria de carnitina durante el tratamiento hemodialítico.
- Miopatías y cardiomiopatías causadas por carencia de carnitina.
- Cardiomiopatías producidas por adriamicina y antidepresivos tricíclicos
- Isquemia miocárdica aguda y crónica: angina de pecho, secuelas de infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca, corazón senil, cardiopatía congestiva, arritmias, etc.

En las tres primeras indicaciones, el tratamiento con LC ayuda a paliar la sintomatología producida por la carencia de la misma. En el caso de las isquemias, el tratamiento mejora la recuperación de los pacientes, aliviando los síntomas, reduciendo el requerimiento de otros fármacos y disminuyendo la mortalidad.

Además de las indicaciones terapéuticas mencionadas, existen muchos estudios que sugieren el uso de LC y algunos de sus acil-derivados en otras patologías, ya sea en monoterapia o en combinación con otras sustancias. Así, países como Estados Unidos proponen en la actualidad el uso de LC para el tratamiento de determinadas patologías y situaciones fisiológicas como: anorexia; desarrollo físico; enfermedades cardiovasculares; diabetes y resistencia a la insulina; efectos hepáticos; VIH e inmunidad; infertilidad masculina; fallo renal y diálisis.

2.2. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo se puede definir como el daño celular causado como consecuencia de la pérdida del equilibrio entre las sustancias prooxidantes y antioxidantes del organismo. Este desbalance puede ser debido bien a una excesiva producción de especies reactivas prooxidantes (denominadas comúnmente radicales libres), o bien a una deficiencia en los mecanismos antioxidantes (Halliwell, 2007).

2.2.1. Daño oxidativo

Un radical libre es una molécula con un electrón desapareado en su orbital más externo, lo que le proporciona una gran reactividad sobre otras moléculas. En el caso del oxígeno, estos radicales libres forman las especies reactivas del oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS).

En estado de reposo, el oxígeno molecular (O_2) tiene dos electrones desapareados en el último orbital, los cuales, al tener el mismo espín, sólo pueden interactuar con electrones libres de otros compuestos que tengan el espín contrario; por eso el O_2 es poco reactivo (Halliwell, 2004). Sin embargo, en la fosforilación oxidativa llevada a cabo en las mitocondrias se produce la reducción de oxígeno para generar dos moléculas de agua. Esta reducción requiere 4 electrones, y en el camino se forman una serie de intermediarios que constituyen las ROS (Parodi y col., 2007). Estas ROS, cuando se acumulan y superan a los agentes antioxidantes, son las que van a producir el daño celular. El daño continuado originado por los radicales a las biomoléculas (ADN, lípidos y proteínas) desempeña un papel crucial en el desarrollo de numerosas enfermedades como cáncer, arteriosclerosis, artritis, desórdenes

neurodegenerativos, diabetes e hipertensión (Bioquímica Humana: de las bases a la clínica, 2007).

Las principales fuentes generadoras de radicales libres en el organismo son la mitocondria, el retículo endoplásmico, los peroxisomas y el sistema inmune (factores endógenos); también pueden adquirirse de forma exógena (agentes contaminantes, fármacos, ozono, metales pesados, etc.). Las especies reactivas del oxígeno son: radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), oxígeno singulete (1O_2), ácido hipocloroso (HOCl) y anión peroxinitrito ($OONO^-$) (figura 2.4).

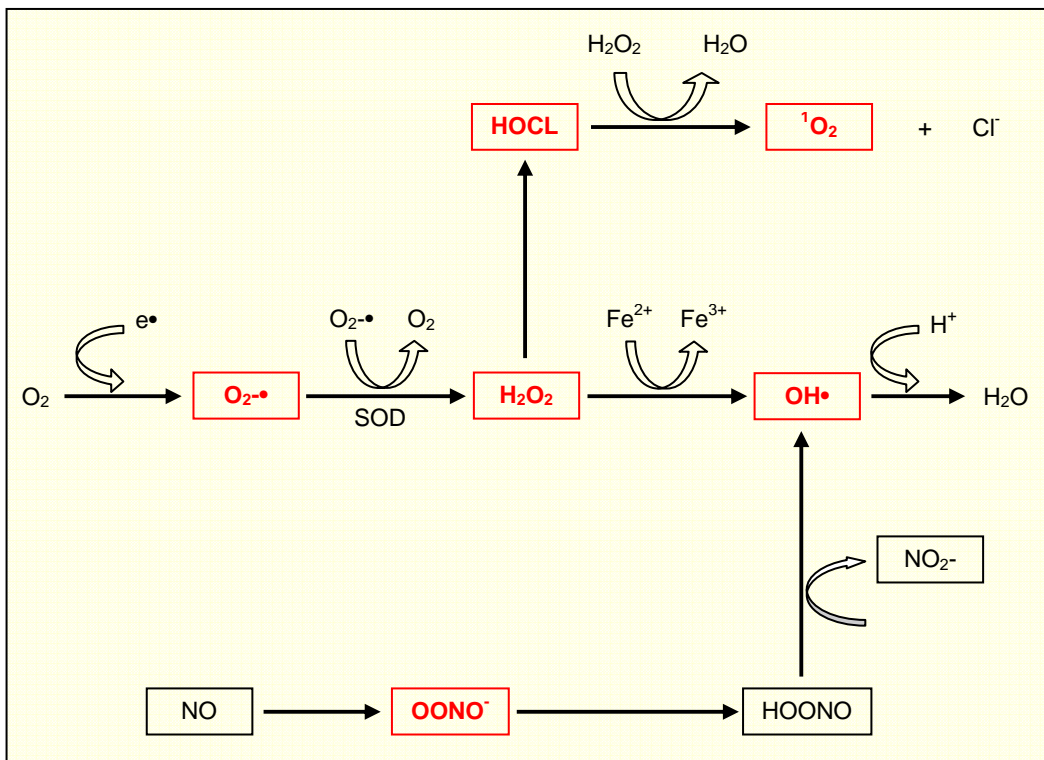
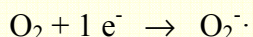


Figura 2.4. Especies reactivas del oxígeno (ROS). Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^{\cdot}), oxígeno singulete (1O_2), ácido hipocloroso (HOCl) y anión peroxinitrito ($OONO^-$).

Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Se forma cuando el O_2 acepta un electrón. Esto ocurre en la cadena respiratoria de la mitocondria, donde se estima que el 2-4% del oxígeno consumido no se reduce completamente a agua, dando lugar a este radical:



La formación del radical superóxido también puede ocurrir por la actividad de la enzima NADPH (nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido) oxidasa (Touyz, 2005), según la reacción:



En determinadas condiciones, la enzima xantina deshidrogenasa (responsable de la transformación de la hipoxantina en xantina y luego en ácido úrico) se transforma en xantina oxidasa, la cual genera radical $O_2^{\cdot-}$ utilizando como substrato O_2 en lugar de NAD^+ . La enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), en ausencia de L-arginina o del cofactor tetrahidrobiopterina (BH_4), también puede generar $O_2^{\cdot-}$ (Beswick y col., 2001).

Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2). Es una especie estable que se produce durante la respiración celular por diferentes procesos metabólicos. La enzima superóxido dismutasa (apartado 2.2.3) es una enzima implicada en su formación. El H_2O_2 es un blanco muy interesante de investigación, ya que puede ser convertido en OH^{\cdot} por una reacción en cadena con otras moléculas que inducen efectos tóxicos.

Tanto el $O_2^{\cdot-}$ como el H_2O_2 son compuestos poco reactivos. Sin embargo, ambos son tóxicos principalmente porque generan 1O_2 y OH^{\cdot} , de los que

hablaremos a continuación (Hansberg, 2002-buscar libro; Giorgio y col., 2007; Krohn y col., 2007).

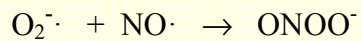
Radical hidroxilo (OH•). Es una molécula altamente oxidante, electrofílica, tóxica y de vida muy corta. De este modo, cuando es producido *in vivo*, reacciona muy cerca del sitio de su formación. Se genera durante la radiólisis del agua, la reacción de Fenton y la de Haber-Weiss, fotólisis y ozonización. También se forma en las células durante procesos fisiológicos cotidianos, ya que al ser altamente reactivo, una vez formado, reacciona con biomoléculas (Touyz, 2004).

Oxígeno singulete (¹O₂). Es una especie muy reactiva involucrada en muchos acontecimientos bioquímicos como reacciones fotoquímicas, procesos destructivos de membranas, fagocitosis, fotoenvejecimiento, hidroxilación metabólica y envejecimiento. Es un estado muy excitado que se crea cuando el O₂ absorbe energía suficiente para desviar el espín de uno de los electrones desapareados y se aparea con el otro electrón. Es producido *in vivo* por acción enzimática de oxígeno. También se puede originar cuando reacciona con ozono en los fluidos del cuerpo humano, y cuando reacciona con el peróxido de hidrógeno y peroxinitrilo. Este radical puede interactuar con muchas moléculas biológicas tales como ADN, proteína y lípidos. Además, induce varios efectos genotóxicos, carcinógenos y mutagénicos al actuar sobre ácidos grasos poliinsaturados y ADN (Afonso y col., 2007; Henrotin y col., 2005).

Ácido Hipocloroso (HOCl). En los fagocitos existen enzimas mieloperoxidasas (MPO) que generan HOCl a partir de peróxido de hidrógeno; éste se forma a su vez gracias a la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que es capaz de dismutar el radical hidroxilo existente en el organismo.

El ácido hipocloroso es un potente bactericida debido a su poder oxidante. Uno de los mecanismos implicados en este efecto bactericida es la formación del $^1\text{O}_2$ al reaccionar con el peróxido de hidrógeno (Ryter y Tyrrell, 1998; Arisawa y col., 2003).

Anión peroxinitrito (ONOO^-). Es un oxidante muy potente. Es producido por la actividad de macrófagos, neutrófilos y células endoteliales, mediante reacciones entre óxido nítrico celular (NO ó $\text{NO}\cdot$) y el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$):



El peroxinitrito es bastante estable y puede difundir muy bien en algunas células. A pH fisiológico, cerca del 20% de los peroxinitritos son protonados hasta el ácido peroxinitroso (ONOOH).

El peroxinitrito puede también reaccionar con un gran número de biomoléculas, incluyendo los tioles, aminas, lípidos y las proteínas, siendo un potente oxidante de lípidos y de otras biomoléculas (Bioquímica Humana: de las bases a la clínica, 2007).

2.2.2. Consecuencias del estrés oxidativo

Es preciso dejar claro en este punto que las ROS, en pequeñas cantidades o en la proporción adecuada frente a los mecanismos antioxidantes, son indispensables para el buen funcionamiento del organismo, ya que, entre sus funciones, destaca la de actuar como mensajeros intracelulares y defender al sujeto frente a los microorganismos (Matés y col., 1999).

Sin embargo, cuando las especies reactivas de oxígeno o radicales libres generados endógenamente y los exógenos que entran en las células aumentan de

forma que superan a los defensas antioxidantes (ver apartado 2.2.3), se genera una situación de desequilibrio entre ambos mecanismos, que originan una serie de reacciones en cadena que son capaces de reaccionar con el ADN, lípidos y proteínas, alterando su estructura y, por tanto, su función.

Está claro que cuando los niveles de estrés oxidativo están aumentados en el organismo se produce un deterioro del ADN que afecta a todos los niveles estructurales (Parodi y col., 2007). Los cambios en la secuencia del ADN producen mutaciones puntuales, deleciones y amplificaciones de genes (Vijg, 2000; Valerio y Petersen, 1998).

Otro de los efectos de los radicales libres es la oxidación de los lípidos (que cumplen una función importante en las estructuras celulares y el metabolismo), alterando considerablemente la función de la membrana al disminuir su permeabilidad y su fluidez (Mathews y col., 2002). La abundante presencia de fosfolípidos en la membrana las hace muy susceptibles a reaccionar con las especies reactivas de oxígeno, en especial los ácidos grasos poliinsaturados, debido a que los grupos metilenos situados entre los dobles enlaces pueden perder fácilmente un hidrógeno.

Otros aldehidos importantes originados durante la peroxidación lipídica son los cetoaldehidos (que incluyen al malondialdehido). El malondialdehido (MDA) es el aldehido individual más abundante y, por lo tanto es muy utilizado como marcador del estrés oxidativo existente (Uchida, 2000).

Los radicales libres implicados en la oxidación de las proteínas pueden actuar sobre su estructura principal o sobre los residuos de aminoácidos de sus cadenas laterales (Hawkins y Davies, 2001; Davies, 2005). Las ROS pueden actuar directamente sobre proteínas dependientes de calcio (Forman y col., 2008).

Además, existen incrementos en la concentración de Na^+ y acumulación de ácidos grasos de cadena larga en las membranas cardíacas. Todas estas alteraciones pueden llevar consigo el desarrollo de la deficiencia de ATP en la isquemia cardíaca (Valko y col., 2007).

Debido al estrés oxidativo, se genera un aumento del Ca^{2+} intracelular en las células cardíacas, denominador común en la hiperplasia del endotelio (aumento endotelial debido a las proteínas inflamatorias), siendo éste el punto de partida para el desarrollo de la vasoconstricción, daño celular miocárdico e hipertrofia cardíaca.

2.2.3. Mecanismos de defensa antioxidante

El efecto de las especies reactivas del oxígeno (ver apartado 2.2.2) en el organismo está compensado por la acción de los sistemas de defensa antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos (Tabla 2.1).

Antioxidantes enzimáticos	Antioxidantes no enzimáticos
Glutation peroxidasa (GPx)	Glutation
Glutation Reductasa (GR)	Bilirrubina y ácido úrico
Superóxido dismutasa (SOD)	Vitamina E y vitamina C
Catalasa (CAT)	Carotenoides
	Flavonoides

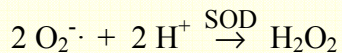
Tabla 2.1. Principales defensas antioxidantes

2.2.3.1. Antioxidantes enzimáticos

Los antioxidantes enzimáticos constituyen la llamada primera línea de defensa; se encargan de eliminar las especies reactivas de oxígeno, especialmente

el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, ya que a partir de éstos se generan otras especies reactivas de oxígeno (radical hidroxilo, oxígeno singulete y peroxinitrito) que, al ser más reactivas, son más peligrosas para el organismo.

- **Superóxido dismutasa (SOD).** Las superóxidos dismutasas son metaloproteínas que facilitan la dismutación de dos radicales superóxidos para formar peróxido de hidrógeno, que podrá ser destruido después por las actividades de las enzimas catalasa o glutathion peroxidasa (descritas a continuación):

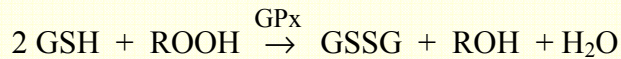


La SOD fue la primera enzima antioxidante descrita (McCord y Fridovich, 1969), y constituyó una prueba de la existencia de los radicales libres en los organismos.

Hay tres isoformas reconocidas: la citosólica (Cu/ZnSOD), la mitocondrial (MnSOD) y la extracelular (ECSOD) (Wassmann y col., 2004). La citosólica es un homodímero de 32 KDa con un sitio activo constituido por un átomo de cobre y otro de zinc (Afonso y col., 2007). La mitocondrial es un homotetrámero de 96 kDa que contiene un átomo de manganeso en cada subunidad, y es la única que es indispensable para la supervivencia (Matés y col., 1999). La tercera isoforma, que se encuentra en la matriz extracelular, es un tetrámero de 135 KDa, compuesto por dos dímeros unidos por puentes disulfuro y con un centro catalítico compuesto también por cobre y zinc (Tengattini y col., 2008). En la mayoría de los tejidos el contenido en MnSOD es menor que el de Cu/ZnSOD (Valko y col., 2007).

- **Glutathion peroxidasa (GPx).** Está formada por cuatro subunidades idénticas, y cada una de ellas contiene un residuo de selenocisteína que es esencial

para su actividad enzimática. La GPx comparte su sustrato con la catalasa, pero además puede reaccionar de manera efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H₂O₂) usando glutatión reducido (GSH) que es transformado a glutatión oxidado (GSSG) (de Lorgeril y Salen, 2006):



Cuando hay deficiencias genéticas o alimentarias de GPx se pueden originar episodios de hemólisis si hay exposición a drogas que producen anión superóxido, peróxidos o hidroperóxidos. La GPx, además de tener efecto protector sobre la peroxidación lipídica e hidroperóxidos en el ADN, actúa sobre la cascada del ácido araquidónico, catalizando la formación de prostaglandinas (Bioquímica Humana: de las bases a la clínica, 2007).

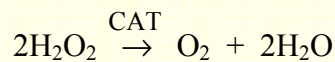
Se han encontrado al menos cinco isoenzimas de GPx en mamíferos. Aunque su expresión es ubicua, el nivel de cada isoforma varía dependiendo del tipo de tejido. La Gpx1 se encuentra predominantemente en eritrocitos, riñón, corazón e hígado, y la Gpx4 se expresa mayoritariamente en células del epitelio renal y en los testículos. La Gpx2 citosólica (o GPx-G1) y la Gpx3 extracelular (o GPx-P) se detectan escasamente en la mayoría de los tejidos, excepto en el tracto intestinal y el riñón, respectivamente. Recientemente se ha encontrado un nuevo miembro, la Gpx5, que es independiente de selenio y se expresa específicamente en el epidídimo de ratón (Sies, 1999; Hansberg, 2002 Biología de las especies de oxígeno reactivas).

• **Glutation reductasa (GR).** Es una flavoenzima dependiente de nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH), y cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH):



Esta enzima, dependiente de flavín adenín dinucleótido (FAD), está ampliamente distribuida por el organismo y actúa básicamente de manera unidireccional, por lo que mantiene muy elevada la concentración de glutatión reducido (GSH) con respecto al glutatión oxidado (GSSG), siendo por tanto de una gran importancia biológica (Mathews y col., 2002). El NADPH, factor limitante para la glutatión reductasa, procede principalmente de la ruta de las pentosas fosfato (por acción de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), aunque también se produce en las reacciones que catalizan la isocitrato deshidrogenasa y la enzima málica (Makino y col., 1994; McKee y McKee, 2003).

• **Catalasa (CAT).** Es una enzima tetramérica. Cataliza la conversión de H_2O_2 en H_2O y O_2 , para proteger a las células del H_2O_2 que se genera en su interior. (Mathews y col., 2002):



2.2.3.2. Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos constituyen la segunda línea de defensa del organismo frente a las especies reactivas o radicales libres. Su misión es la de

evitar la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena llevadas a cabo por un exceso de las sustancias oxidantes, y que, en último término conllevarían al desarrollo del daño oxidativo (apartado 2.2.3).

Uno de los mayores antioxidantes existentes en el organismo es el **glutation**. Es característico en su estructura la presencia de un grupo tiol. La forma reducida del glutatión es GSH y la forma oxidada es glutatión disulfuro (GSSG). GSH actúa como protector del estrés oxidativo, ya que:

- Es un cofactor de varias enzimas detoxificantes, como la glutatión peroxidasa, la glutatión transferasa y otras.
- Neutraliza y elimina de forma directa radicales hidroxílicos y oxígeno singulete.
- Detoxifica el peróxido de hidrógeno y peróxidos lipídicos por la acción catalítica de las glutatión peroxidases.
- Es un importante regenerador de vitaminas C y E.
- Mantiene el estado redox en el núcleo de las proteínas sulfhídricas, necesarias para la reparación y expresión del ADN.

El GSH se encuentra en altas concentraciones en el citosol, el núcleo y las mitocondrias, siendo el antioxidante soluble más abundante en estos compartimentos celulares (Scott, 2006).

Además, existen otros antioxidantes enzimáticos entre los que destacamos por su importancia: la bilirrubina, el ácido úrico, la melatonina, la vitamina E (α -tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), los carotenoides y los flavonoides (Hansberg, 2002).

2.3. INFLAMACIÓN

2.3.1. Definición

La inflamación se puede definir como una respuesta no específica ante una gran variedad de lesiones tisulares cuya finalidad es: 1) eliminar el agente causante; 2) retirar el tejido muerto; 3) reemplazar el tejido muerto por tejido normal o la cicatrización del mismo.

Esta respuesta es siempre análoga, independientemente de cual sea la causa. Los agentes desencadenantes clásicos de respuestas inflamatorias son:

Agentes físicos: (traumatismos, frío, calor, radiaciones).

Agentes químicos, tanto exógenos (ácidos o álcalis) como endógenos (sangre extravasada o bilis).

Agentes vivos, que son la causa más característica de inflamación, tanto directamente como a través de la liberación de toxinas.

Reacciones inmunológicas, cuya vía final común es la activación de los mediadores inflamatorios.

El concepto clásico de inflamación, definido como incremento de la vascularización, de la permeabilidad vascular con acúmulo de plasma y de células procedentes de la sangre, responsables del rubor, calor, dolor y tumor, debe ser ampliado a muchos procesos en los que estas manifestaciones clínicas no están tan manifiestas. De esta forma, pueden evocar respuestas inflamatorias otras formas de lesión, como la isquemia y algunas neoplasias. Es decir, la inflamación es la forma de expresarse de distintas enfermedades (Manual de Patología general; José Luis Pérez Arellano: 6ª edición; Masson). Como ejemplos podemos citar el asma

bronquial, la aterosclerosis, las vasculitis, la enfermedad inflamatoria intestinal e incluso la enfermedad de Alzheimer y el cáncer.

Entre las células de la inflamación se encuentran monocitos/macrófagos, neutrófilos, basófilos/mastocitos, eosinófilos y linfocitos. Junto a ellas se conocen un amplio número de moléculas esenciales denominadas mediadores de la inflamación; (apartado 2.3.4): citoquinas (citocinas), interferones, factores de crecimiento, etc; su función es la de actuar como mensajeros intercelulares, estimulando o inhibiendo la diferenciación, proliferación o la función de las células inflamatorias (Patología General, Masson). Así, el proceso inflamatorio se caracteriza por el movimiento de células y fluidos desde la sangre hacia los tejidos extravasculares donde se ha producido el estímulo nocivo. En este proceso participan factores quimiotácticos como citocinas y quimiocinas producidas localmente por el tejido dañado (Griffin y col., 2003: *Immunology and haematology*).

Dependiendo de las características temporales de la inflamación definimos dos tipos de respuesta, inflamación aguda e inflamación crónica (Abbas y col.; *Inmunología celular y Molecular*; 4ª edición; McGraw-Hill Interamericana;).

2.3.2. Inflamación aguda

La inflamación aguda es la respuesta inmediata al daño celular; tiene una duración corta que puede variar de horas a días, y es iniciada por una variedad de estímulos que incluyen daño químico, térmico e infección (Griffin y col., 2003).

La inflamación aguda es una reacción desde el punto de vista morfológico que cursa en tres fases: fase vascular, fase leucocitaria precoz y fase leucocitaria tardía (Cotran y col.; *Patología estructural y funcional*; 6ª edición; McGraw-Hill

Interamericana. 2000). La evolución posterior puede ser de tres tipos: la resolución total del proceso, la cronificación (con acumulación de linfocitos, macrófagos y fibroblastos en el foco inflamatorio) y la destrucción tisular, con reparación posterior (figura 2.5).

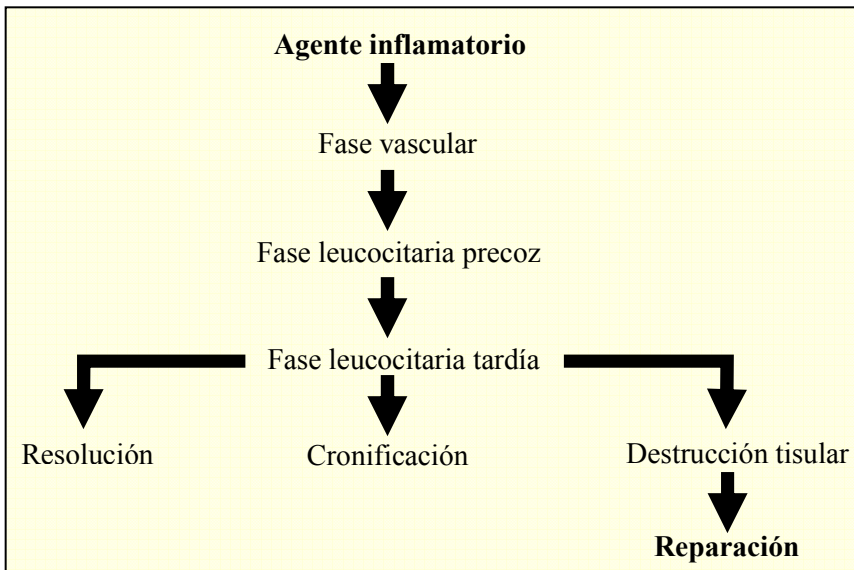


Figura 2.5. Esquema general de la inflamación/reparación.

2.3.3. Inflamación crónica

Existen tres razones fundamentales por las que la respuesta inflamatoria se perpetúa, apareciendo un patrón de enfermedad crónica: la persistencia del agente causal, la dificultad para la degradación del agente inflamatorio o la insuficiencia de la respuesta inmune.

El patrón característico de la inflamación crónica es la acumulación de linfocitos y macrófagos, que puede adoptar dos formas principales: distribución en el área lesionada adoptando patrones intersticiales (infiltración por “células redondas”) o disposición de forma ordenada (“granulomas” constituidos por

varios tipos celulares). (Manual de Patología general; José Luis Pérez Arellano; Masson, 2004).

2.3.4. Mediadores de la inflamación

Excepto la fase inicial de la inflamación (vasoconstricción que se produce en la fase vascular) que está regulada por el sistema nervioso, el resto de fenómenos inflamatorios se debe a una serie de sustancias químicas: los mediadores de la inflamación. En condiciones normales, estos mediadores son inactivos, bien porque circulan en forma de precursores en la sangre (mediadores plasmáticos), bien porque se encuentran “empaquetados” en orgánulos o porque son sintetizados *de novo* durante el transcurso de la inflamación (mediadores celulares).

Los principales mediadores inflamatorios, tanto plasmáticos como celulares, se recogen en la Tabla 2.2.

Celulares	Plasmáticos
Aminas vasoactivas (histamina, serotonina)	Sistema del complemento
Biolípidos (eicosanoides y PAF)	Sistema plasmático de la coagulación
Radicales libres de oxígeno	Sistema plasmático de la fibrinólisis
Óxido nítrico	Sistema de las cininas
Enzimas lisosomales	
Citoquinas proinflamatorias	

Tabla 2.2. Mediadores químicos de la inflamación. PAF: factor activador de las plaquetas. (Tomado de Manual de Patología general; José Luis Pérez Arellano: 6ª edición; Masson, 2004)

Los mediadores plasmáticos forman sistemas con múltiples funciones biológicas, que se activan “en cascada” por mecanismos enzimáticos. Por su parte,

el grupo de los mediadores celulares incluye las aminas vasoactivas (histamina y serotonina), los biolípidos, los radicales libres (o especies reactivas) del oxígeno, el óxido nítrico, las enzimas lisosomales y las citoquinas proinflamatorias.

Un elemento esencial en la inducción de una respuesta de fase aguda y en algunas formas de síndrome de respuesta sistémica a la agresión es la producción de citoquinas proinflamatorias. Si la respuesta inflamatoria queda confinada localmente se producirá una lesión menor, pero si el estímulo inflamatorio es más importante generará una reacción sistémica generalizada que posteriormente disminuye y vuelve a la normalidad (figura 2.6).

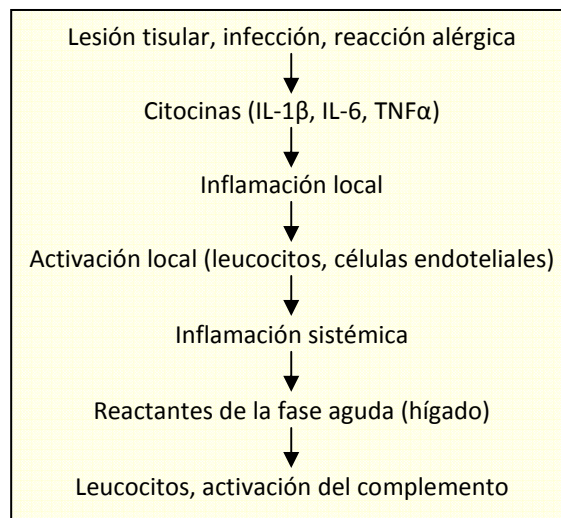


Figura 2.6. Mediadores de la respuesta inflamatoria local y sistémica.

Los síntomas clínicos más frecuentes de esta respuesta son fiebre, frío, somnolencia y falta de apetito, además de cambios importantes en los componentes de la sangre, tanto celulares como plasmáticos.

Una reacción inflamatoria similar se ve en pacientes con enfermedades crónicas, como artritis reumatoide, cáncer, aterosclerosis, enfermedades coronarias, etc. La elevación de las citoquinas, así como de otras moléculas de

señalización, se observan semanas o incluso meses antes de que se manifieste clínicamente la enfermedad.

Las más importantes citoquinas proinflamatorias son la interleucina 1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6). Las características comunes de estas tres citoquinas proinflamatorias son las siguientes:

- 1) Pueden ser sintetizadas y liberadas por múltiples estirpes celulares (inmunológicas y no inmunológicas), aunque su principal fuente son las células del sistema mononuclear fagocítico.
- 2) En condiciones basales son indetectables, y se liberan en respuesta a estímulos exógenos (e.g. microorganismos) o endógenos (tejido necrótico, inmunocomplejos, citocinas linfocitarias o antígenos tumorales).
- 3) Además de su acción proinflamatoria, modulan diversas fases de la maduración y activación linfocitaria.
- 4) No sólo participan en la inflamación, sino que también modifican otras funciones biológicas.
- 5) Su síntesis es inhibida por algunas citocinas linfocitarias (en particular por IL-4, IL-10 e IL-13) y por glucocorticoides.

-IL-1 β : Ha despertado gran interés en los últimos años como mediador de la respuesta inflamatoria aguda. Se produce fundamentalmente en los macrófagos activados. Sus propiedades proinflamatorias son muy amplias, induciendo: Fiebre, anorexia, somnolencia, hipotensión, shock, liberación de neuropéptidos, supresión de la síntesis del citocromo P-450, estimulación de la formación del

complemento, activación de células endoteliales, neutrofilia, aumento de moléculas de adhesión, degranulación de eosinófilos, infiltración leucocitaria (mediante la activación de IL-8) y activación de osteoclastos.

-*TNF- α* : Se corresponde con la clásica “caquectina” (una sustancia que se produce en algunas enfermedades como la coagulación intravascular diseminada), llamada así por el cuadro de caquexia¹ que produce su administración crónica a los ratones. El TNF- α tiene capacidad de producir necrosis de células de algunos tumores, propiedad que da origen a su actual denominación.

Esta citoquina se sintetiza en monocitos, macrófagos, linfocitos y células endoteliales. Tras su liberación se une a dos receptores anclados sobre la superficie celular, TNF-R1 y TNF-R2 (Asher y col., 1987; Nadel y col., 1996). Sus acciones proinflamatorias son:

Inhibir los efectos de varios factores de crecimiento sobre los progenitores mieloides; estimular la activación de linfocitos T y la proliferación de linfocitos B, aunque de forma menos intensa que IL-1 o IL-6; focalizar la respuesta inflamatoria, ya que induce la expresión de adhesinas de los leucocitos y de receptores para estas moléculas en el endotelio; activar los sistemas de defensa intracelulares y la expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase I; generar una oleada secuencial de interleucinas; suprimir la producción de células hematopoyéticas, lo cual conduce a un estado de inmunodeficiencia; y actuar sobre los hepatocitos dando lugar a un aumento de reactantes de fase aguda similar al inducido por la IL-1.

¹ Estado de debilidad generalizada que cursa con anorexia, atrofia muscular y fatiga.

-IL-6: Es una citoquina con una gran variedad de efectos biológicos. Se corresponde con el factor estimulante de los hepatocitos (FSH), siendo responsable de la elevación en sangre de varias proteínas durante la inflamación.

La IL-6 es una proteína sintetizada por los linfocitos T y B, monocitos, fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales, en respuesta a antígenos, mitógenos, lipopolisacáridos (endotoxinas), IL-1, TNF α , PAF (factor activador de plaquetas), virus, etc. Actúa sobre receptores celulares específicos presentes en diversos tipos celulares, incluyendo células inmaduras como las hematopoyéticas CD-34. Las células CD-4 (células que “dirigen” a los linfocitos y a los macrófagos al lugar de la infección o daño) y CD-8 (células implicadas en la finalización de la respuesta inmunológica) poseen también receptores para esta citoquina. Las acciones de la IL-6 son muy parecidas a las de la IL-1 y el TNF α (Asher y col., 1987; Nadel, 1996).

2.3.5. Factor de activación nuclear (NF- κ B)

El NF- κ B es un homodímero (compuesto por dos subunidades p50) o heterodímero (dos subunidades: p50-p65). Se encuentra en el citoplasma celular en forma inactiva, debido a su unión a una molécula de inactivación, la I- κ B. La fosforilización de ésta, que es dependiente de tirosina quinasa, libera el NF- κ B, que se desplaza al núcleo. En el núcleo es capaz de activar los genes de la inflamación. Las endotoxinas, al igual que otros factores de inducción, desencadenan una rápida fosforilización de un gran número de proteínas, entre ellas el I- κ B de los monocitos, macrófagos y linfocitos T.

El conocimiento en los últimos años de la Biología Celular a nivel molecular, ha permitido conocer la intervención del NF- κ B en el complejo

proceso de la inflamación. Así, este factor de transcripción nuclear desencadena la expresión de muchos genes proinflamatorios, como el $\text{TNF}\alpha$, IL-1, PAF, óxido nítrico (NO), prostaglandinas, leucotrienos o IL-8. Asimismo, es un inhibidor del activador tisular del plasminógeno (PAI-1), y también activa la expresión del factor tisular de la coagulación (tromboplastina) en las células endoteliales y en los monocitos. Activa la aparición de moléculas de adhesión como la P-selectina, E-selectina, ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular), VCAM-1 (molécula de adhesión endotelial).

Se considera que el NF- κ B está relacionado con enfermedades inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, asma, enfermedad inflamatoria intestinal, coagulación intravascular diseminada, así como con el fallo multiorgánico que se produce en la sepsis grave, que es el proceso de inflamación sistémica más representativo. También se ha encontrado NF- κ B activado en situaciones tan dispares como en el desarrollo de la placa de ateroma y en la mucosa bronquial del enfermo asmático (Hernández-Presa y col., 2003). De ahí la trascendencia terapéutica que puede tener el bloqueo de la activación del NF- κ B en la inflamación, especialmente a través de la inhibición de la fosforilización del I- κ B (Sears y col., 1998).

2.4. HIPERTENSIÓN ARTERIAL Y DAÑO CARDIACO ASOCIADO

2.4.1. Definición de Hipertensión arterial (HTA)

Desde el punto de vista fisiológico, la presión arterial (PA) es el producto resultante del volumen minuto cardíaco (gasto cardíaco) y de las resistencias vasculares periféricas ($\text{PA} = \text{VM} \times \text{RVP}$). Es decir, que la PA depende de la

fuerza con que el corazón impulsa a la sangre y de las resistencias periféricas que oponen las arterias. El volumen minuto está determinado por el volumen sistólico ventricular, la frecuencia cardiaca y la volemia, que a su vez está determinada por el consumo de sal, la capacidad del riñón para excretar Na^+ y agua y por diversas hormonas (aldosterona y vasopresina u hormona antidiurética) y mediadores (péptidos natriuréticos auriculares, prostaglandinas I_2 y E_2). A su vez, las RVP están determinadas por: 1) el diámetro de las pequeñas arteriolas (vasos de diámetro < 1 mm), resultado de la interacción de distintos factores vasoconstrictores (catecolaminas, angiotensina II, endotelina 1, serotonina, tromboxano A_2) y vasodilatadores (prostaglandinas, bradicinina, óxido nítrico, histamina, CO_2) sobre la contracción del músculo liso vascular; 2) la capacidad de autorregulación de los vasos de resistencia; 3) la estructura de la pared, que determina el diámetro interno vascular (Principios de Fisiopatología para la atención farmacéutica, 2007).

La hipertensión arterial se define como la elevación mantenida de la PA por encima de los límites normales. La siguiente tabla recoge la clasificación más reciente de los distintos niveles de presión arterial propuesta de manera conjunta por las Sociedades Europeas de Hipertensión y Cardiología:

Categoría	Sistólica		Diastólica
Óptima	< 120	y	< 80
Normal	120-129	y/o	80-84
En el límite alto de la normalidad	130-139	y/o	85-89
Hipertensión arterial de grado 1	140-159	y/o	90-99
Hipertensión arterial de grado 2	160-179	y/o	100-109
Hipertensión arterial de grado 3	≥ 180	y/o	≥ 110
Hipertensión sistólica aislada	≥ 140	y	< 90

Tabla 2.3. Definiciones y clasificación de las cifras de presión arterial. Los valores recogidos están expresados en milímetros de mercurio (mm Hg) (*European Society of Hipertensión-*

European Society of Cardiology: guidelines for the management of arterial hipertensión, 2007: J Hyp)

La hipertensión arterial ha de considerarse un factor de riesgo importante de enfermedades cardiovasculares, renales y cerebrovasculares. Este hecho, junto con la prevalencia elevada de hipertensión arterial en la población (Kearney y col., 2005) y la ausencia de manifestaciones clínicas que la hagan evidente, explica por qué en un informe de la organización mundial de la salud (OMS) se cita la hipertensión arterial como primera causa de muerte en todo el mundo (Ezzati y col., 2002).

En España, la prevalencia de la hipertensión arterial está cercana al 35%; a pesar de ello, sólo el 65% de la población hipertensa se halla diagnosticada, con un 85% de pacientes sometido a tratamiento. Las cifras son más alarmantes aún si consideramos que sólo el 25% de los hipertensos tratados están controlados. Una franja de población muy afectada por la hipertensión arterial es la que se sitúa por encima de los 60 años de edad; en estos casos, la prevalencia se eleva hasta casi un 70%, y sólo un 30% de los hipertensos controlados son mayores de 60 años.

El tratamiento de la hipertensión arterial debe relacionarse con una cuantificación del riesgo cardiovascular global. Este concepto se fundamenta en el hecho de que sólo una pequeña fracción de la población hipertensa presenta exclusivamente una elevación de la presión arterial, de modo que la inmensa mayoría tiene otros factores de riesgo añadidos (Kannel, 2002; Thomas y col., 2001; Mancia y col., 2005). Así, cuando están presentes de forma simultánea una alteración de la presión arterial y factores de riesgo metabólicos, los efectos se potencian entre sí, dando lugar a un riesgo cardiovascular global que es mayor que la suma de sus componentes individuales (Kannel, 2002). Existen evidencias de que, en los sujetos de riesgo cardiovascular global alto, los umbrales y

objetivos del tratamiento antihipertensivo, así como otras estrategias terapéuticas, deberían ser diferentes de los que se aplican en las personas de un riesgo cardiovascular global más bajo (European Society of Hipertensión- European Society of Cardiology: guidelines for the management of arterial hipertensión, 2007). A fin de maximizar el coste-efectividad del tratamiento de la hipertensión arterial, ha de graduarse la intensidad del abordaje terapéutico en función del riesgo cardiovascular total (De Backer y col., 2003), como se muestra en la siguiente tabla:

	Presión arterial (mm Hg)				
	Normal PAS120-129 ó PAD 80-84	Límite alto de normalidad PAS 130-139 ó PAD 85-89	HTA grado 1 PAS 140-159 ó PAD 90-99	HTA grado 2 PAS 160-179 ó PAD 100-109	HTA grado 3 PAS \geq 180 ó PAD \geq 110
Sin otros factores de riesgo	Riesgo medio	Riesgo medio	Riesgo añadido bajo	Riesgo añadido moderado	Riesgo añadido alto
1-2 factores de riesgo	Riesgo añadido bajo	Riesgo añadido bajo	Riesgo añadido moderado	Riesgo añadido moderado	Riesgo añadido muy alto
3 o más factores de riesgo, SM, LOS o diabetes	Riesgo añadido moderado	Riesgo añadido alto	Riesgo añadido alto	Riesgo añadido alto	Riesgo añadido muy alto
Enfermedad CV o Neuropatía establecida	Riesgo añadido muy alto	Riesgo añadido muy alto	Riesgo añadido muy alto	Riesgo añadido muy alto	Riesgo añadido muy alto

Tabla 2.4. Estratificación del riesgo CV en cuatro categorías. CV: cardiovascular; HTA: hipertensión arterial. PAD: presión arterial diastólica; PAS: presión arterial sistólica. Riesgo bajo, moderado, alto y muy alto alude al riesgo a los 10 años de presentar un episodio CV mortal o no mortal. El término “añadido” indica que, en todas las categorías, el riesgo es mayor que el riesgo medio. LOS: lesión orgánica subclínica; SM: síndrome metabólico. La línea intermitente indica cómo puede variar la definición de hipertensión arterial en función del grado de riesgo CV total. (Adaptado de: 2007 ESH-ESC *Guidelines for the Management of Arterial Hipertensión*).

Aunque sigue sin conocerse la causa precisa de la HTA, la presencia de los factores de riesgo siguientes aumenta la posibilidad de su desarrollo:

- Edad y sexo. Las mujeres presentan normalmente unas cifras más bajas de presión arterial sistólica que los varones en los grupos de edad de 30 a 44 años (Lawes y col., 2006: Part 1 y 2). Sin embargo, la presión arterial sistólica se eleva de manera más pronunciada con la edad en las mujeres que en los varones (Franklin y col., 1997), lo que significa que, a los 60 años de edad o más, las mujeres tienen una presión arterial más alta y una mayor prevalencia de hipertensión arterial. La relación continua entre presión arterial y enfermedad cardiovascular es semejante en ambos sexos, salvo la incidencia absoluta inferior de enfermedad coronaria en las mujeres antes de llegar a ancianas (Wilson y col., 1987). Con la edad, se produce una esclerosis vascular, con una disminución en la distensibilidad de la pared arterial que es responsable tanto del incremento en la frecuencia de la HTA sistólica aislada, como de cuadros de pseudohipertensión (Duprez, 2008).

- Raza. En hipertensos de raza afroamericana, la prevalencia de HTA y la morbimortalidad cardiovascular son más elevadas a cualquier edad para un determinado nivel de presión arterial que en los de raza blanca (Kaperonis y Bakris, 2003).

- Herencia. La hipertensión arterial esencial es una enfermedad multigénica y multifactorial. La prevalencia de HTA es superior entre los familiares de hipertensos (Roskopf y col., 2007; Fortunato y col., 2006). Se han relacionado diversos genes con la elevación mantenida de las cifras de presión arterial sistólica y diastólica, como el angiotensinógeno, óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS), enzima de conversión de angiotensina (ACE), receptores AT1 y β -adrenérgicos, y α -aductina (Flatman, 2007).

- Factores ambientales. El estrés, las emociones, el frío, el ruido ambiental, la profesión, etc., son factores que modulan los niveles de la presión arterial. La

personalidad es importante, siendo mayor la prevalencia de HTA en pacientes con ansiedad, depresión, conflictos de autoridad, tendencia al perfeccionismo, tensión contenida y mayor agresividad.

- Factores dietéticos. El excesivo consumo de alcohol (Rimm y col., 1999), sodio (Whelton y col., 1998) y sal (Sacks y col., 2001), el tabaco (Groppelli y col., 1992; Grassi y col., 1994), el sobrepeso (Daniels y col., 1996) y la vida sedentaria (Sandvick y col., 1993) son elementos que aumentan la presión arterial.

El tratamiento de la HTA es bastante complicado, y debe realizarse a varios niveles:

- Medidas higiénico-dietéticas. Han de instaurarse medidas relacionadas con los hábitos de vida en todos los pacientes, incluidos los sujetos con una presión arterial en el límite alto de la normalidad y los que precisan farmacoterapia. El objetivo es el de disminuir la presión arterial, controlar otras afecciones clínicas y reducir el número y dosis de antihipertensivos. Estas medidas relacionadas con los hábitos de vida son las siguientes: reducción del peso en caso necesario, reducción del aporte de sal, abandono del hábito tabáquico y reducción de consumo de alcohol en su caso, aumento de la actividad física, aumento del consumo de frutas y verduras y disminución de grasas saturadas y totales (Dickinson y col., 2006). Dado que el cumplimiento a largo plazo de las medidas relacionadas con los hábitos de vida es bajo y la respuesta de la PA es sumamente variable, ha de vigilarse estrechamente a los pacientes que reciben tratamiento no farmacológico a fin de iniciar la farmacoterapia cuando proceda y de una manera oportuna.

- Detección y tratamiento de otros factores de riesgo, como diabetes mellitus o hipercolesterolemia.

- Estratificación del riesgo cardiovascular global del sujeto para realizar intervenciones más intensas en los de mayor riesgo.

- Tratamiento farmacológico. Disponemos de una amplia batería de fármacos antihipertensivos utilizados en la actualidad: los **diuréticos**, **IECAs** (inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina), **ARAI** (antagonistas de los receptores de Angiotensina II), **betabloqueantes**, **calcioantagonistas** y **alfabloqueantes**. Estos fármacos nos permiten tratar a los pacientes de forma individualizada según las características de cada sujeto y confeccionar combinaciones entre ellos cuando los objetivos terapéuticos no son alcanzables con monoterapia (Figura 2.7).

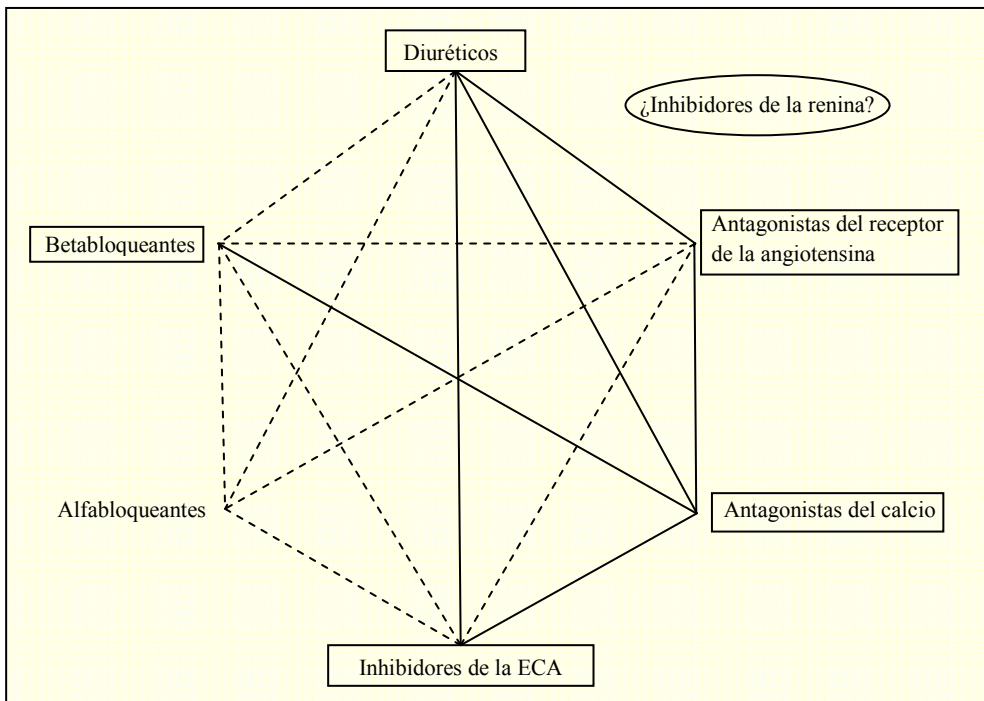


Figura 2.7. Posibles combinaciones entre algunos grupos antihipertensivos. Las combinaciones de elección en la población hipertensa general se representan con líneas gruesas. Los recuadros indican los grupos de fármacos que se ha comprobado que resultan beneficiosos en ensayos de intervención controlados.

Además de la amplia gama de fármacos de los que disponemos, actualmente se siguen estudiando nuevas terapias para el tratamiento de la HTA. En este sentido nos encontramos con Aliskiren, un fármaco nuevo que se dirige contra el sistema de la renina en su lugar de activación (Nguyen, 2006). Se ha comprobado que este **inhibidor directo de la renina** reduce con eficacia la presión arterial en caso de hipertensión, tanto en monoterapia como en combinación con un diurético tiazídico (Villamil y col., 2007; O'Brien y col., 2007; Gradman y col., 2005), así como que ejerce un efecto antiproteinúrico (Pilz y col., 2005). Se ha indicado que la renina podría tener efectos no relacionados con la cascada de renina-angiotensina clásica (Nguyen, 2006) y ser un factor pronóstico independiente de la producción de angiotensinaII (Alderman y col., 1991). Sin embargo, no se disponen de datos concluyentes de que esto sea así, ni de los efectos protectores cardiovasculares de la inhibición de la renina.

2.4.2. Órganos diana de la HTA

La HTA es una enfermedad sistémica, ya que afecta a varios órganos del cuerpo como el corazón, el riñón, las arterias, los ojos y el cerebro.

Corazón: Existe una relación continua entre el aumento de la presión arterial y el riesgo de determinados trastornos cardiacos como la enfermedad coronaria, la hipertrofia ventricular, la insuficiencia cardiaca, determinadas arritmias y la muerte súbita (Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic Heart failure, 2005: Eur Heart J). En el apartado siguiente haremos un análisis detallado del daño cardiaco asociado a la HTA.

Cerebro: Lo más peligroso a nivel cerebral es que se produzca una hemorragia intracerebral por rotura de algún vaso sanguíneo. Además, pueden

haber cuadros de isquemia cerebral (zonas que quedan sin irrigar y mueren) que comúnmente se traducen como parálisis de un lado del cuerpo (Stamler y col., 1993).

Riñón: La HTA puede ser causa para que el riñón se torne insuficiente. Cuando el riñón se daña, el pronóstico del paciente se hace más desfavorable; es por eso que hoy en día los facultativos solicitan la realización de controles periódicos de función renal a los pacientes hipertensos: microalbuminuria, depuración de creatinina, etc. (Hall, 2003; Staessen y col., 2003).

Ojos: Cuando no hay control de la hipertensión pueden producirse oftalmopatía hipertensiva y lesiones hemorrágicas a nivel de retina y nervio óptico que hacen que la visión se vuelva borrosa, pudiendo conducir a la ceguera (Dimmitt y col., 1989).

Sistema arterial: Las arterias se dilatan porque hay más presión dentro de ellas, y es fácil que se formen aneurismas y su posterior rotura. También las placas de colesterol se impregnan más en las arterias (ateroesclerosis), corriendo el riesgo de que se rompan y se generen trombos (Grundy y col., 2005). La HTA produce un incremento en el grosor de la pared vascular y una disminución de la luz del vaso, produciéndose endurecimiento de las arterias y cambios funcionales (Humphrey, 2008).

2.4.3. Estrés oxidativo e inflamación en la fisiopatología del daño cardiaco asociado a la HTA

En el apartado anterior se han descrito los órganos que se ven afectados por el desarrollo y mantenimiento de la HTA. Nosotros nos vamos a centrar en el

estudio de los cambios que se producen en el corazón como consecuencia de esta patología.

Como se indica en la tabla 2.4, la HTA es una de los principales factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares. La elevación de la presión sanguínea es responsable del 62% de los ataques al corazón y del 49% de las enfermedades coronarias (World Health Report 2002. Reducing risks, promoting healthy life. Geneva: WHO; 2002. <http://www.who.int/whr/2002>). Así, el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular aumenta progresivamente con el incremento de la presión sanguínea (He y McGregor, 2007).

La cardiopatía hipertensiva se define como el daño producido en el corazón del paciente hipertenso. La presencia de cardiopatía hipertensiva, bien en forma de hipertrofia ventricular izquierda (HVI), insuficiencia cardiaca (IC), cardiopatía isquémica (CI) o fibrilación auricular (FA) implica, como indicamos en el apartado 2.4.1, un peor pronóstico de la HTA (Lorell y Carabelo, 2000). Por todo ello, el tratamiento de la HTA debe relacionarse con la cuantificación del riesgo cardiovascular total.

Es importante, por tanto, orientar el objetivo terapéutico no sólo a disminuir las cifras de PA, sino a buscar la existencia de lesión en el órgano y, si la hubiese, iniciar el tratamiento más adecuado para evitar su progresión o, incluso, lograr la reversión del daño. Es más, en la era de la medicina preventiva en la que nos encontramos, debe de ser objetivo de la investigación el estudio de nuevas terapias antihipertensivas que hayan demostrado su eficacia como hipotensora y como protectora frente al desarrollo de las complicaciones cardiovasculares asociadas a la HTA.

- Hipertrofia ventricular izquierda: la HTA supone una enorme resistencia para el músculo cardiaco, de modo que el corazón está obligado a aumentar su masa muscular para hacer frente a ese sobreesfuerzo, desarrollándose un remodelado ventricular. En una primera fase, el crecimiento de la masa muscular es beneficioso pero, con el tiempo, acaba siendo perjudicial, ya que la mayor masa muscular no se acompaña de un aumento equivalente del riego sanguíneo, lo que puede producir insuficiencia coronaria y angina de pecho. Además, la HVI no sólo se produce a expensas de un aumento en el tamaño de los cardiomiocitos, sino que existe un aumento del espacio intersticial (constituido por fibroblastos y fibras de colágeno). Este aumento del tejido intersticial hace que el corazón tenga una peor capacidad de contraerse y relajarse, y provoca una disfunción de los vasos de pequeño calibre intramiocárdicos (Lorell y Carabelo, 2000).

- Insuficiencia cardiaca: aunque se han identificado otros factores de riesgo para el desarrollo de esta patología, como el infarto agudo de miocardio, la diabetes mellitus, la enfermedad valvular, la HVI y la miocardiopatía, la HTA es la condición más comúnmente detectada en pacientes que desarrollan IC (Himmelman, 1999).

La IC se puede clasificar según el daño predominante de la función del ventrículo izquierdo en: IC sistólica (disminución de la contractilidad ventricular) e IC diastólica (alteración de la distensibilidad y la relajación del VI). La HTA puede llevar a cualquiera de las dos, a través de la HVI si la disfunción es diastólica o a través de la CI si la disfunción es sistólica (Ducher y col., 2008).

- Cardiopatía isquémica: se estima que la HTA está implicada, directa o indirectamente, en más del 90% de los casos de CI (Kaplan, 2003: Capítulo 4, Waverly Hispanica). Esta alteración consiste en la incapacidad de las arterias coronarias para llevar el oxígeno necesario a un determinado territorio del

músculo cardíaco, lo que dificulta el funcionamiento de éste. Sus principales consecuencias son el infarto agudo de miocardio y la angina de pecho, pero también puede manifestarse como una muerte súbita (Kaplan, 2003: Capítulo 4, Waverly Hispanica).

- Fibrilación auricular: la FA es una arritmia, identificable en el electrocardiograma, que surge cuando la contractilidad de las aurículas deja de producirse al unísono (como latido único) y no coopera con los ventrículos, por lo que se experimentan unos latidos más fuertes y otros más débiles que tienen una cadencia irregular (Verdecchia y col., 2003). El 57% de los pacientes que sufre una FA son hipertensos (Bertomeu Martínez y Núñez Pernas, 2007). Tanto la disfunción diastólica como la HVI están íntimamente relacionadas al riesgo de aparición de FA y, como hemos visto anteriormente, ambas condiciones se producen como consecuencia de la HTA (Levy y col., 1998; Verdecchia y col., 2003; Kannel, 2004).

Según lo indicado anteriormente, como consecuencia de la HTA se producen una serie de alteraciones en el corazón, que se traducen en cambios morfológicos y funcionales (hipertrofia, fibrosis, arritmias, etc.). Cada vez son más los estudios que señalan al sistema renina-angiotensina (SRA) como sistema fisiopatológico implicado en el daño cardíaco asociado a la HTA (Das y col., 2004; Touyz, 2005; Lahera y col., 2007; Valko y col., 2007; Cuspidi y col., 2008; Marchesi y col., 2008). Aunque el SRA fue descrito primariamente como un sistema circulante originado en el riñón, muchos de sus componentes han sido localizados en el tejido cardíaco y en los vasos sanguíneos, ejerciendo sus efectos en cardiomiocitos, células endoteliales y células de la musculatura lisa vascular (Cuspidi y col., 2008). El SRA ejerce sus funciones a través de su principal

molécula efectora, la angiotensina II (Ang II), que es un potente péptido vasoactivo formado a partir del Angiotensinógeno (Figura 2.8).

La Ang II altera la estructura cardíaca e incrementa la rigidez miocárdica y los procesos inflamatorios en las células cardíacas, conduciendo a la disfunción sistólica, diastólica y arritmias (Campbell y col., 1995; Wolf y Wenzel, 2004; Touyz, 2004; Schmieder, 2005; Cuspidi y col., 2008). Está demostrado que la Ang II desempeña un papel crucial en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca (Baker y col., 1990; Schunkert y col., 1990; Sadoshima y Izumo, 1993; Sadoshima y col., 1993; Van Kesteren y col., 1997; Gray y col., 1998; Harrison y col., 2003), fibrosis cardíaca (Schorb y col., 1993; Crabos y col., 1994; Villarreal y col., 1998; Tokuda y col., 2004; Paul y col., 2006), disfunción del ventrículo izquierdo (Schunkert y col., 1990; Leri y col., 1998; Dostal y Baker, 1999; Cifuentes y Pagano, 2006) y fibrilación auricular (Kannel y col., 1998; Verdecchia y col., 2003; Schmieder y col., 2006), procesos todos que pueden llegar a desarrollarse en el paciente hipertenso.

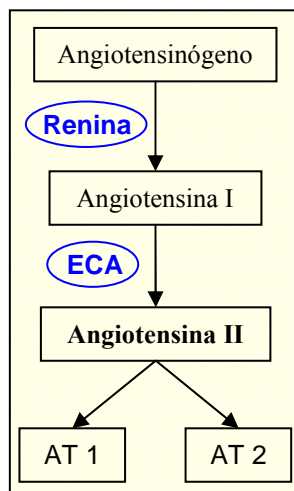


Figura 2.8. Componentes del SRA. ECA: enzima convertidora de la angiotensina; AT1: receptor de angiotensina II, subtipo 1; AT2: receptor de angiotensina II, subtipo 2.

Estos efectos de la Ang II están mediados por complejas rutas de señalización intracelular, activadas por la unión de dicho péptido con sus receptores específicos, denominados receptores AT-1 y AT-2 (Murphy y col., 1991; Touyz y Schiffrin, 2000; Saito y Berk, 2001; Sowers, 2002). En humanos, el receptor AT-1 está extensamente expresado en vasos sanguíneos, corazón, riñón, glándulas adrenales e hígado, mientras que el receptor AT-2 está presente principalmente en el tejido fetal, decreciendo rápidamente después del nacimiento (Touyz, 2005); en el adulto se encuentra (aunque a bajas concentraciones) en pared vascular, corazón, sistema nervioso central y ovarios (Kakar y col., 1992; Lahera y col., 2007). La unión de Ang II con su receptor AT-1 induce hipertrofia en los cardiomiocitos, fibrosis, y afecta a la contractilidad del tejido cardíaco, conduciendo a su remodelado (Touyz y Schiffrin, 2000; Kaschina y Unger, 2003; Lahera y Cachofeiro, 2005). Por el contrario, la unión de Ang II a su receptor AT-2 parece que neutraliza el efecto producido por AT-1, estimulando la vasodilatación y la apoptosis (Rogg y col., 1996; Touyz y Schiffrin, 2000; Lahera y Cachofeiro, 2005; Lahera y col., 2007).

Como se muestra en la figura 2.9, la unión de la Ang II con su receptor AT-1 en la célula cardíaca estimula a una serie de proteínas como fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa D (PLD), fosfolipasa A₂ (PLA₂), proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa Src, proteína tirosina quinasa (PTK) y fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K) (Lassegue y Clempus, 2003; Touyz, 2005), que inducen la producción de radicales libres de oxígeno por varias rutas, siendo la activación de la enzima NADPH oxidasa la principal fuente de estos radicales libres en el sistema cardiovascular (Guzik y col., 2000; Kameda y col., 2003; Das y col., 2004; San José y col., 2004; Touyz, 2005; Paul y col., 2006; Sirker y col., 2007; Marchesi y col., 2008; Puddu y col., 2008).

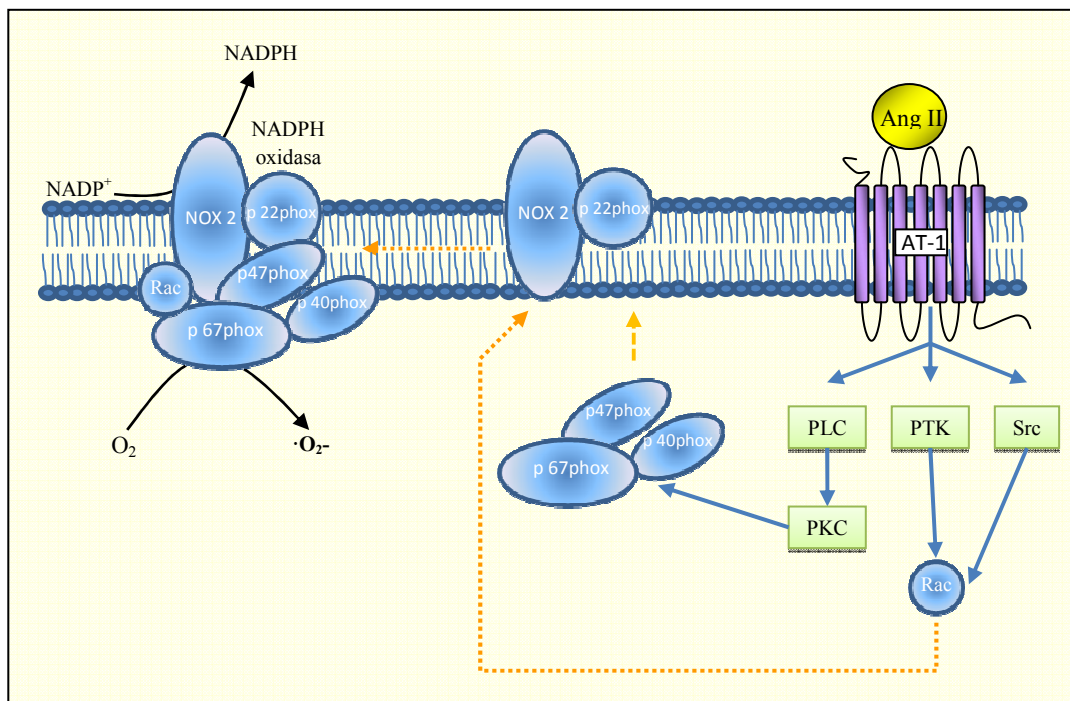


Figura 2.9. Activación y ensamblaje de la enzima NADPH oxidasa en la célula cardíaca. Ang II: angiotensina II; AT-1: receptor de la angiotensina II, tipo 1; PLC: fosfolipasa C; PKC: proteína quinasa C; PTK: proteína tirosina quinasa; Src: proteína quinasa Src.

La enzima NADPH oxidasa no fagocítica activa está compuesta por las siguientes subunidades: citocromo b 558 (formado por las subunidades NOX 2 y p22phox), p40phox, p47phox, p67phox y Rac (Babior y col., 2002; Oudot y col., 2003; Ozaki y col., 2003; Nishida y col., 2005). En células no activadas, p40phox, p47phox, p67phox y Rac se encuentran en el citosol de la célula, mientras que el citocromo b está en la membrana. Cuando la célula es activada (figura 2.10), se produce una fosforilación de la subunidad p47phox (mediante la activación de PKC, provocada a su vez por la estimulación de PLC tras la unión de la Ang II a su receptor AT-1), que desencadena la formación de un complejo compuesto por las subunidades p40phox, p47phox y p67phox. Este complejo se transloca hacia la

membrana, donde junto con Rac (estimulada por PTK y Src, proteínas quinasas activadas también por la unión de Ang II y AT-1) se asocia al citocromo b 558, formándose la enzima NADPH oxidasa funcional (Chabrashvili y col., 2002; Lassegue y Clempus, 2003; Touyz y Schiffrin, 2003; Babior, 2004; Touyz, 2004).

Es importante aclarar en este punto que la NADPH oxidasa fue originariamente considerada como una enzima expresada en las células fagocíticas, donde el citocromo b558 estaba formado por las subunidades gp91phox y p22phox (phox = *phagocyte oxidase*). En los últimos años se han encontrado pruebas de que existe toda una familia de NADPH oxidasas (expresadas también en células no fagocíticas), basadas en el descubrimiento de distintas homologías de la subunidad gp91phox (Geiszt, 2006; Cave y col., 2006). Las nuevas homologías de gp91phox son actualmente denominadas como la familia NOX de la NADPH oxidasa. Como se muestra en la tabla 2.5, se han identificado 5 isoformas distintas de NOX (denominadas NOX 1-5), con un elevado porcentaje de homología entre ellas (Paravicini y Touyz, 2008; Sirker y col., 2007). Las isoformas principalmente expresadas en el miocardio son NOX 2 y NOX 4 (Byrne y col., 2003; Ago y col., 2004; Murdoch y col., 2006).

Isoformas NOX	Situación predominante en el organismo
NOX 1	Colon y células vasculares
NOX 2	Subunidad catalítica en fagocitos, corazón y riñón
NOX 3	Riñón fetal y oído interno adulto
NOX 4	Muy extendida: riñón, corazón, células vasculares
NOX 5	Bazo, glándulas mamarias, esperma y cerebro

Tabla 2.5. Isoformas de la familia NOX de la NADPH oxidasa.

Como se muestra en las figuras 2.9 y 2.10, la NADPH oxidasa cataliza la producción de $\cdot\text{O}_2^-$ por la reducción de 1 electrón del oxígeno usando NADPH como donador de electrones. A partir de este radical libre se forman el resto de ROS mencionadas en el apartado 2.2.1: H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ y ONOO^- (Taniyama y Griendling, 2003).

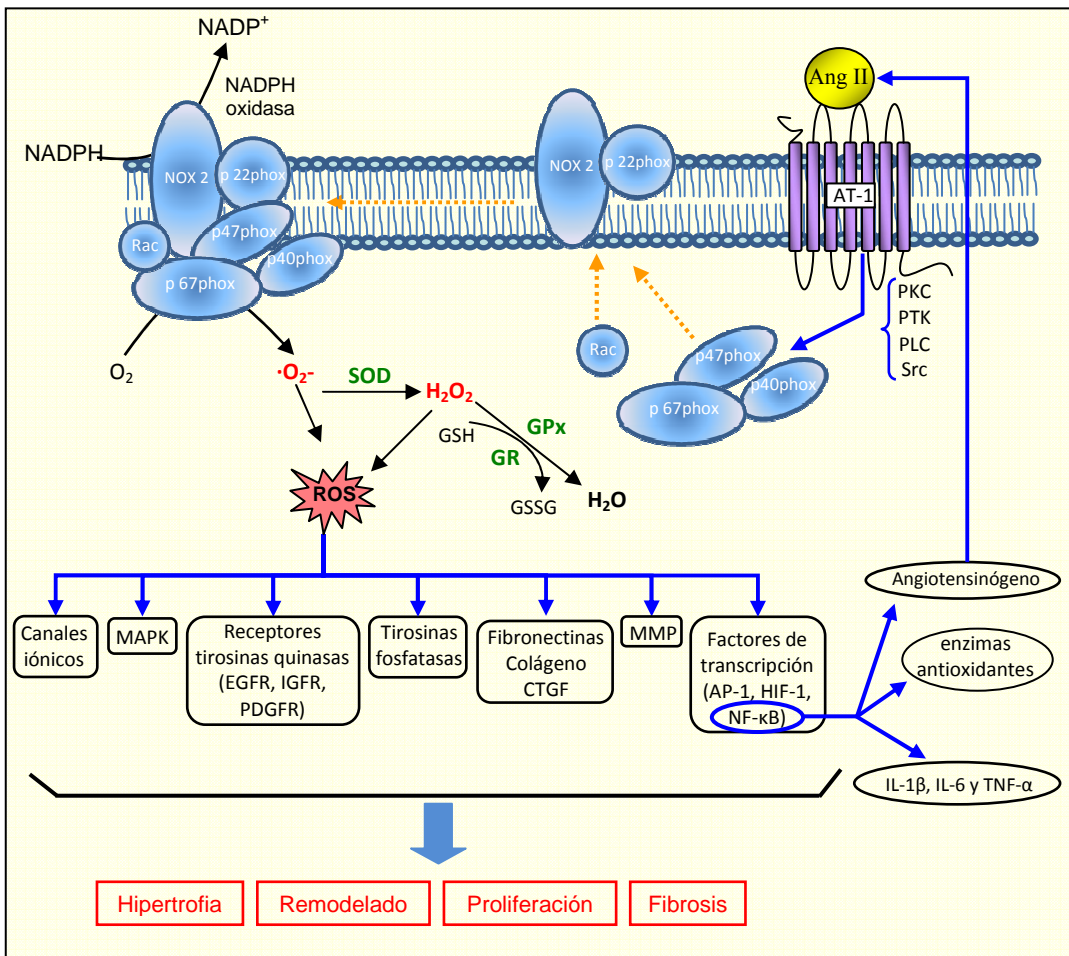


Figura 2.10. Generación de los cambios estructurales y funcionales en la célula cardíaca mediados por la Ang II. La unión de la Ang II a su receptor AT-1 activa a la NADPH oxidasa, generándose ROS. Las ROS actúan como moléculas señalizadoras, estimulando a determinados canales iónicos, MAPK, receptores de las tirosinas quinasas, fibronectina, colágeno, CTGF, MMP y factores de transcripción, y desactivando a las tirosinas fosfatasas. Todas estas rutas conducen a

cambios estructurales y funcionales en la célula cardiaca que darán lugar a la cardiopatía hipertensiva. MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógeno; EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; IGFR: receptor del factor de crecimiento sensible a insulina; PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas; CTGF: factor de crecimiento de tejido conectivo; MMP: metaloproteinasa de la matriz.

Tanto en humanos como en modelos experimentales de hipertensión, la HTA y el daño en las células cardiacas se han asociado con un incremento del estrés oxidativo mediado por la acción de la NADPH oxidasa (Parik y col., 1996; Cai y Harrison, 2000; Chisolm y Steinberg, 2000; Bendall y col., 2002; Ignaro y col., 2002; Steinberg y Witztum, 2002; Cai y col., 2003; Bandyopadhyay y col., 2004; Khan y col., 2004; Kasparova y col., 2005; Das y col., 2006; Feletou y Vanhoutte, 2006; Ward y Croft, 2006; Valko y col., 2007; Puddu y col., 2008). También se ha demostrado que el estrés oxidativo inducido por ROS desempeña un papel importante en varias enfermedades cardiovasculares, como arteriosclerosis, fallo cardiaco, isquemia, cardiomiopatías, hipertrofia cardiaca y fallo cardiaco congestivo (Kukreja y Hess, 1992). Además, la prueba de que la Ang II induce la activación de la NADPH oxidasa y la generación de ROS en la patología cardiaca está demostrada por el hecho de que los inhibidores de la enzima NADPH oxidasa, los supresores de radicales libres (Suematsu y col., 2003; Zhang y col., 2003) y los bloqueantes del receptor AT-1 (Crabos y col., 1994; Villarreal y col., 1998; Zhang y col., 2003; Paul y col., 2006) atenúan los efectos adversos de la Ang II (Whaley-Connell y col., 2007).

El aumento en la producción de las ROS por la activación de la NADPH oxidasa (estimulada, como hemos comentado, tras la unión de la Ang II con su receptor AT-1), provoca un desbalance entre estas especies reactivas y los mecanismos de defensa antioxidante, conduciendo a un deterioro de la función cardiaca mediada por la oxidación de los lípidos de membrana, mutaciones del

ADN y deterioro de ciertas proteínas, conduciendo a la disfunción celular o a la muerte celular por apoptosis o necrosis (González y col., 2003; Seddon y col., 2007).

Las ROS (especialmente $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2) actúan como moléculas de señalización intracelular (figura 2.10), activando múltiples moléculas señalizadoras, incluidas las MAP quinasas (MAPK), receptores de la tirosina quinasa (EGFR, IGFR y PDGFR), proteínas tirosinas fosfatasa, canales iónicos, factores de transcripción sensibles al estado redox (NF- κ B, AP-1 y HIF-1), metaloproteinasas de la matriz (MMP) y la expresión de fibronectinas, colágeno y CTGF (factor de crecimiento de tejido conectivo) (Nathan, 2003; Touyz, 2005; Dworakowski y col., 2006; Seddon y col., 2007; Sirker y col., 2007). La activación de todas estas moléculas señalizadoras posibilitan la generación de hipertrofia, remodelado, proliferación y fibrosis en la célula cardiaca (Virag y Murry, 2003; Kinnula y col., 2005; Iglarz y col., 2004; An y col., 2007; Sirker y col., 2007). Los mecanismos por los que las ROS activan todas estas rutas señalizadoras de remodelado no están claros (Hirotsani y col., 2002; Nathan, 2003; Molavi y Mehta, 2004). Por todo esto, en la actualidad, la inhibición de la NADPH oxidasa y la Ang II es considerada, al menos experimentalmente, como un posible objetivo en el tratamiento de la HTA y el daño cardiaco asociado (Hamilton y col., 2004).

Aunque la principal fuente de generación de las ROS en el sistema cardiovascular es la activación de la enzima NADPH oxidasa, existen otras rutas capaces de producir estos radicales libres en la célula cardiaca mediante:

- 1) Desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial.

2) Activación del sistema xantina óxido reductasa, que a través de la xantina oxidasa (XO) sintetiza ROS.

3) Desacoplamiento de la síntesis de NO. La enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS), en ausencia de sus cofactores L-arginina y BH₄ (tetrahidrobiopterina), fluctúa desde un estado acoplado (generando NO) hacia un estado desacoplado (generando radicales superóxido). El NO está considerado como una potente sustancia vasodilatadora que modula la función, crecimiento y remodelado del cardiomiocito (Feil y col., 2003; Takimoto y Kass, 2007). El NO realiza esta función debido a que actúa como antioxidante, inhibiendo la activación de la XO (Hassan y col., 1995; Cote y col., 1996) y de la NADPH oxidasa (Shinyashiki y col., 2004), manteniendo la homeostasis normal de $\cdot\text{O}_2^-$ / NO e inhibiendo la señal intracelular que llevará a hipertrofia y disfunción cardíaca (Takimoto y Kass, 2007). Cuando la enzima eNOS está en un estado desacoplado por la acción de ROS, se favorece la formación de peroxinitritos, con lo que se estimula el estrés nitrosativo y se reduce la biodisponibilidad del NO.

Además del estrés oxidativo, son muchos los investigadores que ponen de manifiesto que los mediadores inflamatorios son importantes en la cardiopatía hipertensiva, contribuyendo al remodelado cardíaco (Savoia y Schiffrin, 2006; Miranda y col., 2007; Marchesi y col., 2008). Diversos estudios han demostrado niveles elevados de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α), moléculas de adhesión (ICAM, y VCAM) y proteína C reactiva (PCR) en la insuficiencia cardíaca (Paulus, 2000; Abrams, 2003).

Como hemos visto en el apartado 2.3, la inflamación es un proceso muy complejo que puede surgir en los tejidos como respuesta a situaciones patológicas. Normalmente conduce a la recuperación y restauración del tejido, pero si la reparación no está controlada, el proceso inflamatorio puede llevar a un

persistente daño tisular (Marchesi y col., 2008). Parece ser que la principal ruta de señalización que pone en funcionamiento el proceso inflamatorio es iniciada por las ROS inducidas por la NADPH oxidasa activada por Ang II. Las ROS, como hemos mencionado anteriormente, activan distintas moléculas señalizadoras, entre las que se encuentra el factor de transcripción NF- κ B (Savoia y Schiffrin, 2006; Marchesi y col., 2008), mediante la fosforilación de I κ B. Esta fosforilación provoca la translocación de las subunidades p65/p50 de NF- κ B al núcleo, donde se activarán los genes que codifican para las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Kopp y Ghosh, 1994; Traenckner y Baeuerle, 1995; Ghosh, 2000; Ghosh y Karin, 2002; Hayden y Ghosh, 2004; Hall y col., 2006; Doughan, 2008). Además, NF- κ B: 1) estimula los genes que codifican la expresión de angiotensinógeno, amplificando, por tanto, la respuesta inflamatoria mediada por Ang II (Amar y col., 2002; Costanzo y col., 2003; Miranda y col., 2007; Marchesi y col., 2008); y 2) regula la expresión génica de los distintos enzimas antioxidantes (Zhou y col., 2001; Gou y col., 2003; Marczin y col., 2003; Ji y col., 2007) (figura 2.10).

Existen pruebas experimentales que apoyan esta teoría, ya que se han encontrado que altos niveles de citoquinas reproducen el fenotipo de la insuficiencia cardiaca (incluyendo disfunción y remodelado ventricular), cardiomiopatía y pérdida progresiva de cardiomiocitos por apoptosis (Thaik y col., 1995). En humanos, niveles séricos elevados de TNF- α , IL-6 y PCR se asocian a un riesgo mayor de desarrollar insuficiencia cardiaca (Sato y col., 2005). Deswall y Mann (2005) han demostrado la relación existente entre los niveles de TNF- α y IL-6 y la mortalidad por problemas cardiacos.

El efecto de las citoquinas proinflamatorias sobre el corazón es el siguiente:

- *TNF- α* : en el tejido cardíaco, las células que se han identificado como productoras de TNF- α son los macrófagos, las células endoteliales y los propios cardiomiocitos (Torre-Amione y col., 1995). Tiene efectos en la disminución de la función contráctil y altera la homeostasis del calcio (Janczewski y col., 2003), el acople excitación-contracción, el metabolismo del NO (Balligand y col., 1993) y la señalización a través de segundos mensajeros (Thielmann y col., 2002). Se ha visto que ratones transgénicos que sobreexpresan el TNF- α en el miocardio presentan hipertrofia cardíaca y fibrosis (Kubota y col., 1997; Sivasubramanian y col., 2001).

- *IL-6*: al igual que TNF- α , aumenta su síntesis ante el daño cardíaco (Deten y col., 2002). Se ha visto que su expresión se encuentra elevada en diversas patologías cardiovasculares, como el fallo cardíaco crónico (Roig y col., 1998; Cesari y col., 2003), infarto agudo de miocardio (Neumann y col., 1995), así como el daño asociado a la isquemia (Sawa y col., 1998). Diversos estudios demuestran que esta citoquina tiene un efecto negativo sobre la contractilidad cardíaca (Finkel y col., 1992; Kinugawa y col., 1994; Sugishita y col., 1999).

- *IL-1 β* : al igual que las otras dos citoquinas pro-inflamatorias, aumenta su expresión en el daño cardíaco (Ono y col., 1998; Mann, 2003: Ann Rev Physiol). Esta citoquina tiene efectos sobre el corazón inhibiendo la contractilidad cardíaca (Hosenpud y col., 1989), e induce hipertrofia de los miocitos cardíacos (Suzuki y col., 2001).

2.5. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTIINFLAMATORIAS DE LA L-CARNITINA

Además de la función de la LC como cofactor esencial para la transformación de los ácidos grasos en energía metabólica (apartado 2.1.1), existen otros efectos de la LC que la hacen beneficiosa en algunas patologías cardiovasculares (Lango y col., 2001; Calvani y col., 2004; Ferrari y col., 2004; Kendler, 2006), aunque no se conocen con exactitud los mecanismos de acción por los que realiza esta función. Así, parece estar demostrado el efecto beneficioso del tratamiento con LC en pacientes con lesión del músculo cardíaco provocada por isquemia (Lopaschuk, 2000; Pastoris y col., 1997). Además, se ha observado que el tratamiento con LC incrementa la concentración de ATP y el metabolismo de la glucosa en ratas isquémicas (Broderick y col., 1993), disminuye los ésteres de ácidos grasos en el miocardio (Pieper y murria, 1987; Lango y col., 2001) y tiene un efecto positivo y dosis dependiente en la protección del ventrículo y en la contractilidad del músculo cardíaco isquémico en perros (Lango y col., 2001).

Por otra parte, la administración de LC disminuye la mortalidad después del infarto agudo de miocardio (Arsenian y col., 1996), así como el diámetro del ventrículo izquierdo en el fallo cardíaco congestivo (Anand y col., 1998).

La LC mejora la tolerancia al ejercicio físico en pacientes con fallos cardíacos (Rizos, 2000), angina de pecho (Iyer y col., 2000) y en enfermedades arteriales periféricas (Hiatt y col., 2001).

También han sido propuestos otros derivados de la carnitina en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares. Así, la propionil L-carnitina (PLC) es capaz de proteger al endotelio arterial contra los radicales libres (Bertelli y col., 1991), atenuar la hipertrofia ventricular (Schonekess y col., 1995),

disminuir la incidencia de isquemia relacionada con arritmias y fibrilación ventricular en corazones de cerdos (Duan y Moffat, 1991; Lango y col., 2001) y provocar una menor incidencia de arritmias en pacientes hemodialíticos (Lango y col., 2001) y en pacientes que han sufrido infarto de miocardio (Cacciatore y col., 1991).

Como se describió en el apartado 2.1.4, el uso de la LC está aprobado en distintas patologías cardiovasculares. Aunque en la actualidad no se conocen con exactitud cuáles son los mecanismos de acción implicados en este efecto, parece que las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de la LC (Onem y col., 2006; Dokmeci y col., 2005) podrían estar involucradas en ellas.

- La LC como sustancia antioxidante:

En los últimos años se han publicado una serie de trabajos que ponen de manifiesto las propiedades antioxidantes de la LC. Así, se ha demostrado la acción antioxidante de la LC y sus derivados en enfermos de Alzheimer (Dhitavat y col., 2005; Mancuso y col., 2007), cáncer (Gramignano y col., 2006), hemodiálisis (Calvani y col., 2004; Calo y col., 2006), diabetes mellitus (Solfrizzi y col., 2006), epididimitis en vesícula-próstata (Vicari y Calogeno, 2001), pacientes con fallos cardiacos (Hoppel, 2003; Pauly y Pepine, 2003; Calo y col., 2006), enfermedades neuronales (Virmani y col., 2005; Calabrese y col., 2006) y en ratas envejecidas (Arockia Rani y Panneerselvam, 2001).

La administración de LC en ratas con hipertensión inducida por administración de fructosa aumenta los niveles plasmáticos de las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx y glutation transferasa, así como de las vitaminas C y E (Rajasekar y col., 2007). La LC actúa como sustancia depuradora de radicales libres (Kalaiselvi y col., 1998; Arockia y Panneerselvam, 2001; Sitta y

col., 2008), protegiendo a las células de las ROS (Sushamakumari y col., 1989; Mister y col., 2002) mediante una reducción de estas especies reactivas comparable a la ejercida por el antioxidante natural α -tocoferol y su análogo Trolox (Gulcin, 2006). Asimismo, se ha comprobado que la LC produce un aumento de la defensa antioxidante en el corazón y un incremento en la biodisponibilidad del NO en ratas con hipertensión espontánea, SHR² (Gómez-Amores y col., 2006 y 2007).

En el año 2002, Arockia Rani y Panneerselvam demostraron que la LC era capaz de disminuir la formación de ácido tiobarbitúrico (TBA, sustancia utilizada como índice de peroxidación lipídica) en corteza cerebral, cerebelo, hipotálamo e hipocampo en ratas de 24 meses de edad. Resultados similares fueron encontrados en hígado y corazón de ratas adultas (Chowdhury y col., 2007) y en túbulos renales de pacientes isquémicos tras la administración de PLC (Mister y col., 2002)

Tanto la LC como la PLC mejoran la disfunción endotelial en aortas de ratas SHR, aumentando la actividad de SOD y CAT, la disponibilidad de NO y la expresión de eNOS (Bueno y col., 2005; Alvarez de Sotomayor y col., 2007).

El aumento de la producción de ROS viene determinado por una activación de la NADPH oxidasa iniciada por altos niveles de Ang II, como ya se ha comentado. La administración de LC ha mostrado una disminución de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), en ratas con hipertensión inducida por una dieta rica en fructosa (Rajasekar y col., 2008). Asimismo se ha observado una disminución en la expresión génica de la subunidad p22phox después de la

² Spontaneously hypertensive rats.

administración crónica de LC en aorta de ratas SHR (Gómez- Amores y col., 2006).

Por otra parte, ha sido demostrado el efecto protector de la LC en la cardiomiopatía producida por la administración de adriamicina, un fármaco ampliamente utilizado en la quimioterapia anticancerígena (Hong y col., 2002). Parece ser que este efecto es debido a las propiedades antioxidantes de la LC, ya que ésta es capaz de disminuir los niveles de peroxidación lipídica y aumentar la actividad de GSH (Luo y col., 1999; Sayed- Ahmed y col., 2001) en tejidos cardiacos de ratas tratadas con adriamicina. Efectos similares han sido encontrados, tras la administración de LC, en riñón (Boonsanit y col., 2006) y en hígado (Zeidan y col., 2002) de ratas expuestas al tratamiento con el citado antitumoral. Además, Yoon y col., en 2003, obtuvieron una mejora de la actividad de las enzimas CPT I y CPT II (cuyo déficit está descrito como una de las posibles causas de esta cardiomiopatía) en el corazón de ratas tratadas simultáneamente con adriamicina y LC. Adicionalmente, Sayed-Ahmed y col., en 1999, pusieron de manifiesto que el uso de la LC para prevenir el daño metabólico inducido por la adriamicina no interfería con la actividad antitumoral del fármaco.

- La LC como sustancia antiinflamatoria:

Los efectos de la LC en los procesos inflamatorios están bastante poco identificados en la actualidad. Podemos destacar que se ha sugerido una acción antiinflamatoria de la LC en pacientes con colitis ulcerosa distal (Gasbarrini y col., 2003) y en pacientes sometidos a hemodiálisis (Savica y col., 2004; Laviano y col., 2006).

En el año 1995, Winter y col. Observaron, tras la administración de LC en modelos de ratas con choque séptico y cáncer, una disminución en los niveles

plasmáticos de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α . También se ha observado que la LC es capaz de disminuir los niveles séricos de TNF- α en ratas con artritis (Tastekin y col., 2007), en pacientes con fallos cardiacos (Vescovo y col., 2002; Kumar y col., 2007) y en pacientes con SIDA tratados con zidovudina (De Simona y col., 1993).

La LC reduce los niveles de TNF- α , IL-1 β y PCR en ratas que presentaban fallos cardiacos (Vescovo y col., 2002; Famularo y col., 2004; Savica y col., 2004). Por su parte, Ilias y col. (2004) demostraron que la LC y la acetil-L-carnitina disminuyen los niveles séricos de TNF- α en pacientes infectados con HIV y en la terapia antirretroviral. Finalmente, la PLC induce la inhibición del crecimiento y un incremento de la apoptosis en las células del músculo liso, inhibiendo la activación de NF-kB y regulando la expresión de la proteína inhibitoria I κ B (Orlandi y col., 2007).

- La LC en la HTA:

El primer estudio que puso en evidencia una posible relación entre la LC y el desarrollo de la hipertensión arterial fue realizado por Foster y col. en 1985. Estos autores mostraron que las ratas hipertensas presentaban alteraciones en el metabolismo de la LC, modificándose el contenido de la misma con respecto a las normotensas. Posteriormente, Digiesi y col. (1994) demostraron el uso beneficioso de la LC en pacientes hipertensos, observándose una mejora de la función cardiaca y una reducción en los niveles plasmáticos de colesterol

Rauchová, en 1998, demostró por primera vez que el tratamiento con LC reducía la presión sanguínea en ratas SHR y que esta sustancia no tenía efecto sobre sus controles normotensas WKY (ratas de la cepa Wistar Kyoto). Este estudio, además, puso de manifiesto la reducción de los niveles plasmáticos de

colesterol total y triglicéridos inducida por la LC. Finalmente, cabe indicar el efecto hipotensor de la LC en ratas hechas hipertensas mediante la administración de fructosa (Rajasekar y col., 2007).

Como se menciona en el apartado 2.4, la HTA genera un daño en el tejido cardiaco que parece estar originado por el SRA. De este modo, la Ang II, mediante la activación de la NADPH oxidasa, genera estrés oxidativo (determinado por un desbalance entre las sustancias oxidantes y antioxidantes presentes en el corazón) e inflamación, provocando cambios estructurales y funcionales en las células cardiacas. Con estos antecedentes, y puesto que cada vez son más las investigaciones que proponen a la LC como sustancia antioxidante y antiinflamatoria, parece razonable plantear como hipótesis la existencia de alguna conexión entre la LC y la HTA.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y TRATAMIENTOS

Para la realización de este estudio se han empleado ratas machos consanguíneas de la cepa Wistar procedentes del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla, recibidas con 8 semanas de edad. A lo largo de este estudio, los animales se dividían aleatoriamente en 4 grupos tras alcanzar las 12 semanas de edad (250-300g): un grupo control, al que denominaremos WISTAR, y 3 grupos sometidos a un tratamiento crónico¹ con: i) 300 mg² de L-carnitina (L-3-hidroxi-4-N,N,N-trimetilaminobutirato); ii) 35 mg de L-NAME (N⁰-nitro-L-arginina metil éster), y iii) LC + L-NAME a las dosis anteriormente citadas; estos grupos los denominaremos como WLC, WLN y WLNLC, respectivamente. Todos los tratamientos se disolvían en el agua de bebida y se mantenían durante 12 semanas.

Durante el periodo experimental, los animales se han mantenido en condiciones estándar (23 ± 1 °C, ciclos de 12 horas luz/12 horas oscuridad), y se han alimentado *ad libitum* con pienso comercial (Panlab S.L.) y con libre acceso al agua de bebida (en la cual iba disuelto el tratamiento, en su caso). Además, semanalmente se han realizado medidas de presión arterial sistólica y diastólica, así como controles de peso y del volumen de ingesta líquida para poder ajustar los correspondientes tratamientos a las dosis indicadas. Los experimentos se han realizado siguiendo las legislaciones actualmente en vigor a nivel internacional, nacional y autonómico, en las que se incluye documentación completa del “convenio europeo sobre protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos”³.

¹ 12 semanas de duración.

² Por Kg de peso y día.

³ BOE nº 256 de 25 de Octubre de 1990; BOE nº 252 de 21 de Octubre de 2005; BOJA nº 237 de 10 de Diciembre de 2003.

Una vez finalizado el período de tratamiento, se procedía al sacrificio de los animales, siempre a primera hora de la mañana y previo ayuno de 18-24 horas.

3.2. PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS

- Ácido acético glacial, *Panreac*, España. Art. 141008.
- Ácido Azobis(2-aminopropano) dihidrocloruro (AAPH), *Wako Chemicals*, EEUU. Art. 017-11062.
- Ácido bórico, *Merck*, Alemania. Art. 1.00165.0500
- Ácido clorhídrico, *Panreac*, España. Art. 141019.
- Ácido 5,5'-Ditiobis(2-nitrobenzoico) (DNTB), *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. D-8130.
- Ácido etilendiaminotetraacético disódico (EDTA·Na₂), *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. E-1644.
- Ácido etilenglicol-bis-(aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. E-4378.
- Ácido 3-hidroxi-4-[2-sulfo-4-(sulfofenilazo) fenilazo]-2,7-naftalenodisulfónico (Ponceau S), *Sigma Chemical Company*, EEUU. Art. P-3504.
- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox), *Sigma Chemical Company*, EEUU. Art. 23,881-3.
- Ácido metafosfórico (MPA), *Sigma Chemical Company*, EEUU. Art.M6288.
- Ácido N,N,N,N'-tetrametil-etilenodiamina (TEMED), *Bio-Rad*

Laboratories, EEUU. Art. 76512C.

- Ácido N-(2-hidroxiethyl)piperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), *Sigma Chemical Company*, EEUU. Art. H-3375.
- Ácido ortofosfórico al 85%, *Merk*, Alemania. Art. 1005731000.
- Ácido perclórico, *Panreac*, España. Art. 142175.
- Ácido polioxietilensorbitano monolurato (Tween 20), *Sigma Chemical Company*, EEUU. Art. P1379.
- Ácido 2-tiobarbitúrico, *Sigma Chemical Company*, EEUU. Art. T-5500.
- Acrilamida/Bisacrilamida al 30%, *Bio-Rad Laboratories*, EEUU. Art. 67784.
- ADNc purificación (kit comercial), *GE Healthcare Life Sciences*, Reino Unido. Art. 27-9602-01.
- Agarosa, *Pronadisa (Conda)*, España. Art. 8014.
- Albúmina de suero bovino (BSA), *Sigma Chemical Company*, EEUU. Art. A-6793.
- *Aspergillus* nitrato reductasa, *Roche Applied Science*, Alemania. Art. 10981249001.
- Azida sódica, *Sigma Chemical Company*, EEUU. Art. S-2002.
- Azul de bromofenol, *Sigma Chemical Company*, EEUU. Art. B-8026.
- *Bio-Rad Protein Assay* (reactivo coloreado concentrado), *Bio-Rad Laboratories*, Alemania. Art. 500-0006.
- Bicarbonato sódico, *Sigma Chemical Company*, EEUU. Art. S-5761.
- Bromuro de etidio, *Sigma Chemical Company*, EEUU. Art. B-8026.

- 1-Butanol, *Panreac*, España. Art. 141082.
- Butilhidroxitolueno (BHT), *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. B-1378.
- L-carnitina, *Roig Farma*, España. Art. 32183-25.
- Cianuro potásico, *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. 20,781-0.
- Citocromo C, *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. C-3006.
- Cloroformo, *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. C-2432.
- Cloruro magnésico hexahidratado, *E. Merck*, Alemania. Art.105813..
- Cloruro potásico, *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. P-4504.
- Cloruro sódico, *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. S-9888.
- Colesterol (kit comercial), *Spinreact*, España. Art. 1001090.
- Desoxinucleósidos trifosfato (dNTP), *Roche Applied Science*, Alemania. Art. 1 277 049.
- Dietil éter anestésico, *Panreac*, España. Art. 192770.
- Dietilpirocarbonato (DEPC), *Mo Bio*, U.S.A. Art. 17011-200.
- Ditiotreitól (DTT), *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. D-0632.
- Dodecil sulfato sódico (SDS), *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. L-4509.
- ECL AdvanceTM Western Blotting Detection Kit, *GE Healthcare Life Sciences*, Reino Unido. RPN 2135.
- Etanol absoluto, *Merck*, Alemania. Art. 1.00983.1000.
- *FastStart SYBR Green Master*, *Roche Applied Science*, Germany. Art.

04673514001.

- Ferricianuro potásico, *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. P-3667.
- Factor de Necrosis Tumoral alfa (Kit comercial de ELISA), *Pierce Biotechnology*, EEUU, Art. 1482.1.
- Fluoresceína (3',6'-dihidroxiestero (isobezofran-1[3H],9'[9H]-xanten-3-ona), *Fluka*, EEUU. Art. 46960.
- Fosfato potásico monobásico, *Panreac*, España. Art. 141509.
- Fosfato tripotásico, *Panreac*, España. Art. 141513.
- Gammaglobulina bovina, *Bio-Rad Laboratories*, Alemania. Art. 500-0005.
- Glicerol, *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. G-5516.
- Glicina, *Sigma Chemical Company*, EEUU. Art. G-8898.
- Glucosa 6-fosfato (G6P), *Roche*, Alemania. Art. 127647.
- Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), *Sigma Chemical Company*, EEUU. Art. G-5760.
- Glutation reducido/Glutation oxidado (GSH/GSSG) (kit comercial), *Oxis Research*, Foster City, EEUU.
- Glutation oxidado (GSSG), *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. G-4376.
- Glutation peroxidasa (kit comercial), *Randox Laboratories*, Reino Unido. Art. RS 505.
- Glutation reductasa (kit comercial), *Randox Laboratories*, Reino Unido. Art. GR 2368.
- Glutation reducido (GSH), *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. G-4251.

- Glutation reductasa, *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. G-3664.
- Hemoglobina, *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. H-3883.
- Hidroperóxido de cumeno, *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. C-0524.
- Hidróxido potásico, *Panreac*, España. Art. 121515.
- Hidróxido sódico, *Panreac*, España. Art. 141687.
- Interleucina 1 beta (Kit comercial de ELISA), *Pierce Biotechnology*, EEUU. Art.1402.2.
- Interleucina 6 (Kit comercial de ELISA), *Pierce Biotechnology*, EEUU. Art. 1368.2.
- Isopropanol, *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. I-9516.
- Kit para detección de *Western blotting* (*ECL Advance*), *GE Healthcare Life Sciences*, EEUU. Art. RPN2135.
- Leche desnatada en polvo, *Bio-Rad Laboratories*, EEUU. Art. 210001991.
- D-Manitol, *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. M-4125.
- Marcador de 100 pares de bases, *Gensura Laboratories Inc*, EE.UU. Art. 438-7872.
- 2-Mercaptoetanol, *Sigma Chemical Company*, EEUU. Art. M3148.
- Metanol, *Panreac Química*, España. Art. 131091.
- β -Nicotinamín adenín nucleótido fosfato, forma reducida (NADPH), *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. N-6505.
- Nitrito sódico, *Merck*, Alemania. Art. 6549.
- Peróxido de hidrógeno, *Merck*, Alemania. Art. 1.07209.0250.

-
- Persulfato de amonio, *Bio-Rad Laboratories*, EEUU. Art. 150735.
 - Protease inhibitor cocktail tablets, *Roche Applied Science*, Alemania. Art. 11697498001.
 - Reactivo Drabkin para determinación de hemoglobina, *Spinreact*, España. Art. 1001230.
 - Reactivo de Griess-Ilosvays, *Merck*, Alemania. Art 1090230500.
 - Retrotranscripción (kit comercial), *GE Healthcare Life Sciences*, Reino Unido. Art. 27-9264-01.
 - Sacarosa, *Probus*, España. Art. 176820.
 - Sulfato magnésico heptahidratado, *Merck*, Alemania. Art. 136855.
 - Superóxido dismutasa (kit comercial), *Randox Laboratories*, Reino Unido. Art. SD 125.
 - Taq polimerasa (kit comercial), *GE Healthcare Life Sciences*, Reino Unido. Art. 27-0799-61.
 - 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP), *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. T-1642.
 - 1,1,3,3-Tetraetoxipropano (TEP), *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. T-9889.
 - Triglicéridos (kit comercial), *Biosystems*, España. Art. 11828.
 - Tripure, *Roche Applied Science*, Alemania. Art. 1667 157.
 - Tris-hidroximetil-aminometano (TRIZMA[®], Tris), *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. T-1378.
 - Xantina, *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. X-2502.

- Xantina oxidasa, *Sigma Chemical Company*, EE.UU. Art. X-4875.0.

3.3. CONTROLES DE PESO, VOLUMEN DE INGESTA LÍQUIDA Y PRESIÓN ARTERIAL

Una semana antes del inicio de los tratamientos, se ha realizado un seguimiento diario del peso corporal y del volumen de líquido ingerido en 24 horas para el control y ajuste del tratamiento a seguir, como se indica en el apartado 3.1. Desde el inicio del tratamiento y hasta el día del sacrificio se ha medido semanalmente el peso corporal y el volumen de líquido ingerido (para ir ajustando el tratamiento en caso necesario), así como los valores de presión arterial sistólica y diastólica (PAS y PAD) de los animales.

Para medir la presión arterial se ha empleado el método indirecto de oclusión en la cola, utilizando un medidor de presión NIPREM 645 (CIBERTEC, España). En este sistema, las señales recogidas se traducen a través de un sistema de adquisición de datos acoplado al medidor de presión y con soporte informático.

El procedimiento a seguir es el siguiente: los animales se inmovilizan en el interior de cepos cilíndricos y se les coloca la cola debajo de una lámpara de infrarrojos durante 10-15 minutos, evitando someterlos a otros estímulos externos y controlando que la temperatura local no sea superior a 37 °C; de este modo se consigue la vasodilatación necesaria para que los pulsos cardiacos sean lo más definidos posible. Transcurrido este tiempo, se desconecta la fuente de calor y se coloca el manguito presurizador y el transductor de pulsos cardiacos en la cola de los animales (figura 3.1.). A continuación, se aumenta la presión del manguito colapsando completamente la arteria caudal. En este momento, la señal del pulso

queda atenuada completamente. El momento en el que aparece de nuevo el pulso es cuando la presión del manguito iguala a la presión sistólica de la rata. La despresurización continúa aumentando progresivamente la señal del pulso, de manera que la presión diastólica corresponde al momento en el que el pulso se hace de nuevo homogéneo y recobra prácticamente su valor inicial.

Los valores de presión arterial sistólica y diastólica de cada rata se han calculado a partir de la media aritmética de 3-4 mediciones sucesivas, realizadas siempre a la misma hora de la mañana y evitando en la medida de lo posible crear situaciones de estrés en el animal durante el proceso.

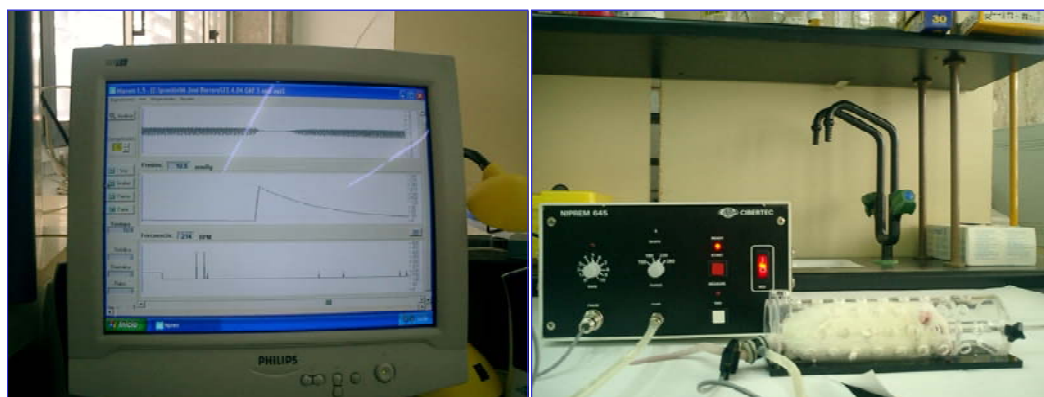


Figura 3.1. Imágenes del instrumental utilizado para la medición de la presión sanguínea en los cuatro grupos experimentales de ratas. En la fotografía de la izquierda se aprecian los registros obtenidos procedentes del análisis; la figura de la derecha ilustra la adquisición de datos mediante el método indirecto de la oclusión de la cola, utilizando el registrador NIPREM 645.

3.4. OBTENCIÓN DE SANGRE HEPARINIZADA Y PLASMA

Una vez transcurridas las 12 semanas de tratamiento y recogidas las muestras de orina, se procede al sacrificio de los animales para la obtención de sangre y la posterior extracción del corazón, órgano objeto de nuestro estudio. Los

animales, previo ayuno de 18-24 horas, se anestesian con pentobarbital por vía inhalatoria antes de su sacrificio. A continuación, antes de proceder a la extirpación del corazón, se extraen aproximadamente 5 mL de sangre mediante punción cardiaca directa con agujas de calibre 0,26x25 mm (23G), y se introduce inmediatamente en tubos heparinizados para evitar la formación del coágulo. De estos 5 mL de sangre heparinizada separamos 1560 μ L (alícuotados en: 60 μ L para la determinación de hemoglobina, 250 μ L para glutatión oxidado, GSSG; 125 μ L para glutatión reducido, GSH; 125 μ L para actividad glutatión peroxidasa, GPx; 500 μ L para actividad glutatión reductasa, GR, y 500 μ L para actividad superóxido dismutasa, SOD). A continuación centrifugamos el resto de la sangre heparinizada a 3.000 r.p.m. durante 20 minutos a temperatura ambiente para separar el plasma. Posteriormente, el plasma se recoge con ayuda de una pipeta Pasteur de cristal y se divide en alícuotas de 0.5-1 mL, las cuales se conservan a -80 °C hasta el momento de su análisis.

3.5. OBTENCIÓN DEL CORAZÓN

Una vez extraída la sangre, se procede al sacrificio del animal, se extrae el corazón y se disecciona el ventrículo izquierdo (VI), el cual se lava con suero fisiológico frío (solución de NaCl al 0.9% p/v a 4°C) y se seca brevemente en papel de filtro. Posteriormente, se pesa el VI y se congela por inmersión en nitrógeno líquido, conservándose a -80°C hasta su uso.

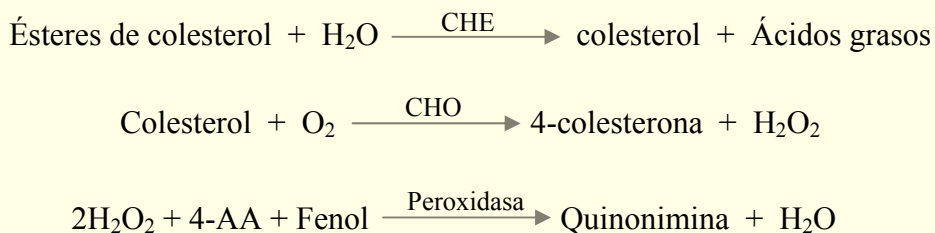
3.6. DETERMINACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO

Con el objetivo de definir el estado lipídico de cada uno de los cuatro grupos experimentales de trabajo, hemos analizado la cantidad de colesterol y triglicéridos presentes en el plasma sanguíneo.

3.6.1. Determinación de colesterol total en plasma

El colesterol es una sustancia grasa presente en todas las células del organismo. El hígado produce naturalmente todo el colesterol que necesita para formar las membranas celulares y producir ciertas hormonas. La determinación de colesterol es una de las herramientas más importantes para el diagnóstico y clasificación de las lipemias, de manera que una hipercolesterolemia se considera una de los principales factores de riesgo cardiovascular.

La determinación de colesterol total en suero se ha realizado mediante un método enzimático colorimétrico, utilizando el kit comercial de laboratorios *Spinreact*. La enzima colesterol esterasa (CHE) hidroliza los ésteres de colesterol presentes en la muestra, generando colesterol libre y ácidos grasos. Una posterior oxidación enzimática mediante la colesterol oxidasa (CHO) da lugar a H_2O_2 y colesterona. El H_2O_2 se valora por la reacción de Trinder, mediante un cromógeno, fenol y 4-aminoantipirina (4-AA), en presencia de peroxidasa, formando una quinonimina cuya coloración, encarnada, es proporcional a la concentración de colesterol total presente en la muestra (Naito y Kaplan, 1984; Meiattini y col., 1978):



3.6.1.1. Composición de los medios

- Reactivo 1:

Pipes (pH = 6.9)	90 mM
Fenol.....	26 mM

- Reactivo 2 (liofilizado):

Colesterol esterasa (CHE).....	300 U/L
Colesterol oxidasa (CHO).....	300 U/L
Peroxidasa	1250 U/L
4-Aminofenazona (4-AF).....	0.4 mM

- Reactivo 3 (solución estándar):

Colesterol	200 mg/dL
------------------	-----------

3.6.1.2. Protocolo experimental

Se disuelve, con agitación suave, el contenido del reactivo 2 en el reactivo 1. Esta solución es estable durante 4 meses a 2-8 °C ó 40 días a temperatura ambiente y protegida de la luz.

Procesamos el blanco de reactivo y el estándar por duplicado y la muestra por triplicado de la siguiente forma: sobre una semimicrocubeta se añade 1 mL de

la mezcla de reactivos para el blanco, 1 mL de reactivo y 10 μ L de solución estándar en el caso del estándar, y para la muestra 1 mL de reactivo y 10 μ L de muestra. Se mezcla bien y se deja incubar durante 5 minutos a 37 °C, para proceder posteriormente a la lectura de las absorbancias (A) a una longitud de onda de 505 nm frente al blanco de reactivo.

Las concentraciones de colesterol en suero las obtenemos realizando el siguiente cálculo:

$$\text{mg/dL de colesterol} = (A \text{ muestra} / A \text{ estándar}) \times \text{concentración de estándar (200 mg/dL)}$$

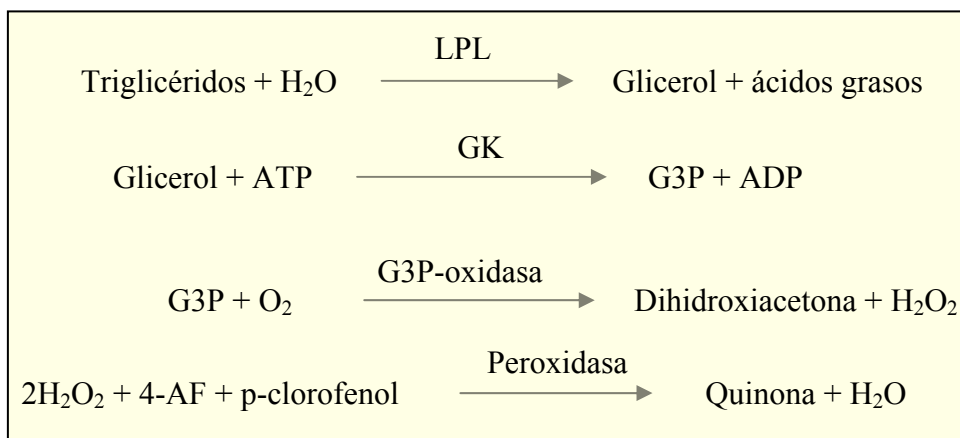
3.6.2. Determinación de triglicéridos en plasma

Los triglicéridos son grasas que suministran energía a la célula. Al igual que el colesterol, son transportados a las células del organismo por las lipoproteínas plasmáticas.

La determinación de triglicéridos se ha realizado utilizando un kit comercial de laboratorios *Spinreact*. Es un ensayo colorimétrico en el cual los triglicéridos, por acción de diferentes enzimas, se transforman en un compuesto coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.

Los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por ATP, en presencia de glicerol quinasa (GK), para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por G3P-oxidasa. Al final, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, en una reacción catalizada por la enzima peroxidasa, dando lugar a una coloración roja

(siendo la intensidad de esta coloración proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra ensayada) (Buccolo y col., 1973:Clin Chem; Fossati y col., 1984: clin chem; Kaplan y col., 1984:clin chem):



3.6.2.1. Composición de los medios

- Reactivo 1:

GOOD pH = 7.5 50 mM
p-Clorofenol 2 mM

- Reactivo 2:

LPL 15000 U/L
GK 500 U/L
G3P-oxidasa 2500 U/L
Peroxidasa 440 U/L
4-AF 0,1 mM

- Reactivo 3 (solución estándar):

Triglicéridos 200 mg/dL

3.6.2.2. Protocolo experimental

Se disuelve, con agitación suave, el contenido de un vial de reactivo 2 en el frasco de reactivo 1. La estabilidad de esta solución resultante es de 6 semanas a 2-8°C o una semana a 15-25°C.

Procesamos el blanco de reactivo y el estándar por duplicado y la muestra por triplicado de la siguiente forma: sobre una semimicrocubeta se añade 1 mL de la mezcla de reactivos para el blanco, 1 mL de reactivo y 10 µL de solución estándar en el caso del estándar, y para la muestra 1 mL de reactivo y 10 µL de muestra. Se mezcla bien y se deja incubar durante 5 minutos a 37 °C, para proceder posteriormente a la lectura de las absorbancias (A) a una longitud de onda de 505 nm frente al blanco de reactivo.

Las concentraciones de triglicéridos en suero las obtenemos realizando el siguiente cálculo:

$$\text{mg/dL de triglicéridos} = (A \text{ muestra} / A \text{ estándar}) \times \text{concentración de estándar} \\ (200 \text{ mg/dL})$$

3.7. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA L-CARNITINA EN ERITROCITOS

3.7.1. Determinación de Hemoglobina

La determinación de hemoglobina se ha realizado por una técnica espectrofotométrica basada en el método descrito por Drabkin (1965). La hemoglobina es oxidada por la acción del ferricianuro a metahemoglobina, que se

convierte en cianometahemoglobina por la acción del cianuro potásico. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de hemoglobina presente en la muestra ensayada.

3.7.1.1. Composición de los medios

- Reactivo 1 (Reactivo de Drabkin):

Ferricianuro de potasio 0,6 mM

Cianuro de potasio 0,9 mM

Dihidrógeno fosfato de potasio 2 mM

- Solución estándar de Hemoglobina:

Hemoglobina 15 g/dL

3.7.1.2. Protocolo experimental

Se prepara el reactivo de Drabkin añadiéndole 245 mL de agua bidestilada a 5 mL del reactivo 1 (50X). La estabilidad de esta solución resultante es de 2 semanas a 2-8°C y protegidos de la luz.

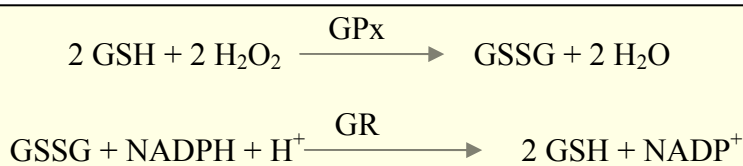
Sobre cubetas macro de 4 mL de capacidad se añaden 2,5 mL de reactivo de Drabkin diluido y 10 µL de sangre heparinizada (o estándar de hemoglobina), se mezclan y se deja durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se ajusta el espectrofotómetro con el blanco de reactivo y se efectúan las lecturas, a 540 nm, de las absorbancias (A) de las muestras y el estándar.

El cálculo de las concentraciones de hemoglobina en las muestras se realiza de la siguiente forma:

$$\text{g/dL Hemoglobina} = [\text{Amuestra/Aestándar}] \times \text{concentración de estándar (15 g/dL)}$$

3.7.2. Determinación de la actividad glutathion peroxidasa (GPx) en eritrocitos

Para la determinación de la actividad GPx en eritrocitos hemos utilizado un kit comercial de los laboratorios Randox, basado en el método descrito por Paglia y Valentine (1967). Este método se basa en que esta enzima cataliza la oxidación de glutathion (GSH) por cumeno hidroperóxido. En presencia de glutathion reductasa (GR) y de nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH), el glutathion oxidado (GSSG) vuelve a su forma reducida a expensas de la oxidación del NADPH; la desaparición de éste se valora midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm:



3.7.2.1. Preparación de las muestras

Se mezclan 50µL de sangre heparinizada con 1 mL de reactivo diluyente y 1 mL de reactivo de Drabkin. Una vez mezclado se deja reposar durante 10 minutos a 4 °C. No es necesario centrifugar la muestra, ya que no hay posibilidad de interferencias plasmáticas al no existir esta enzima en plasma. Por el contrario, la adición del reactivo de Drabkin se debe a que en la sangre de rata existen peroxidasa que podrían dar lugar a falsos positivos, de manera que la adición de cianida (incluida en el reactivo Drabkin) elimina estas posibles interferencias. Por

otro lado, la adición del reactivo diluyente permite convertir la enzima glutatión peroxidasa a su forma reducida, debido a que en forma oxidada también sería inactivada por la cianida.

3.7.2.2. Composición de los medios

- Reactivo 1 (liofilizado):

GSH..... 4 mM

GR..... 0.5 U/L

NADPH..... 0.34 mM

- Solución tampón fosfato:

$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ (pH = 7,2) 50 mM

EDTA 4.3mM

- Solución cumeno hidroperóxido:

Cumeno hidroperóxido 0.18 mM

- Reactivo diluyente

- Reactivo de Drabkin

3.7.2.3. Protocolo experimental

Se reconstituye 1 vial del reactivo liofilizado con 10 mL de tampón fosfato, siendo esta mezcla reactiva estable durante 2 días a 2-8 °C. A continuación, se diluyen 10 μL de la solución de cumeno hidroperóxido con 10 mL de agua bidestilada (estable hasta la fecha de caducidad indicada en el frasco comercial). Por último, se reconstituye el reactivo diluyente con 200 mL de agua bidestilada (estable durante 30 días a 2-8 °C). Una vez preparado los reactivos se procede al ensayo de la siguiente forma:

Sobre una cubeta semimicro de 1,5 mL de capacidad, se mezclan 0,02 mL de muestra (diluida 8-10 veces con H₂O bidestilada), 1 mL de mezcla reactiva y 0,04 mL de solución de cumeno hidroperóxido, y se agita. Inmediatamente se mide la absorbancia inicial a 340 nm de la muestra y del blanco, poniendo en marcha el cronómetro de forma simultánea. Después de 1 minuto se leen de nuevo las absorbancias, restándole a la muestra el valor del blanco (procesado de manera análoga pero sustituyendo los 0,02 mL de muestra por 0,02 mL de H₂O bidestilada).

El cálculo de la actividad de la enzima GPx, expresado en función de la cantidad de hemoglobina, se realiza de la siguiente forma:

$$U/g \text{ Hb} = [\Delta A(\text{min}) \times V_f / (\epsilon \times d \times V_m \times C)] \times \text{Dil}$$

donde:

U = $\mu\text{mol}/\text{minuto}$.

$\Delta A(\text{min})$ = incremento de absorbancia en un minuto, valor absoluto.

V_f = volumen final en la microcubeta (en mL).

ϵ = coeficiente de absorción para el NADPH, equivalente a $6,22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

d = paso de luz de la cubeta, 1 cm.

V_m = mL de muestra.

C = concentración de hemoglobina de la muestra (g/mL).

Dil = dilución de la muestra.

3.7.3. Determinación de la actividad glutatión reductasa (GR) en eritrocitos

La GR es una flavoenzima dependiente del NADPH, que cataliza la reducción del GSSG a GSH; el GSH puede entonces ser usado por la GPx para la reducción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y de peróxidos orgánicos (ROOH), los cuales son elementos tóxicos (Camera y Picardo, 2002).

Para la determinación de la actividad de la enzima GR se ha utilizado el kit comercial de los laboratorios Randox, que sigue el método descrito por Calberg y Mannervik (1975). Este método consiste en determinar, espectrofotométricamente, la disminución de absorbancia a 340 nm debida a la oxidación del NADPH por acción de la enzima, como hemos visto en el apartado anterior:



3.7.3.1. Preparación de las muestras

Se centrifugan 0,5 mL de sangre heparinizada a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C, para separar y eliminar el plasma. A continuación se lavan 5 veces los eritrocitos con 1,5 mL de solución de NaCl al 0,9%, centrifugando durante 5 minutos a 3.000 r.p.m. después de cada lavado. El centrifugado lavado de eritrocitos se lleva a 0,5 mL con agua bidestilada fría para conseguir el hemolizado de los eritrocitos, dejando reposar 10 minutos a 4 °C, para posteriormente volver a centrifugar el lisado durante 5 minutos a 2000 r.p.m. Finalmente, se realiza una dilución 1/20 de este hemolizado de eritrocitos con agua bidestilada antes de proceder a la medida.

3.7.3.2. Composición de los medios

- Reactivo 1 (tampón fosfato):

KH₂PO₄/KOH (pH = 7,3) 250 mM

EDTA 0.5 mM

- Reactivo GSSG:

GSSG 2.2 mM

- Reactivo NADPH:

NADPH..... 0.17 mM

3.7.3.3. Protocolo experimental

Se reconstituye el contenido de 1 vial del substrato GSSG con 5 mL del tampón fosfato para formar la mezcla reactiva. Posteriormente se reconstituye 1 vial del reactivo NADPH con 3 mL de agua bidestilada (ambas soluciones son estables durante 2 días a 2-8 °C).

Sobre una semimicrocubeta se añade 1 mL de mezcla reactiva y 40 µL de muestra (diluida 20 veces con solución salina, 0,9% NaCl), y se mezcla bien. A continuación, se añaden 0,2 mL de NADPH y se mezcla de nuevo. Posteriormente, se procede a la lectura del incremento de absorbancia durante 1 minuto, frente a aire.

El cálculo de la actividad de la enzima GR, expresado en función de la cantidad de hemoglobina, se realiza de la siguiente forma:

$$U/g \text{ Hb} = [[\Delta A(\text{min}) \times V_f / (\epsilon \times d \times V_m \times C)] \times \text{Dil}] \quad \text{donde:}$$

U = nmol/minuto.

$\Delta A(\text{min})$ = incremento de absorbancia en un minuto, valor absoluto.

V_f = volumen final en mL en la microcubeta.

ϵ = coeficiente de absorción para el NADPH expresado como $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

d = paso de luz de la cubeta, 1cm.

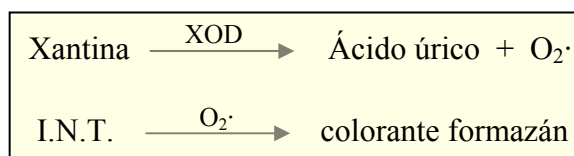
V_m = mL de muestra.

C = cantidad de hemoglobina de la muestra (g/mL).

Dil = dilución de la muestra.

3.7.4. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) en eritrocitos

Para la determinación de esta enzima hemos utilizado un kit comercial de los laboratorios Randox, el cual se basa en el método descrito por Arthur y col. (1985). Este método emplea la xantina y xantina oxidasa (XOD) para formar radicales superóxido, que reaccionan con el compuesto cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio (I.N.T.) para formar un colorante formazán rojo:



La actividad superóxido dismutasa se mide a partir del grado de inhibición de esta reacción, teniendo en cuenta que una unidad de SOD es la que causa un 50% de inhibición en la reducción de I.N.T. bajo las condiciones del ensayo.

3.7.4.1. Preparación de las muestras

Se centrifugan 0,5 mL de sangre heparinizada durante 5 minutos a 3.000 r.p.m., y se retira el plasma. A continuación se realizan cinco lavados de los eritrocitos con 1.5 mL de solución de NaCl al 0,9%, centrifugando durante 5 minutos a 3.000 r.p.m. después de cada lavado. El centrifugado lavado de eritrocito se completa con 2 mL de H_2O bidestilada fría y se deja reposar durante 15 minutos a 4 °C. El lisado resultante es diluido con 0.01 M de una solución tampón de fosfato a pH = 7, de manera que el porcentaje de inhibición resultante se encuentre entre 30 y 60%.

3.7.4.2. Composición de los medios

- Solución diluyente Randsod:
KH₂PO₄/KOH (pH = 7) 10 mM
- Sustrato mixto:
Xantina 0.05 mM
I.N.T. 0.025 mM
- Solución tampón:
CAPS (pH = 10.2)..... 40 mM
EDTA 0.94 mM
- Solución Xantina oxidasa:
Xantina Oxidasa 80 U/L
- Solución patrón:
Patrón 3.88 U/mL

3.7.4.3. Protocolo experimental

Como hemos señalado, los eritrocitos lavados se diluyen (1/25) con la solución diluyente Randsod, de forma que el porcentaje de inhibición resultante oscile entre 30 y 60%.

La concentración de los patrones (P) empleados en la curva patrón han sido 0.162 U/mL (P₁); 0.485 U/mL (P₂); 0.97 U/mL (P₃); 1.94 U/mL (P₄) y 3.88 U/mL (P₅).

Sobre una cubeta semimicro se añaden 0,05 mL de patrón o de la muestra de eritrocitos previamente diluida y 1,7 mL de sustrato mixto, y se mezcla bien.

Se añaden 0,25 mL de xantina oxidasa, se mezcla de nuevo y se leen las absorbancias a 505 nm con ayuda de un cronómetro. Las medidas se realizan a los 30 segundos (A_1), y de nuevo 3 minutos después (A_2).

Para medir el grado de inhibición de la formación del formazán rojo, se realiza una medida de referencia, que se procesará de la misma forma pero sin muestra (se sustituye por solución diluyente), de forma que se producirá el formazán rojo debido a la acción de los radicales superóxidos formados por el sistema xantina/xantina oxidasa. Esta medida corresponde al 100% de la reacción (reacción sin inhibir).

Los cálculos realizados para la determinación de la actividad de SOD son los siguientes:

$$\Delta A/\text{min de patrón o muestra} = (A_2 - A_1) / 3$$

$\Delta A/\text{min}$ de la solución diluyente es el 100% de la reacción (es decir, corresponde al 0% de inhibición). Para la determinación del grado de inhibición hacemos los siguientes cálculos:

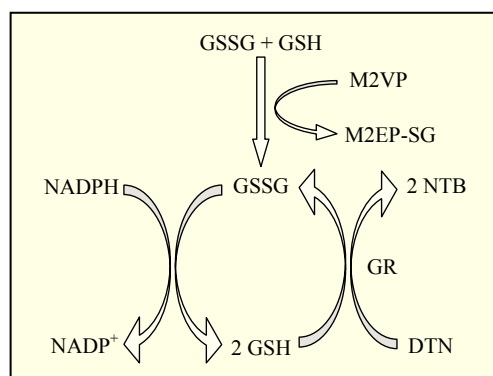
$$\% \text{ inhibición} = 100 - [(\Delta A_{\text{patrón o muestra/min}} \times 100) / \Delta A_{\text{sol. diluyente/min}}]$$

A continuación se representan los porcentajes de inhibición de cada patrón frente al logaritmo decimal de su concentración (en U/mL). Esta curva patrón permite conocer las U de SOD/mL presente en la muestra a partir del grado de inhibición alcanzado. Los resultados se expresan en U/g de Hemoglobina, teniendo en cuenta el factor de dilución de la muestra.

3.7.5. Determinación de la relación glutatión reducido / glutatión oxidado (GSH/GSSG) en sangre heparinizada

El GSH es un tripéptido (γ -glutamilcisteinilglicina) con un grupo tiol libre, siendo uno de los mayores antioxidantes existente en los tejidos de vertebrados (apartado 2.2.3). Actúa reduciendo el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los hidroperóxidos lipídicos a H_2O y a sus respectivos alcoholes, mediante una reacción catalizada por la enzima GPx. En este proceso, el GSH se convierte en (GSSG), que será de nuevo transformado en GSH por la enzima GR con la ayuda de una molécula de NADPH (ver apartado 3.7.2).

Para la medida de la relación GSH/GSSG hemos utilizado el kit comercial BIOXYTECH[®] GSH/ GSSG-412[™] de Oxis Research[™], que sigue el método propuesto por Tietze (1969), basado en la determinación cuantitativa de la cantidad de glutatión total (GSH_t: GSH + GSSG). Este método emplea el reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiomis-2-nitrobenzoico ó DTNB), que reacciona con GSH para formar un producto detectable espectrofotométricamente a 412 nm. GSSG puede ser determinado por la reducción previa de GSSG a GSH, que es entonces determinado por la reacción con el reactivo de Ellman. En resumen, este método utiliza el cambio de color durante la reacción, que es proporcional a las concentraciones existentes de GSH y GSSG:



3.7.5.1. Preparación de las muestras

El día de obtención de la sangre heparinizada (día del sacrificio de los animales de experimentación), se separan dos microtubos eppendorf, uno para la determinación de GSH_t y otro para la de GSSG. Al tubo de GSSG se la añaden 10 μ L de *scavenger* por cada 100 μ L de sangre, para evitar la oxidación de la muestra. Las alícuotas se congelan hasta la realización del experimento.

3.7.5.2. Composición de los medios

- Tampón de ensayo: Na₂PO₄ con EDTA
- Tampón GSSG
- GR
- NADPH
- *Scavenger* (1-metil-2-vinilpiridinatri fluorometanosulfonato: M2VP)
- Cromógeno (ácido 5,5'-ditiolis-2-nitrobenzoico: DTNB)
- Estándares: en tampón KPO₄ con EDTA. Cada molécula de GSSG es equivalente a 2 moléculas de GSH:

ST	GSSG (μ M)	GSH (μ M)
1	0	0
2	0.05	0.10
3	0.125	0.25
4	0.25	0.5
5	0.75	1.5
6	1.5	3

- Ácido metafosfórico (MPA) al 5%

3.7.5.3. Protocolo experimental

Las muestras de sangre heparinizada se procesan de distinta manera para la determinación del GSH_t y del GSSG.

Para la medida de GSSG: se tienen microtubos eppendorf de 1,5 mL con 110 µL de muestra (100 µL de sangre heparinizada + 10 µL de M2VP, que ya se habían preparado el día de la obtención de sangre, como indicamos en el apartado 3.7.5.1). Se añaden 290 µL de MPA al 5%, en frío. Se agita con el vortex durante 15-20 seg. Se centrifuga a 1000 g (10 minutos a 4° C) y se toman 50 µL del sobrenadante, que mezclamos con 700 µL de tampón GSSG, y se mantiene en hielo hasta el momento de la medida.

Para la medida de GSH_t: en tubos eppendorf de 1,5 mL se añaden, a 50 µL de sangre heparinizada, 350 µL de MPA al 5%, en frío. Se agita con el vortex durante 15-20 seg. Se centrifuga a 1000 g (10 minutos a 4° C) y se toman 50 µL del sobrenadante, que se mezclan con 3 mL de tampón de ensayo, y se mantiene en hielo hasta el momento de la medida.

En una microcubeta de plástico se añaden 200 µL del estándar, del blanco (preparado con 50 µL de MPA al 5% frío + 700 µL del tampón de GSSG) o de la muestra (ya sea para medir GSH_t o GSSG), y se adicionan 200 µL de DTNB y 200 µL de GR. Se mezcla bien y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se añaden 200 µL de NADPH para disparar la reacción y se mide a 412 nm cada 20 segundos durante un tiempo total de 200 segundos.

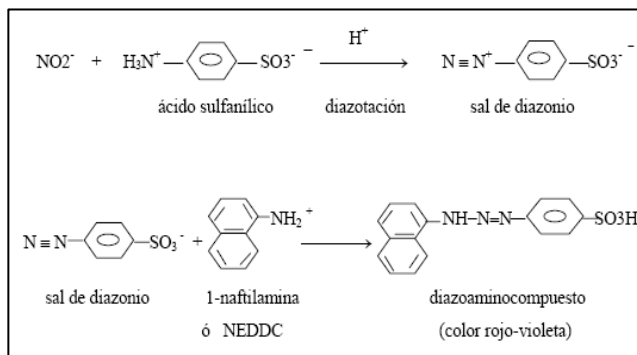
Todas estas medidas se hacen por duplicado. Sustituyendo los valores de absorbancia de cada muestra en su recta patrón correspondiente (GSH o GSSG), y multiplicando el valor por el factor de dilución según la realizada en cada caso, se obtienen los µM de GSH o GSSG. La relación GSH/GSSG se obtiene de la siguiente fórmula:

$$\text{Relación GSH / GSSG} = \frac{\text{GSH}_t - 2 \text{GSSG}}{\text{GSSG}}$$

3.8. DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN PLASMA

El óxido nítrico (NO) es un radical libre inorgánico gaseoso que se origina por la acción de la enzima óxido nítrico sintetasa sobre el aminoácido esencial L-arginina. A nivel del endotelio vascular, el NO es producido por la acción de la óxido nítrico sintasa III o endotelial (eNOS), y desempeña un papel central en el mantenimiento de cifras normales de la presión sanguínea arterial. Además, el NO circulante disminuye la agregación y la adhesión de las plaquetas al endotelio de los vasos.

Una de las formas para calcular la formación de NO es la medida del ión nitrito (NO_2^-), que es uno de los dos productos primarios, estables y no volátiles del NO. Este ensayo está basado en el método descrito por Griess en 1879. El sistema del reactivo de Griess está basado en una reacción química que usa sulfanilamida y N-1-naftiletilenodiamida dihidrocloro (NEDDC) bajo condiciones acídicas (ácido fosfórico) (ver figura 1). Este sistema detecta NO_2^- en una enorme variedad fluidos y tejidos biológicos:



3.8.1. Composición de los medios

- Reactivo de Griess
- Tampón Tris/HCl (pH = 7.5) 1 M
- NADPH 0.02 mM
- Glucosa 6-fosfato (G6P) 5 mM
- Glucosa 6-fosfato deshidrogenada (G6PDH) 10 U/mL
- *Aspergillus* Nitrato Reductasa 1 U/mL
- Solución patrón de nitrito sódico 320 μ M

3.8.2. Protocolo experimental

Los reactivos se añaden en microtubos eppendorf de 1,5 mL en el siguiente orden: 7 μ L de tampón Tris/HCl 1M (pH=7.5), 10 μ L de NADPH 0.02mM, 23 μ L de la mezcla G6P-G6PDH (resultante de mezclar 2200 μ L de G6P con 330 μ L de G6PDH) y 10 μ L de nitrato reductasa. Se mezcla bien. Sobre estos tubos se añaden 50 μ L de muestra (plasma), blanco (agua bidestilada) o patrón (se elaboran distintas diluciones a partir de la solución patrón de 320 μ M: 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5 y 2.5 μ M). Se mezcla y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se depositan 75 μ L de la mezcla reactiva sobre pocillos de una microplaca (tipo ELISA) de 96 pocillos. Se añaden, además, 75 μ L de reactivo de Griess sobre cada pocillo, se mezcla y se deja a temperatura ambiente durante 10 minutos. Pasados esos 10 minutos se lee la absorbancia a 550 nm mediante un lector de microplacas.

3.9. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN PLASMA

El fundamento del método propuesto por Ou y colaboradores en 2001 (denominado ensayo ORAC-FL ó medida de la capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno usando fluoresceína) se basa en el descenso de la emisión de fluorescencia que sufre la fluoresceína (3',6'-dihidroxiestero (isobezofran-1[3H],9'[9H]-xanten-3-ona) a causa del daño químico que afecta a su conformación e integridad química provocado por especies reactivas. La fluorescencia de la fluoresceína (FL) es altamente sensible a su conformación e integridad química, por lo que se obtiene un índice del daño oxidativo de la muestra.

La especie reactiva que se emplea en nuestro estudio es AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro), generadora de radicales peroxilos ($\text{ROO}\cdot$), ya que éstos son los más importantes tanto a nivel fisiológico como patológico. En la bibliografía se han propuesto otros tipos de especies reactivas para producir radicales hidroxilos, como Cu^{2+} -ascorbato o Cu^{2+} - H_2O_2 , pero estos otros radicales están menos relacionados con la situación fisiológica. El AAPH sufre descomposición espontánea y produce radicales peroxilos con una magnitud determinada principalmente por la temperatura.

Para determinar la capacidad antioxidante total de una muestra es preciso hacer referencia a un antioxidante estándar; el antioxidante de uso más generalizado es el Trolox (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), análogo hidrosoluble del α -tocoferol.

La protección de un compuesto antioxidante frente a las especies reactivas se refleja en una menor pérdida de fluorescencia por parte de la fluoresceína. De

este modo, la capacidad antioxidante de dicho compuesto se puede cuantificar mediante dos parámetros:

- El tiempo que el antioxidante protege a la fluoresceína de sufrir el daño oxidativo.
- El porcentaje de inhibición de oxidación a diferentes tiempos.

3.9.1. Preparación de los reactivos

- Tampón fosfato (75 mM, pH 7.4): se prepara una disolución de K_2HPO_4 0.75 M y una de NaH_2PO_4 0.75 M. Se mezclan en la proporción K_2HPO_4/ NaH_2PO_4 , 75:25 (v/v) y se diluye con agua desionizada (1:9, v/v). El pH de esta disolución tampón debe ser 7.4, lo que se debe constatar con el pHmetro.
- Fluoresceína (2.934 mg/L): se prepara una disolución madre (440 mg/L) disolviendo 44 mg de FL en 100 mL de tampón fosfato pH 7.4. La disolución de trabajo se obtiene diluyendo 15 veces con tampón fosfato la solución madre.
- AAPH (221.25 mM): se pesan 600 mg de AAPH y se disuelven en 10 mL de tampón fosfato pH 7.4.
- Trolox (20 μ M): se prepara una disolución madre disolviendo 5.0 mg de Trolox en 200 mL de tampón fosfato pH 7.4. La solución de trabajo se obtiene diluyendo la primera con tampón fosfato pH 7.4 (1:4, v/v).

3.9.2. Protocolo experimental

El ensayo ORAC-FL se lleva a cabo a 37°C en microcubetas fluorimétricas de 700 µL de capacidad. Se preparan por duplicado cada una de las muestras, del estándar (Trolox) y un blanco. El medio de reacción contiene:

- Muestras:

150 µL plasma (diluido 1:1750) + 150 µL FL (2.934 mg/L) + 75 µL AAPH

- Blanco:

150 µL tampón fosfato (75 mM, pH 7.4) + 150 µL FL (2.934 mg/L) + 75 µL
AAPH

- Estándar (Trolox):

150 µL solución de Trolox (20 µM) + 150 µL FL (2.934 mg/L) + 75 µL AAPH

Inmediatamente se mide la fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}}$ 490 nm, $\lambda_{\text{emisión}}$ 515 nm) cada 5 minutos durante 60 minutos, hasta que la medida desciende aproximadamente a 0 o a un valor inferior al 5% del valor inicial.

3.9.3. Cálculo de los resultados

Los resultados se expresan como valor ORAC, que usa para la cuantificación el área debajo de la curva de emisión de fluorescencia, recogiendo simultáneamente la información de intensidad y tiempo. El valor ORAC se obtiene calculando la diferencia de áreas bajo las curvas de descenso de fluorescencia de la fluoresceína a lo largo del tiempo entre el blanco y una muestra (figura 3.2).

$$\text{Valor ORAC } (\mu\text{M}) = 20 K (S_{\text{muestra}} - S_{\text{blanco}}) / (S_{\text{trolox}} - S_{\text{blanco}})$$

20 = concentración de Trolox

K = factor de dilución de la muestra

S = área bajo la curva de descenso de fluorescencia de la muestra, el trolox o el blanco, y se calcula de la siguiente forma:

$$S = (0.5 + f_5 / f_0 + f_{10} / f_0 + f_{15} / f_0 + \dots + f_{65} / f_0 + f_{70} / f_0) \times 5$$

f_0 : fluorescencia inicial a 0 minutos

f_i : fluorescencia medida a tiempo i (minutos)

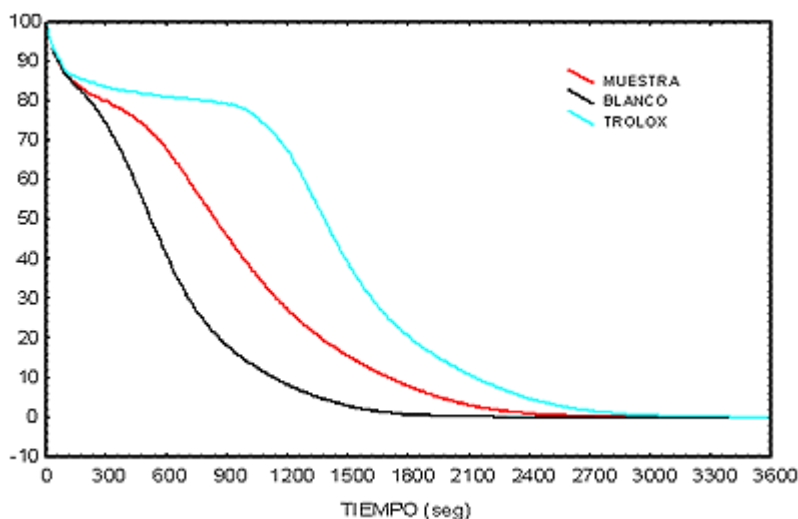


Figura 3.2. Fluorescencia relativa de fluoresceína incubada con AAPH frente al tiempo en presencia de tampón fosfato (blanco), Trolox o una muestra.

Los resultados finales se expresan en μmol de equivalentes de Trolox por litro de muestra (1 equivalente de Trolox equivale a la protección neta del área bajo la curva proporcionada por 1 μmol de Trolox).

3.10. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA L-CARNITINA EN CORAZÓN

3.10.1. Homogeneización del corazón

3.10.1.1. Composición de los medios

- Tampón de Homogeneización:

Sacarosa	250 mM
Tris/HCl (pH = 7.4 a 4°C).....	15 mM
DTT.....	1 mM
EDTA.....	1 mM

3.10.1.2. Protocolo experimental

Como se indica en el apartado 3.5, una vez extirpado el corazón, se limpia con solución salina fría (0.9% p/v NaCl) y se aísla el ventrículo izquierdo, el cual se pesa, se congela en nitrógeno líquido y se mantiene a – 80 °C.

Para la determinación de las enzimas antioxidantes, el corazón se ha homogeneizado al 10% (p/v) en tampón de homogeneización. Para esto, una vez pesado el tejido sin descongelar, se sumerge inmediatamente en el tampón de homogeneización y se homogeniza utilizando un homogeneizador con émbolo de teflón (Pobel 245432, España) acoplado a un motor con una velocidad de giro de 2500 r.p.m. Posteriormente, el homogeneizado se centrifuga a 800 g durante 20 minutos a 4 °C, para eliminar restos de orgánulos, y el sobrenadante se utiliza para la determinación de las enzimas antioxidantes, la relación GSH/GSSG, la peroxidación lipídica y la cantidad de óxido nítrico presente.

3.10.2. Determinación de la concentración de proteínas en homogeneizados de corazón

La concentración de proteínas en el homogeneizado se ha determinado siguiendo el método descrito por Bradford (Bradford, M.M. Anal Biochem.72, 248-254,1976), utilizando el reactivo de Bio-Rad Protein Assay (que contiene ácido fosfórico y metanol) y un estándar de albúmina bovina. Este método se basa en la reacción de las proteínas con el reactivo, dando un complejo coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas de la muestra.

La técnica consiste en incubar, en una microplaca de ELISA, 5 μ L de los homogeneizados (diluidos 1/20 con agua bidestilada), o de los estándares en su caso, con 250 μ L del reactivo de Bio-Rad (previamente diluido 1/4 con agua bidestilada y filtrado a través de un papel Whatman nº 1) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se lee en el espectrofotómetro a 595nm. La coloración es estable en un plazo de 50 minutos.

Las soluciones estándares se preparan a partir de una solución de gamma-globulina bovina de concentración igual a 1.47 mg/mL. A partir de la solución madre se preparan seis soluciones patrón (P) cuyas concentraciones, expresadas en μ g/mL, son: $P_1 = 0$; $P_2 = 0.092$; $P_3 = 0.183$; $P_4 = 0.367$; $P_5 = 0.735$; $P_6 = 1.47$.

Conociendo las concentraciones de los estándares y sus absorbancias, se elabora una curva patrón, la cual permite conocer las concentraciones de los homogeneizados de corazón a partir de sus absorbancias.

3.10.3. Determinación de la actividad GPx en homogeneizados de corazón

La actividad de esta enzima se ha determinado según el método descrito en el apartado 3.7.2, utilizando el kit de laboratorios Randox para la determinación

de GPx. Seguimos el mismo protocolo descrito en dicho apartado, pero añadiendo en este caso 20 μ L del homogeneizado de corazón.

3.10.4. Determinación de la actividad GR en homogeneizados de corazón

Para la determinación de la actividad de la enzima GR hemos seguido el kit comercial de laboratorios Randox (ver apartado 3.7.3). Seguimos el mismo protocolo experimental descrito en dicho apartado, tomando en este caso 40 μ L del homogeneizado de corazón.

3.10.5. Determinación de la actividad SOD en homogeneizados de corazón

Para la determinación de la actividad de esta enzima se ha utilizado el Kit comercial de laboratorios Randox (ver apartado 3.7.4). Se sigue el mismo protocolo experimental, utilizando en este caso una dilución 1:2 del homogeneizado de corazón.

3.10.6. Determinación de la relación GSH/GSSG en homogeneizados de corazón

Para la medida de la relación GSH/GSSG hemos utilizado el kit comercial BIOXYTECH[®] GSH/ GSSG-412[™] Oxis Research[™], al igual que hicimos para la determinación de esta relación GSH/GSSG en sangre total heparinizada (apartado 3.7.5).

3.10.6.1. Preparación de las muestras

Homogeneizamos el ventrículo izquierdo del corazón con el siguiente tampón:

PO ₄ KH ₂	50 mM
EDTA	1 mM
BSA (albúmina)	1 mg/mL
Ajustar a pH = 7.5 con KOH	2 M

Se homogeniza el corazón de forma análoga a la descrita en el apartado 3.10.1.2, pero con una dilución al 50% (p/v) en este tampón fosfato. Una vez homogeneizado el tejido, se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 20 minutos a 4 °C, para eliminar restos de orgánulos. La disolución centrifugada se separa en 2 eppendorf de 1.5 mL (uno para la determinación de GSH_t y otro para la de GSSG). Al tubo de GSSG se le añaden 10 µL de *scavenger* por cada 100 µL de homogeneizado de corazón, para evitar la oxidación de la muestra como se indica en el apartado 3.7.5.1. A partir de este punto se sigue el mismo protocolo experimental descrito en el apartado 3.7.5.3.

3.10.7. Determinación de la peroxidación lipídica en homogeneizados de corazón

El método de diagnóstico más directo, a la hora de valorar el estado de peroxidación lipídica en una muestra biológica, es la cuantificación de los hidroperóxidos formados en las etapas iniciales del proceso. Sin embargo, la naturaleza especialmente lábil y poco estable de estos productos, ha hecho que se recurra a métodos indirectos, esto es, al análisis de productos secundarios o finales derivados de su metabolismo o descomposición.

Existe una gran variedad de métodos para evaluar la peroxidación lipídica, siendo uno de los más utilizados la cuantificación del malondialdehído (MDA) por medio de su reacción con el ácido tiobarbitúrico (ATB). El MDA es un

producto final de la degradación oxidativa de los lípidos que, en condiciones de bajo pH y temperatura elevada, participa fácilmente en una reacción de adición nucleofílica con el ATB, generando un pigmento rojo fluorescente (compuesto por una molécula de MDA y dos de ATB) que puede ser determinado por espectrofotometría visible o de fluorescencia, siendo su cuantificación muy sencilla. Sin embargo, a la hora de considerar el MDA como índice de peroxidación lipídica hay que tener en cuenta una serie de inconvenientes, debido a que ni todos los lípidos producen MDA cuando sufren peroxidación (Frankel y col., 1983), ni el MDA se produce exclusivamente como resultado de la peroxidación lipídica (Janero, 1990). Por tanto, debemos considerar este método únicamente como un indicador de la potencial existencia de daño peroxidativo sobre los lípidos celulares, y no como una medida de la peroxidación lipídica.

Para la determinación del MDA hemos seguido el método descrito por Jentzsch y colaboradores (1996), en el cual se valora espectrofotométricamente a 535 nm y 572 nm (esta última medida es para eliminar la absorción basal), el aducto de color rojo formado a consecuencia de la reacción del MDA con el ATB.

3.10.7.1. Composición de los medios

- 1,1,3,3- tetrametoxipropano (TMP)..... 50 μ M
- Butilhidroxitolueno (BHT)0,1% en etanol absoluto
- Ácido ortofosfórico..... 0.2 M
- Ácido tiobarbitúrico (ATB)0.11 M (en NaOH 0.1M)

3.10.7.2. Protocolo experimental

En el interior de microtubos eppendorf de 2 mL, se adicionan 0,2 mL de

homogeneizado de corazón (equivalentes aproximadamente a 4 mg de proteína) junto con 25 μ L de una solución de butilhidroxitolueno (BHT) al 0.1% en etanol absoluto. A continuación, se añaden 0,2 mL de ácido ortofosfórico. Se agita durante 10 segundos aproximadamente. Se añaden 25 μ L de ATB 0.11 M (solución ajustada previamente con NaOH 0.1 M). Se vuelve a mezclar bien.

La mezcla de reacción se incuba durante 45 minutos a 95 °C. Pasado este tiempo, los tubos se enfrían para parar la reacción, y se adicionan 0,5 mL de n-butanol para extraer el aducto de color rosa formado. Se cierran bien los tubos, se agitan vigorosamente y se centrifugan durante 10 minutos a 12000 r.p.m y a 4 °C, para separar las dos fases. Se recogen 250 μ L de la fase orgánica (superior), y se lee el color a 535 nm y 572 nm frente al blanco, constituido por 0,2 mL de H₂O bidestilada tratados de manera análoga a las muestras.

A la vez que se procesan las muestras, se prepara una curva estándar a partir del compuesto 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP), el cual, al igual que el MDA, reacciona con el ATB bajo las mismas condiciones. A partir de una solución madre 50 μ M de TMP (estable durante dos semanas a 4 °C), se hacen los distintos estándares: 0.5; 1; 2.5; 5; 10 y 25 μ M. Se añaden 0,2 mL de cada uno de los estándares en microtubos eppendorf de 2 mL y se procede de forma semejante a las muestras.

Todas las muestras y estándares se procesan por triplicado. Los resultados se expresan en nmol MDA formado/mg proteína en los 45 minutos de reacción.

3.10.8. Determinación de la cantidad de NO en homogeneizados de corazón

Para la determinación de la cantidad de óxido nítrico existente en los homogeneizados de corazón, se ha utilizado el mismo protocolo seguido en el

apartado 3.8., utilizando las muestras obtenidas según el protocolo descrito en el apartado 3.10.1.

3.10.9. Análisis de los niveles de proteínas por *Western blotting* de las enzimas antioxidantes y eNOS en corazón

3.10.9.1 Fundamento del *Western Blotting*

Para la separación e identificación de proteínas se ha utilizado la técnica de Western Blotting, que nos permite la separación de proteínas según su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE); posteriormente, todas las proteínas presentes en la muestra son inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa, y aquellas que son objeto de estudio son identificadas gracias al empleo de anticuerpos específicos. Para la realización de este experimento se ha utilizado un equipo de *Bio-Rad Laboratories* para Western Blotting, compuesto por un equipo de Miniprotean III Cell y Mini Trans-Blot Cell.



Figura 3.3. Equipo necesario para la realización de la técnica de *Western Blotting*.

La técnica de Western Blotting (transferencia electroforética de proteínas) fue llevada a cabo por primera vez por Towbin y colaboradores en 1979.

Para la caracterización de antígenos y anticuerpos, especialmente en mezclas complejas, una de las metodologías más empleadas es la separación electroforética de los componentes de la muestra en geles de poliacrilamida (PAGE). Estas proteínas, separadas según su peso molecular, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, en la que se identifican las proteínas objeto de nuestro estudio (GPx, GR, SOD, eNOS y) por medio de anticuerpos específicos.

3.10.9.2. Preparación de las muestras

Homogeneizamos el corazón de la misma forma descrita en el apartado 3.10.1, con la particularidad de que al tampón de homogeneización le añadimos la proporción adecuada de un cóctel de inhibidores de proteasas 10x (suministrado por Roche Applied Science).

A continuación, se mezclan volúmenes iguales del homogeneizado de corazón (equivalentes a 30 μg de proteína para la determinación de GPX, GR y SOD, ó 100 μg de proteína en el caso de la eNOS) y de tampón de muestra 2X, el cual está compuesto por los siguientes reactivos:

Tris / HCl (pH = 6.8).....	0.125 mM
Glicerol	25%
SDS	2%
Azul de bromofenol	0,01%

Esta mezcla se hierve a 95 °C durante 5 minutos, para posibilitar la desnaturalización de las proteínas presentes en el homogeneizado de corazón. Pasado este tiempo las muestras se pasan inmediatamente a hielo para su conservación hasta que se realice la electroforesis.

3.10.9.3. Electroforesis

Dado que las proteínas tienen carga neta a un valor de pH diferente de su punto isoeléctrico, pueden migrar en un campo eléctrico, de modo que su velocidad de migración será dependiente de su densidad de carga (relación entre la carga y la masa de esa proteína). Al estar cargadas negativamente, las proteínas viajan hacia el cátodo (polo positivo) durante la electroforesis.

La electroforesis de proteínas se realiza en gel de poliacrilamida. El grado de polimerización permite obtener diferentes tamaños de poros en el gel por el que migran las proteínas y ello ejerce un efecto que permite la caracterización de las proteínas en estudio. Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) y del monómero entrecruzador N, N'-metilen-bis-acrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$). La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones persulfato (Chavez Planes y colaboradores, 1990). Las aminas terciarias como el N, N, N, N'-tetrametilen-diamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato (Garfín, 1990). Además de la mezcla de Acrilamida/Bisacrilamida, de iones persulfato y TEMED, se añade SDS (dodecil sulfato de sodio) para ayudar a la separación de las proteínas según su peso molecular, ya que las uniones del SDS se adhieren al péptido con una proporción de una molécula de SDS por cada 2 aminoácidos. Esto le proporciona al péptido una carga negativa que resulta proporcional a la longitud de la cadena (número de aminoácidos) y, por tanto, a la masa de la proteína. El SDS provoca que la proteína pierda su configuración nativa, eliminándose de este modo las diferencias en morfología de las diferentes proteínas que han de ser separadas en el gel.

3.10.9.3.1. Composición de los medios

- Tampón Tris / HCl (pH = 8.8)..... 1.5 M
- Tampón Tris / HCl (pH = 6.8)..... 1 M
- Gel separador:

	8%	12%
H ₂ O bidestilada	4.6 mL	3.3 mL
Acrilamida / Bisacrilamida (30%)	2.7 mL	4 mL
Tris 1.5 M (pH = 8,8)	2.5 mL	2.5 mL
SDS (10%)	100 µL	100 µL
APS (10%)	100 µL	100 µL
TEMED	6 µL	6 µL

- Gel concentrador:

H ₂ O.....	5.5 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	1.3 mL
Tris 1 M (pH = 6,8).....	1 mL
SDS (10%)	80 µL
APS (10%)	80 µL
TEMED.....	8 µL

- Tampón de electroforesis 10X:

Tris	250 mM
Glicina.....	1.92 M
SDS	1%

3.10.9.3.2. Protocolo experimental

Se preparan dos tipos de geles: un gel concentrador (que concentre todas las proteínas en un lugar del gel) y un gel separador (cuya misión es la de separar

las proteínas según su peso molecular). De esta forma se asegura que todas las muestras van a presentar el mismo patrón de proteínas, alcanzando proteínas de un mismo peso molecular la misma altura en diferentes muestras. Se ha utilizado el gel al 12% para realizar la electroforesis para la determinación de GPx y SOD, y el gel al 8% para SOD y eNOS. De manera general, con una mayor concentración del gel separador se separan mejor las proteínas de menor peso molecular.

Una vez preparado el gel separador, se vierte inmediatamente entre los dos vidrios (suministrados en el Kit de electroforesis y que van a formar un gel de 0.75 mm de grosor) con ayuda de una pipeta. Se deja polimerizar durante aproximadamente 25 minutos, añadiendo H₂O destilada a la superficie del gel (ya que el O₂ del aire puede dificultar la correcta polimerización del mismo). Una vez polimerizado, se elimina el agua con ayuda de un papel tipo Whatman, y se vierte encima el gel concentrador (preparado también extemporáneamente). Recién añadido este gel se coloca un peine para formar los pocillos donde se añadirán después las muestras, y se deja polimerizar durante 10 minutos.

Cuando ya esté polimerizado el gel, se separa el peine y se colocan las placas de vidrio en una cubeta de electroforesis. Las muestras, preparadas según lo dispuesto en el apartado 3.10.9.2), se cargan en los pocillos, añadiendo además en uno de estos pocillos un marcador de pesos moleculares (que permitirá identificar los distintos pesos moleculares de las correspondientes proteínas al final del proceso). o bien un control positivo si se dispone de éste. Finalmente, se llena la cubeta de electroforesis con tampón de electroforesis 10X, se cierra el circuito y se aplica un voltaje constante de 150 V durante aproximadamente 75 minutos, vigilando que el frente de muestra (identificable gracias al azul de

bromofenol presente en el tampón de muestra) no alcance el extremo inferior del gel separador.

3.10.9.4. Transferencia

Debido a la extrema fragilidad del gel de poliacrilamida en el que se han separado las distintas proteínas, éstas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm de poro, mediante un sistema de electrotransferencia (*Trans-Blot Cell, Bio-Rad*).

3.10.9.4.1. Composición de los medios

- Tampón de transferencia:

Tris	20 mM
Glicina.....	150 mM
Metanol	20%

- Ponceau S al 0.5%:

Ponceau S	0.5 g
Ácido acético glacial.....	1 mL
Agua bidestilada.....	99 mL

3.10.9.4.2. Protocolo experimental

Una vez terminada la electroforesis, se separa y elimina el gel concentrador, para quedarnos únicamente con el gel separador (que es el que posee todo el bandeo de proteínas separadas por su peso molecular) y proceder al montaje del cassette para realizar la transferencia. Para ello, en una bandeja con tampón de

transferencia se prepara un sándwich en el interior del cassette con los siguientes elementos: una esponja, un papel de filtro Whatman 3MM (de la misma medida que el gel separador), el gel separador, la membrana de nitrocelulosa (también de la misma medida que el gel separador), otro papel de filtro y otra esponja¹. Se cierra bien el cassette y se coloca dentro de la cubeta de transferencia², junto con un bloque de hielo (suministrado con el sistema) y un agitador magnético. Se llena la cubeta de tampón de transferencia y se cierra el circuito para realizar la transferencia, aplicando un voltaje constante de 100 V durante una hora. La transferencia debe realizarse en cámara fría.

Una vez terminada la transferencia, se debe de comprobar que ésta se ha realizado adecuadamente. Para ello, se desmonta el sándwich y se coloca la membrana en un recipiente con colorante Ponceau S durante 3-5 minutos. Eliminando el exceso de colorante con sucesivos lavados con agua, se debe distinguir en cada carril el patrón de bandas correspondientes a las diferentes proteínas que componen las muestras.

3.10.9.5. Inmunodetección

Se basa en la detección de cada una de las proteínas que buscamos (GPx, GR, SOD y eNOS) en la membrana de nitrocelulosa, mediante el empleo de anticuerpos específicos.

3.10.9.5.1. Composición de los medios

¹ Las esponjas, la membrana y los papeles de filtro se deben de encontrar en remojo durante unos 20 minutos en la bandeja con el tampón de transferencia antes de proceder al montaje del sándwich

² En el montaje del sándwich y posterior colocación de éste en la cubeta, el gel debe estar correctamente posicionado respecto de la membrana para asegurar la transferencia, respetando la polaridad del sistema.

- Solución de lavado (TBST):

Tris / HCl (pH = 7.5).....	10 mM
NaCl	100 mM
Tween 20	0.1%

- Solución de bloqueo (TBST-M):

Leche desnatada en polvo	3% en TBST
--------------------------------	------------

- Anticuerpos primarios para el análisis de Western Blot:

Anticuerpo	Origen	Dilución en TBST-M	Tiempo de incubación	Temperatura
Anti- GAPDH	Conejo	1:50000	12 horas	4 °C
Anti- eNOS	Ratón	1:10000	12 horas	4 °C
Anti-GPX	Conejo	1 :3000	12 horas	4 °C
Anti- GR	Conejo	1:3000	12 horas	4 °C
Anti-SOD	Conejo	1:10000	12 horas	4 °C

- Anticuerpos secundarios para el análisis de Western Blot:

Anticuerpo	Dilución en TBST-M	Tiempo de incubación	Temperatura
Goat anti-rabbit IgG-HRP	1:50000	1 hora	Ambiente
Goat anti-rabbit (Dako)	1:50000	1 hora	Ambiente
Goat anti-mouse IgG-HRP	1:50000	1 hora	Ambiente

- Kit de quimioluminiscencia:

ECL Advance Western Blotting Detection kit

- Revelador y fijador: Kodak Lx-24 y AL-4

- Película reveladora: Kodac X-OMAT LS film

3.10.9.5.2. Protocolo experimental

Se incuba la membrana de nitrocelulosa en unos 25-30 mL de solución de bloqueo durante 2 horas para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo a la superficie de la membrana. Transcurrido este tiempo, se incuba la membrana con el anticuerpo primario específico, dejándolo toda la noche a 4 °C. Finalizada la incubación, se hacen 8 lavados de 3 minutos para eliminar el exceso de anticuerpo y evitar su unión a sitios inespecíficos. Después se incuba la membrana con el anticuerpo secundario (durante 1 hora y a temperatura ambiente) y se vuelven a hacer 8 lavados de 3 minutos. Por último, se procede al revelado de la membrana.

Para la cuantificación de las bandas de proteínas, las películas autorradiografiadas se dejan secar a temperatura ambiente. Las bandas de interés se han analizado mediante densitometría óptica, utilizando el programa informático PCBAS (versión 2.08e). Finalmente, para poder comparar los resultados obtenidos en los diferentes grupos experimentales, se realiza también una inmunodetección de la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, utilizada como *housekeeper*¹) en las mismas membranas.

¹ Proteína que se expresa constitutivamente en un nivel idéntico en todas las muestras analizadas.

3.10.10. Estudio de la expresión del ARNm de las enzimas antioxidantes, eNOS y P₂₂phox

3.10.10.1. Extracción de ARN total

Una típica célula mamífera contiene unos 10^5 μ g de ARN total, un 80-85% del cual es ARN ribosómico, principalmente 28 S, 18 S y 5 S, mientras que el 10-15% está compuesto de una variedad de especies de ARN de bajo peso molecular, como el ARN transferente y ARN nuclear. Todos estos ARNs tienen un tamaño y secuencia definidos y pueden separarse mediante electroforesis. Por el contrario, el ARN mensajero (ARNm), que constituye del 1-5% del total, es heterogéneo en tamaño (desde unas 200 bases hasta varias kilobases de longitud) y secuencia.

El ARN es un componente biológico muy lábil y fácilmente degradable por la acción de ribonucleasas (ARNasas). Por tanto, un elemento clave para la buena preparación del ARN es minimizar la actividad ribonucleasa durante los estadios iniciales de la extracción y evitar la introducción accidental de las mismas con las soluciones y el material de trabajo. Estas enzimas son muy estables y, generalmente, no necesitan cofactor. Para evitar problemas de contaminación del ARN, se deben tomar al menos las siguientes precauciones:

- El material de trabajo debe de estar libre de ARNasas. Gran parte del mismo puede adquirirse libre de estas enzimas de degradación. El dietilpírocarbonato (DEPC) al 0.1% es un inhibidor fuerte pero no absoluto de la ARNasa (Fedorcsak I. y colaboradores, 1966). Además, es importante eliminar el exceso de DEPC mediante calentamiento a 100 °C durante 15 minutos (Kumar A. y colaboradores, 1972) o por autoclavado, ya que las trazas remanentes del mismo podrían inactivar

el ARN por carboximetilación. Es recomendable destinar un lugar de trabajo y un material para uso exclusivo con muestras de ARN.

- Una fuente importante de ARNasa son las manos del investigador, con lo que es imprescindible el uso de guantes y el cambio de los mismos con frecuencia.

3.10.10.2. Fundamento de la extracción de ARN

Para la extracción del ARN, el método empleado se basa en la diferente solubilidad de las biomoléculas (ARN, ADN, proteínas, lípidos) en disolventes orgánicos (fenol y cloroformo). El proceso de aislamiento del ARN comienza con la homogeneización del tejido y rotura de las células en presencia de tiocianato de guanidina, agente caotrópico que rompe las membranas y desnaturaliza las proteínas, incluyendo ADNasas y ARNasas; por tanto, la presencia de este agente es, fundamental para evitar la degradación del ARN por las ARNasas presentes en la muestra. Tras la adición de cloroformo y centrifugado de la solución, ésta contiene tres fases. La fase superior es la fase acuosa, donde está presente el ARN, mientras que las proteínas y el ADN se encuentran en la interfase y fase orgánica respectivamente. Una vez extraída la fase superior acuosa, el ARN se recupera por precipitación con isopropanol (que disminuye la polaridad del medio e insolubiliza el ARN). Es conveniente lavar posteriormente el ARN con etanol y secar el precipitado.

El precipitado de ARN se resuspende en agua pre-tratada con DEPC, y se procede a su cuantificación y a la verificación de su integridad. Para lo primero nos basamos en la propiedad que tienen las bases nitrogenadas de absorber luz ultravioleta (260 nm), aunque también es conveniente determinar la absorción de las proteínas de la muestra a 280 nm, para calcular la razón de las absorbancias

A260/A280 (que da idea del nivel de contaminación proteica de la muestra)¹. Por otra parte, la determinación de la integridad del ARNse realiza mediante electroforesis en gel de agarosa, donde, si el ARN está intacto, debemos observar dos bandas superiores correspondientes al ARN ribosómico (28 S y 18 S), un conjunto de bandas no discretas de alto peso molecular, correspondiente al ARNm y, finalmente el ARN transferente y ARN ribosómico 5 S, de menor peso molecular.

3.10.10.2.1. Composición de los medios

- Tripure[®]: solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina.
- Cloroformo.
- Isopropanol.
- Etanol absoluto: diluido al 75% con agua bidestilada autoclavada.
- Agua con DEPC: solución de DEPC al 0.1% (v/v) preparado en agua bidestilada. La solución se agita durante 12 horas y, posteriormente, se autoclava.
- Solución de Tris-Borato-EDTA (TBE 10X):
 - Tris 44,5 mM
 - Ácido bórico..... 44,5 mM
 - EDTA·Na₂/NaOH (pH = 8)..... 1 mM
- Tampón mixto:
 - Azul de bromofenol 3,6 mM
 - Tris/HCl (pH = 8)..... 50 mM

¹ Una buena razón A260/A280 para el ARN es 2.1, razón que será significativamente menor cuando haya contaminación con proteínas o fenol.

Glicerol6% (v/v)

3.10.10.2.2. Protocolo experimental

Antes de proceder a la extracción del ARN, se limpia el material con etanol absoluto. En tubos cónicos de 2 mL de capacidad, se pesan entre 50-70 mg de corteza renal y se añade 1 mL de la solución comercial Tripure[®]. A continuación, se somete a la acción de un homogeneizador (Heidolph 900x) en posición de velocidad máxima durante 15 segundos, y se deja reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo, se añaden 200 μ L de cloroformo, se agita vigorosamente con un agitador de tubos tipo vortex, y se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realiza una centrifugación en frío (4 °C) a 12000 g durante 15 minutos, para la separación de las distintas fases.

Con ayuda de una pipeta, se recupera la fase acuosa superior que contiene el ARN, y se deposita en el interior de microtubos eppendorf de 1,5 mL de capacidad. A continuación, se añaden 500 μ L de isopropanol, se mezcla (invirtiendo varias veces los tubos) y se deja incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se centrifuga de nuevo en frío (4 °C) a 12000 x g durante 10 minutos, para obtener el precipitado de ARN.

Posteriormente, se elimina el sobrenadante con ayuda de una pipeta, y se lava el precipitado con 1 mL de etanol al 75%, agitando en vortex durante 20 segundos. El precipitado de ARN se recupera centrifugando a 8000 x g durante 5 minutos a 4 °C. Tras la eliminación del sobrenadante, y para conseguir el secado completo del precipitado, se tapan los microtubos con parafilm, se hacen pequeños agujeros y se deja bajo el calor de un flexo durante 15-20 minutos. No

se debe utilizar para el secado centrifugación y vacío, y tampoco se debe dejar secar completamente (ya que esto dificultaría la posterior resuspensión del precipitado).

Una vez está seco el precipitado, se añaden 50 μL de agua DEPC y se deja 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspende haciendo pasar 10 veces a través de una punta de pipeta con filtro de 100 μL de capacidad.

Para medir la concentración del ARN obtenido, se prepara una dilución del mismo, consistente en 2 μL de ARN + 98 μL de agua pre-tratada con DEPC; de aquí se toman 50 μL , y se depositan en una cubeta de cuarzo para medir su absorbancia en el espectrofotómetro (*Eppendorf Biophotometer*). Como hemos señalado, los ácidos nucleicos absorben a 260 nm, por lo que midiendo a esta longitud de onda obtenemos la concentración del ARN (se considera que cada unidad de absorbancia equivale a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). También se calcula la relación A_{260}/A_{280} , para conocer el grado de contaminación con proteínas. La concentración media de las distintas muestras de ARN de tejido cardiaco realizadas ha estado comprendida entre 1,5 y 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, obteniéndose una relación A_{260}/A_{280} en torno a 1,5-2.

Por último, hay que comprobar la integridad del ARN, para asegurarnos de que no ha sufrido degradación durante su extracción. Para ello, se realiza una electroforesis utilizando un gel de agarosa al 2% (ver apartado 3.10.10.3). En un microtubo eppendorf de 600 μL se mezcla 1 μL del tampón mixto con un volumen de ARN equivalente a 1 μg y agua-DEPC hasta completar un volumen de 10 μL . La mezcla se homogeneiza y se carga en uno de los pocillos del gel de agarosa. La electroforesis se realiza en una cubeta con solución TBE, a un voltaje constante de 190 voltios durante 25-30 minutos. Transcurrida la electroforesis, y

para la observación del gel, se fotografía bajo iluminación ultravioleta con una cámara Polaroid 667 (figura 3.4).

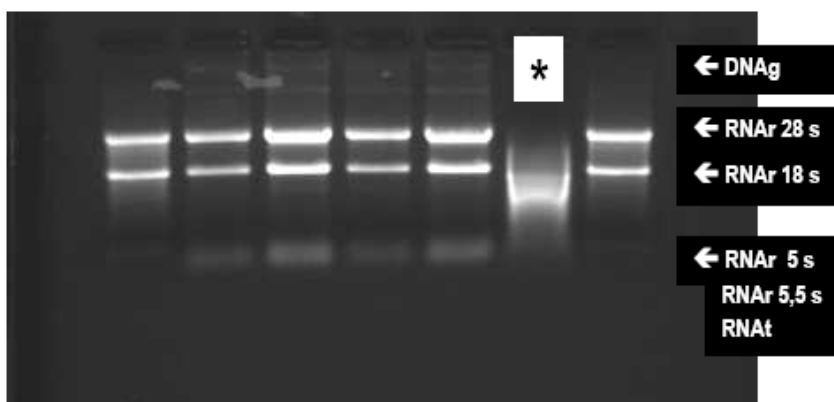


Figura 3.4: Electroforesis en gel de agarosa de muestras de ARN. En esta imagen se muestra una fotografía que muestra la comprobación de la integridad de las muestras. El * representa cómo se observa un RNA degradado. Las dos bandas superiores, 28 S y 18 S, corresponden al ARN ribosómico, y las bandas inferiores al ARNt y al ARN ribosómico 5 S. el ARNm no aparece definido como una única banda, sino como un conjunto de bandas no discretas que van desde los 5 kilobases hasta las 600 bases.

3.10.10.3. Preparación del gel de agarosa al 2%

El volumen final preparado va a depender de la capacidad del molde. En nuestro caso preparamos 170 mL. Sobre un vaso de precipitado de 1 L de capacidad se añaden 3.4 g de agarosa y 170 mL de solución de TBE 0.5X. A continuación, se cubre el vaso con papel de aluminio, para evitar la evaporación en exceso, y se calienta sobre un mechero para disolver la agarosa, agitando de vez en cuando hasta llegar a ebullición. Posteriormente se añaden 9,12 μ L (cantidad aproximada) de bromuro de etidio (sustancia altamente tóxica que permite la visualización del ARN bajo una fuente de luz ultravioleta), se agita

muy suavemente y se vuelca sobre el molde con peines evitando la formación de burbujas. Se deja 30 minutos a temperatura ambiente para que solidifique antes de sacar el gel del molde. Transcurrido este tiempo, se retiran los peines y el gel está listo para su uso, pudiéndose conservar en nevera a 4-8 °C durante un máximo de 3 días.

3.10.10.4. Retrotranscripción

3.10.10.4.1. Fundamento

Como hemos comentado, el ARN es una biomolécula muy inestable debido a la alta afinidad que tienen las ARNasas por este sustrato; por ello, es preferible trabajar con ADNc (ADN complementario al ARN). Este ADNc se genera gracias a la enzima transcriptasa inversa o retrotranscriptasa, la cual sintetiza una hebra de ADN complementaria a un molde de ARN si se le proporciona un cebador emparejado con el ARN y que posea un grupo OH libre en la posición 3'. La selección de los cebadores se realiza en función del ARN que se desea retrotranscribir. En nuestro caso, hemos empleado *random primers* (mezclas aleatorias de seis nucleótidos que permiten retrotranscribir la totalidad del ARN, dada su diversidad). Después de la retrotranscripción obtenemos un híbrido ARN-ADN que, tras la degradación del ARN, quedará finalmente como ADN monocatenario, que será la muestra problema a partir de la cual determinaremos la expresión de distintos marcadores por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) a tiempo real.

Los parámetros importantes para optimizar las condiciones de la retrotranscripción son:

- ARN. El uso de ARN intacto y no degradado es de vital importancia para una óptima síntesis de ADNc. La cantidad de ARN necesaria dependerá de la abundancia relativa del ARNm de interés, aunque lo recomendado es usar entre 20 ng y 2 µg de ARNm (o bien entre 100 ng y 5 µg de ARN total).
- Transcriptasa inversa. La cantidad de la enzima empleada es el factor más importante para la síntesis de ADNc; aunque el grado de contaminación con ARNasa es aceptable en la mayoría de las retrotranscriptasas disponibles actualmente en el mercado, es frecuente incorporar inhibidores de ARNasas, como la RNasin o complejos Vanadyi-ribonucleoside, en la reacción de retrotranscripción.
- pH. El pH óptimo para la producción de transcritos de longitud completa es de 8.3; una desviación de ± 0.5 unidades de pH conlleva una disminución de unas cinco veces en la síntesis de los mismos. El tampón de elección es el Tris/HCl.
- Cationes monovalentes. Los cationes monovalentes afectan a la eficiencia de la transcripción. Los productos de mayor longitud se obtienen con potasio, cuya concentración se recomienda que sea de 100 mM.
- Cationes divalentes. Los cationes divalentes son imprescindibles para la actividad de la transcriptasa inversa. Por debajo de una concentración de 4 mM de magnesio no se observa actividad, siendo la óptima de 6-10 mM.
- Desoxinucleótidos trifosfato (dNTP). El uso de altas concentraciones de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato es importante para la síntesis

eficiente de ADNc, recomendándose concentraciones del orden de μM a mM .

3.10.10.4.2. Composición de los medios

- ARN: 3 μg de ARN total para cada reacción de retrotranscripción.
- Agua Autoclavada.
- Kit suministrado por *Applied Biosystems (High-Capacity cDNA Archive kit* P/N: 4322171), que contiene reactivos (no especificados por el fabricante) que cuando son combinados constituyen un master-mix 2X. El volumen final de reacción utilizado ha sido de 100 μL , lo que implica que 50 μL están compuestos de agua y ARN total y los otros 50 μL por el master-mix 2X. Esta mezcla contiene todos los reactivos comunes:

<u>Reactivos</u>	<u>Concentración final</u>
Tampón RT 10X	2X
Random primers 10X.....	2X
Desoxinucleotidos-mix 25X	2X
Multiscribe RT (50 U/ μL).....	5 U/ μL
Agua autoclavada.....	hasta 50 μL

3.10.10.4.3. Protocolo experimental

Como el fabricante del kit para la realización de la retrotranscripción no especifica la cantidad de ARN a utilizar en cada reacción, en primer lugar se optimizan los μg de ARN a emplear. Para ello se realizan cuatro reacciones de

retrotranscripción con cantidades crecientes de ARN (1, 2.5, 5 y 10 μg) y se hace una PCR en tiempo real para el gen de GAPDH. En la figura 3.5 se puede apreciar la dependencia de los Ct (ver apartado 3.10.10.5) con la cantidad de ARN añadida. De acuerdo con los resultados obtenidos, seleccionamos la cantidad de 3 μg de ARN, puesto que con esta cantidad de ADNc todavía no se ha alcanzado la saturación.

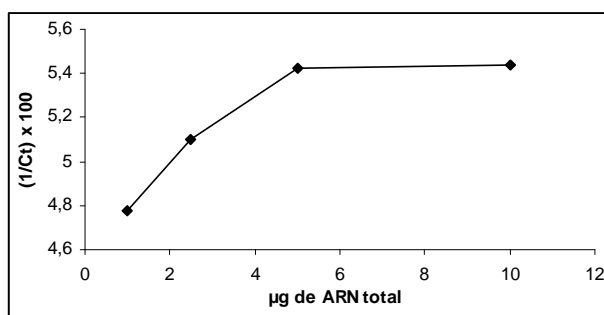


Figura 3.5: Puesta a punto de la cantidad de ARN a utilizar en la retrotranscripción. Representamos la inversa de los Ct obtenidos después de la amplificación de GAPDH en función de la cantidad de ARN añadido.

Con el kit de *Applied Biosystems*, la realización de la retrotranscripción comienza preparando, en microtubos eppendorf, un volumen equivalente a 4 μg de ARN total y agua-DEPC en cantidad suficiente hasta alcanzar los 50 μL . A continuación se desnaturaliza el ARN calentando durante 10 minutos a 65 $^{\circ}\text{C}$, utilizando un termociclador (Biometra[®] T Gradient). Transcurrido este tiempo, se colocan los tubos inmediatamente a 4 $^{\circ}\text{C}$ para evitar la renaturalización. Se aprovecha este tiempo para preparar la mezcla con los reactivos comunes (mezcla master-mix) según las concentraciones indicadas anteriormente. Finalmente, a los 50 μL de cada tubo de reacción se añaden 50 μL de la mezcla master-mix. Los 100 μL resultantes se llevan al termociclador (previamente programado para operar 10 minutos a 25 $^{\circ}\text{C}$, seguido de 2 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$).

Posteriormente, se procede a la purificación del ADNc utilizando un kit de laboratorios *GE Healthcare Life Sciences*, GFX™. Este método usa un agente caotrópico que desnaturaliza proteínas, disuelve agarosa y promueve la unión del ADN a una matriz de fibra de vidrio. Una vez que el ADN es ‘capturado’, las proteínas, sales, nucleótidos no incorporados y cebadores son lavados, y el ADN purificado se eluye de forma concentrada con agua bidestilada autoclavada. El procedimiento detallado es el siguiente:

Se coloca la columna sobre el tubo colector. Se añaden sobre la columna 500 µL del tampón de captura. Posteriormente se transfieren los 33 µL de la solución de ADNc a la columna que contienen el tampón de captura y, tras centrifugar a 16.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente, el ADNc queda fijado en las columnas. A continuación, desechamos el líquido del tubo colector y volvemos a colocarlo debajo de la columna, añadiendo sobre ésta 500 µL de tampón de lavado y centrifugando de nuevo a 16.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente. En este paso, el ADNc unido a la matriz se lava con una solución etanólica, para eliminar sales y otros contaminantes. Además, se seca la matriz antes de la elución. Tras desechar el líquido del tubo colector, la columna se coloca sobre un microtubo eppendorf de 1,5 mL de capacidad, se añaden 55 µL de agua bidestilada autoclavada y se deja incubar 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, el ADNc purificado se eluye mediante centrifugación durante 1 minuto a 16.000 x g y temperatura ambiente, y se cuantifica a una longitud de onda de 260 nm.

3.10.10.5. PCR en tiempo real

En las técnicas convencionales de PCR, el análisis de los productos obtenidos se realiza una vez que ha finalizado el proceso de amplificación,

normalmente mediante una electroforesis en gel de agarosa, que permite evaluar el tamaño y la pureza de los productos. Por ello, a estas técnicas convencionales de PCR se las denomina determinaciones en el punto final. La principal característica de la PCR en tiempo real es que el análisis de los productos se produce durante el proceso de amplificación, mediante cuantificación de la fluorescencia. Para esto se utilizan termocicladores que son capaces de amplificar y detectar la fluorescencia simultáneamente. En este trabajo se ha utilizado el termociclador de tiempo real ABI 7000 de Applied Biosystems (figura 3.6), que contiene un bloque de 96 pocillos con un fluorímetro acoplado.



Figura 3.6: ABI 7000 de Applied Biosystems. Sistema que detecta y cuantifica ácidos nucleicos. Combina un termociclador, un detector de fluorescencia y un software específico de amplificación. Para inducir la fluorescencia durante la PCR, una luz láser es distribuida a los 96 pocillos a través de una matriz de fibras ópticas. La fluorescencia resultante vuelve a través de la fibra y se dirige hacia el espectrógrafo por una cámara CCD (change-coupled device).

La señal de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de producto de PCR amplificado, puede generarse con colorantes fluorescentes que pueden ser específicos e ADN de doble cadena (ADNdc), como el SYBR Green I o bien sondas fluorescentes específicas de secuencia, como las sondas Taqman.

En este trabajo se ha utilizado como colorante fluorescente el SYBR Green I, que es el más utilizado para la PCR en tiempo real. Este colorante se une al

ADNdc en el surco menor, y tras la unión la fluorescencia aumenta 100 veces. La principal ventaja es que se adhiere a cualquier ADNdc, no requiriéndose diseño y optimización de sondas; no obstante, esto también supone una desventaja, puesto que además de unirse al producto específico, también hace lo propio con productos inespecíficos y dímeros de cebadores. Existen varias formas de resolver este problema: la optimización de la reacción de PCR o la aplicación de las técnicas *hot start*; al final de la amplificación, una curva de disociación nos permite confirmar si efectivamente hay un solo producto de amplificación. La curva de disociación, o curva *melting*, representa la dependencia de la fluorescencia con la temperatura; así, al aumentar la temperatura, las dos cadenas de ADN se separan y disminuye la fluorescencia. En la figura 3.7 se muestra una imagen del colorante SYBR Green insertado en la doble hélice.

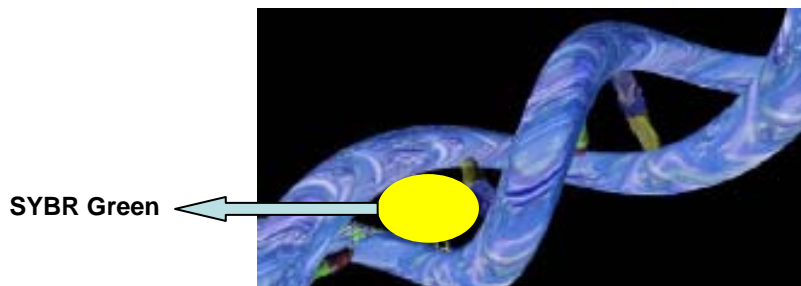


Figura 3.7: Colorante SYBR Green insertado en la doble hélice.

3.10.9.5.1. Condiciones de reacción para la realización de una PCR en tiempo real

En la siguiente tabla indicamos los reactivos necesarios para la realización de la PCR en tiempo real.

Componentes de la reacción	Concentración	Volumen (μL)
FastStart SYBR Green Master	2 X	10
Cebadores específicos (sentido y antisentido)	300 nM	0,4 μL + 0,4 μL
cDNA (convenientemente diluido)	4 μg	1
H ₂ O bidestilada tratada con DEPC		11,8
Total		20

Tabla 3.1: Reactivos necesarios para la realización de la PCR en tiempo real.

En la siguiente tabla se muestran los *primers* o cebadores utilizados para la amplificación de secuencias específicas de ARNm (o, mejor dicho, de ADNc):

Cebador	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
GAPDH	GCCAAAAGGGTCATCATCTCCGC	GGATGACCTTGCCACAGCCTTG
GPx	GGAGAATGGCAAGAATGAAGA	CCGCAGGAAGGTAAGAG
GR	GGAAACTCGCCATAGACTT	CCAACCACCTTCTCCTCTTT
SOD	CGTCATTCACTTCGAGCAGAAGG	GTCTGAGACTCAGACCACATA
eNOS	GGGCCAGGGTGATGAGCTCTG	CCCTCCTGGCTTCCAGTGTCC
P ₂₂ phox	GTCATCTGTCTGCTGGAGTA	ACGACCTCATCTGTCACTGGA

Tabla 3.2: Secuencia de los cebadores utilizados. El tamaño de los cebadores en pares de bases es de 319, 139, 256, 444, 324 y 337 para GAPDH, GPx, GR, SOD, eNOS y p22phox respectivamente.

Se ha utilizado una determinada cantidad de ADNc según el cebador o primer que se utilice. Así, al cargar la reacción para la PCR en tiempo real, se añade 1 μL de ADNc diluido 1/50 en agua bidestilada autoclavada cuando se han utilizado los cebadores de GAPDH, GPx, GR y SOD. Se ha realizado un experimento de eficiencia para optimizar la cantidad de ADNc necesaria para garantizar la amplificación máxima de cada fragmento (este experimento se detalla más adelante).

Una vez preparada la mezcla de reacción según la tabla anterior, se introduce la placa de 96 pocillos en el ABI PRISM[®] Sequence Detection Systems 7000, programado como se indica en la siguiente tabla:

	Pasos	Temp.	Tiempo
	Activación SYBR GREEN Master	50 °C	2 min.
	Desnaturalización inicial	95 °C	10 min.
40 ciclos	Desnaturalización	95 °C	15 seg.
	Hibridación / Elongación	60 °C	1 min.

Tabla 3.3: Programa utilizado en ABI PRISM[®] Sequence Detection Systems 7000 para la realización de la PCR en tiempo real.

Cabe destacar en este punto, que se ha empleado un método de cuantificación relativo, expresando el marcador en función de un *housekeeper*, que es un gen expresado constitutivamente en un nivel idéntico en todas las muestras analizadas. El gen empleado a tal efecto ha sido el correspondiente a la enzima gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH). Para la puesta a punto de la técnica se realiza una PCR en tiempo real con seis cantidades crecientes de ADNc (1 μ L diluido 1/100, 1 μ L diluido 1/50, 1 μ L diluido 1/10, 1 μ L diluido 1/5, 1 μ L sin diluir y 3 μ L sin diluir), tanto del *housekeeper* como de cada uno de los marcadores problema. De esta forma, se puede comprobar que la eficiencia de amplificación de ambos es la misma y la máxima. En la figura 3.8 se muestran las curvas de amplificación de la GAPDH y en la figura 3.9 la de uno de los marcadores problema (GPx) como ejemplo del resultado del experimento para puesta a punto.

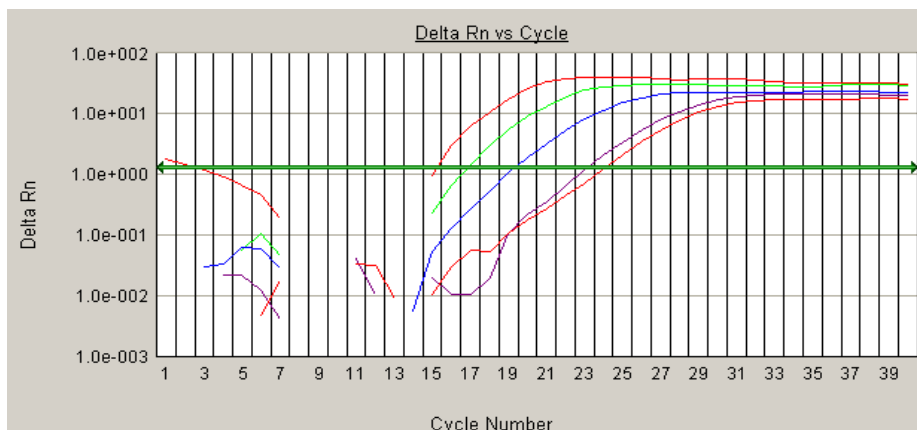


Figura 3.8: Curva de amplificación de la GAPDH. En esta gráfica se representa el logaritmo del valor de la fluorescencia (Delta Rn) obtenido de las diferentes cantidades de ADNc (1 μ L diluido 1/100, 1 μ L diluido 1/50, 1 μ L diluido 1/10, 1 μ L diluido 1/5, 1 μ L sin diluir y 3 μ L sin diluir) frente al número de ciclos.

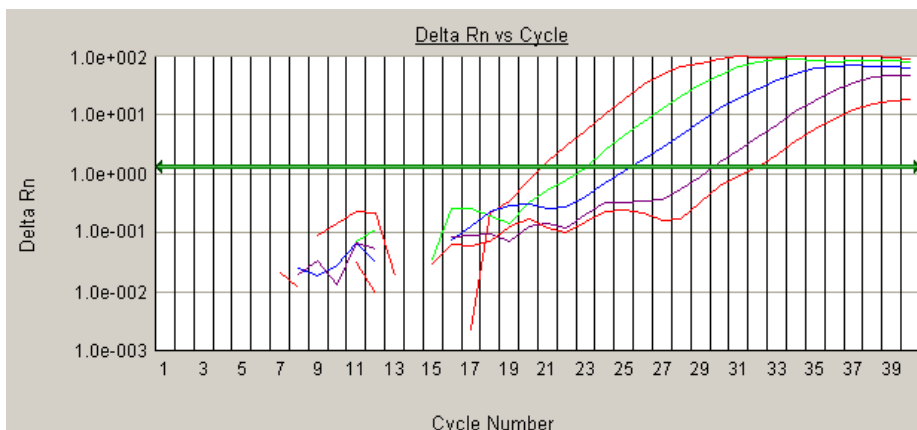


Figura 3.9: Curva de amplificación de uno de los marcadores problema (GPx). En esta gráfica se representa el logaritmo del valor de la fluorescencia (Delta Rn) obtenido de las diferentes cantidades de ADNc (1 μ L diluido 1/100, 1 μ L diluido 1/50, 1 μ L diluido 1/10, 1 μ L diluido 1/5, 1 μ L sin diluir y 3 μ L sin diluir) frente al número de ciclos.

En la figura 3.10 se representa el valor de Ct frente al logaritmo de la cantidad inicial de ADNc. El Ct se define como el ciclo en el que la curva de

amplificación se distingue del ruido de fondo (*background*) y es dependiente de la cantidad inicial de ADNc. Durante la fase exponencial de la PCR, la señal T se puede describir por la ecuación $T = T_0 E^n$. En el ciclo C_t la señal es la misma para todas las muestras y la ecuación vendrá dada por $T_{C_t} = T_0 E^{C_t}$. Despejando C_t de esta ecuación se llega a la siguiente igualdad:

$$C_t = - (1/\log E) \log T_0 + \log T_{C_t} / \log E$$

Siendo $m = - (1/\log E)$ y $b = \log T_{C_t} / \log E$, simplificamos la ecuación y:

$$C_t = m \log T_0 + b$$

Esta ecuación describe la relación lineal entre C_t y el logaritmo de la concentración inicial de la muestra, como se observa en la figura 3.10. Los parámetros b y m se pueden calcular por un análisis de regresión de los valores C_t de las diferentes diluciones de ADNc probadas. La eficiencia de amplificación puede ser reducida a través del parámetro m según la relación $E = 10^{-1/m}$. Teniendo en cuenta los valores de la pendiente obtenidos para cada recta representada en la figura 3.10, podemos calcular E para cada marcador, obteniéndose un valor de 2 en ambos casos. Por lo tanto, las eficiencias son las máximas e iguales tanto para el *housekeeper* como para cada uno de los parámetros.

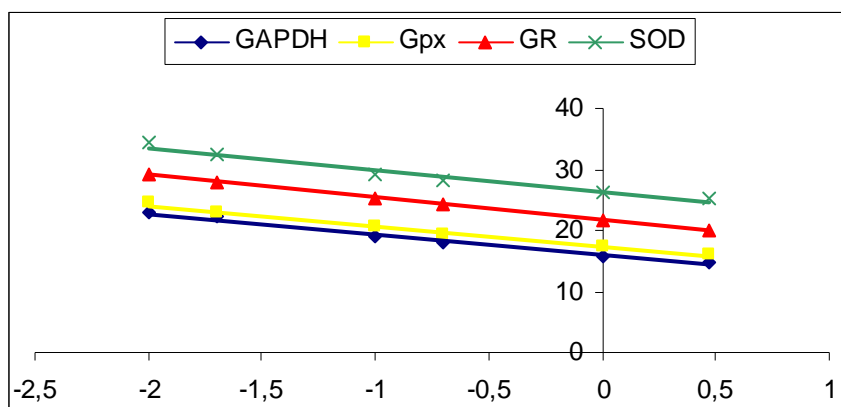


Figura 3.10: Determinación de las eficiencias de amplificación de la GAPDH, GPx, GR y SOD. Se representan los valores de Ct obtenidos frente al logaritmo de la cantidad inicial de ADNc (1/100, 1/50, 1/10, 1/5, 1 y 3 μ L). Cada uno de los marcadores (GAPDH, GPx, GR y SOD) ha presentado: $m = 3.231$, $m = 3.311$, $m = 3.485$ y $m = 3.3301$ respectivamente.

Una vez validado el método, procedemos a la cuantificación de los marcadores. Para el análisis de los resultados obtenidos hemos empleado el método $2^{-\Delta Ct}$, que asume que las eficiencias son las mismas y máximas, es decir igual a 2 (Livak K.J. y colaboradores, 2001). Si llamamos M a la cantidad del marcador, R a la cantidad de GAPDH y E a la eficiencia de amplificación de todos los marcadores y partiendo de la ecuación general de la PCR:

$$\begin{aligned} M_{CtM} &= M_0 E^{CtM} \\ R_{CtR} &= R_0 E^{CtR} \end{aligned}$$

Dividiendo ambas ecuaciones y reordenado los dos miembros de la igualdad, vemos que la cantidad de los marcadores relativa a la de GAPDH se puede calcular de la siguiente forma:

$$\text{Cantidad muestra / cantidad GAPDH} = 2^{-\Delta Ct}$$

donde $\Delta Ct = Ct_R - Ct_M$

El análisis de los resultados se realiza con el programa ABI Prism 7000 SDS Software.

3.11. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LA L-CARNITINA EN CORAZÓN

3.11.1. Estudio de la actividad plasmática de los marcadores inflamatorios

Para la determinación de la actividad plasmática de los marcadores inflamatorios se han empleado unos kits comerciales proporcionados por *Pierce Biotechnology*. Con este estudio se pretende poner de manifiesto que la L-carnitina ayuda a mejorar los niveles plasmáticos circulantes de las moléculas mediadoras del proceso inflamatorio (TNF- α , IL-1 β y IL-6), que se encuentran alteradas en las ratas hipertensas.

3.11.1.1. Actividad plasmática del marcador inflamatorio TNF- α

Los reactivos proporcionados por el kit son los siguientes:

- Placa de ELISA de 96 pocillos con Anti-Rat TNF- α .
- Estándar de TNF- α .
- Diluyente del estándar.
- Tampón de pretratamiento.
- Reactivo del anticuerpo biotilizado.
- Reactivo con el conjugado estreptavidina-HRP.
- Solución del sustrato TMB.

- Tampón de lavado 30X.
- Solución de parada.
- Adhesivos cubre-pocillos.

El protocolo experimental para la realización del experimento es el siguiente: se añaden 50 μ L de los estándares o de las muestras (por duplicado) a cada pocillo de la placa de ELISA, a los que previamente se les ha añadido 50 μ L del tampón de tratamiento, y se cubre la placa para incubarla durante 1 hora a 20-25 °C. Tras la incubación se lava tres veces la placa con tampón de lavado. Se añaden 50 μ L del reactivo del anticuerpo biotinilizado, se incuba durante 1 hora y se vuelve a lavar tres veces. Posteriormente, se añaden 100 μ L del reactivo con el conjugado de estreptavidina-HRP proporcionado por el kit, se incuba durante 30 minutos a 20-25 °C. Después de haber lavado la placa, se añaden 100 μ L del sustrato TMB, se incuba en oscuridad durante 10 minutos a 20-25 °C y se para la reacción con la solución de parada. Finalmente, se mide la absorbancia de la placa a 450 nm (sustrayéndole el valor de absorbancia a 550 nm, para evitar el ruido de fondo) en el lector de microplacas Asys UVM 340.

Los estándares se han realizado partiendo de una solución madre, para tras sucesivas diluciones, obtener una curva estándar con seis puntos. Las concentraciones de los distintos patrones son: 2500, 833, 278, 93, 31 y 0 pg/mL.

Los resultados (en pg/mL) se obtienen extrapolando las absorbancias obtenidas en el lector de ELISA a la curva estándar.

3.11.1.2. Actividad plasmática del marcador inflamatorio IL-1 β

Los reactivos proporcionados por el kit son los siguientes:

- Placa de ELISA de 96 pocillos preincubada con Anti-Rat IL-1 β .

- Estándar de IL-1 β .
- Diluyente del estándar.
- Reactivo del anticuerpo biotilizado.
- Reactivo concentrado con el conjugado estreptavidina-HRP.
- Tampón de dilución del concentrado el conjugado estreptavidina-HRP.
- Solución del sustrato TMB.
- Tampón de lavado 30X.
- Solución de parada.
- Adhesivos cubre-pocillos.

El protocolo experimental para la realización del experimento es el siguiente: se añaden 50 μ L de los estándares o de las muestras (por duplicado) a cada pocillo de la placa de ELISA, y se cubre la placa para incubarla durante 2 horas a 20-25 °C. Tras la incubación se lava cinco veces la placa con tampón de lavado. Se añaden 100 μ L del reactivo del anticuerpo biotilizado, se incuba durante 30 minutos y se vuelve a lavar cinco veces. Posteriormente, se añaden 100 μ L del reactivo con el conjugado de estreptavidina-HRP (que se prepara mezclando 2.5 μ L del concentrado con 1 mL del tampón de dilución, por pocillo), se incuba durante 30 minutos a 20-25 °C. Después de haber lavado la placa, se añaden 100 μ L del sustrato TMB, se incuba en oscuridad durante 30 minutos a 20-25 °C y se para la reacción con 100 μ L de la solución de parada. Finalmente, se mide la absorbancia de la placa a 450 nm (sustrayéndole el valor de absorbancia a 550 nm, para evitar el ruido de fondo) en el lector de microplacas Asys UVM 340.

Los estándares se han realizado partiendo de una solución madre, para tras sucesivas diluciones, obtener una curva estándar con siete puntos. Las

concentraciones de los distintos patrones son: 2500, 1000, 400, 160, 25.6, 10.24 y 0 pg/mL.

Los resultados (en pg/mL) se obtienen extrapolando las absorbancias obtenidas en el lector de ELISA a la curva estándar.

3.11.1.3. Actividad plasmática del marcador inflamatorio IL-6

Los reactivos proporcionados por el kit son los siguientes:

- Placa de ELISA de 96 pocillos preincubada con Anti-Rat IL-6.
- Estándar de IL-6.
- Diluyente del estándar.
- Reactivo del anticuerpo biotilizado.
- Reactivo concentrado con el conjugado estreptavidina-HRP.
- Tampón de dilución del concentrado el conjugado estreptavidina-HRP.
- Solución del sustrato TMB.
- Tampón de lavado 30X.
- Solución de parada.
- Adhesivos cubre-pocillos.

El protocolo experimental para la realización del experimento es el siguiente: se añaden 50 μ L de los estándares o de las muestras (por duplicado) a cada pocillo de la placa de ELISA, y se cubre la placa para incubarla durante 2 horas a 20-25 °C. Tras la incubación se lava tres veces la placa con tampón de lavado. Se añaden 100 μ L del reactivo del anticuerpo biotilizado, se incuba durante 1 hora y se vuelve a lavar tres veces. Posteriormente, se añaden 100 μ L del reactivo con el conjugado de estreptavidina-HRP (que se prepara mezclando 2.5 μ L del concentrado con 1 mL del tampón de dilución, por pocillo), se incuba

durante 30 minutos a 20-25 °C. Después de haber lavado la placa, se añaden 100 µL del sustrato TMB, se incuba en oscuridad durante 30 minutos a 20-25 °C y se para la reacción con 100 µL de la solución de parada. Finalmente, se mide la absorbancia de la placa a 450 nm (sustrayéndole el valor de absorbancia a 550 nm, para evitar el ruido de fondo) en el lector de microplacas Asys UVM 340.

Los estándares se han realizado partiendo de una solución madre, para tras sucesivas diluciones, obtener una curva estándar con ocho puntos. Las concentraciones de los distintos patrones son: 2000, 1000, 500, 250, 125, 62, 31 y 0 pg/mL.

Los resultados (en pg/mL) se obtienen extrapolando las absorbancias obtenidas en el lector de ELISA a la curva estándar.

3.11.2. Estudio de la expresión del ARNm de los marcadores inflamatorios y del sistema NF-κB/IκB en corazón

Para realizar este estudio se ha seguido las mismas técnicas y procedimientos de extracción de ARN, retrotranscripción y PCR en tiempo real explicados en el apartado 3.10.10. Las diferencias se encuentran en los *primers* o cebadores utilizados para la realización de la PCR en tiempo real, así como en las diluciones de ADNc necesarias para amplificar las regiones de los marcadores inflamatorios objetos de estudio (TNF-α, IL-1β, IL-6, subunidad p50 de NF-κB e IκB). En la siguiente tabla se muestran las secuencias de los cebadores utilizados.

Cebador	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
TNF-α	TCATTCCTGCTCGTGGCGGG	CG GCTGACGGTGTGGGTGAG
IL-1β	GAGGCTGACAGACCCCAAAAGAT	GCACGAGGCATTTTTGTTGTTCA
IL-6	GAAATACAAAGAAATGATGGATGCT	TTCAAGATGAGTTGGATGGTCT
NF-κB	CCTAGCTTTCTCTGAACTGCAAA	GGGTCAGAGGCCAATAGAGA
IκB	TGGCTCATCGTAGGGAGTTT	CTCGTCCTCGACTGAGAAGC

Tabla 3.4: Secuencias de los cebadores objeto de estudio. Los tamaños de las secuencias amplificadas por los cebadores son de 370, 336, 310, 71 y 68 pares de bases para TNF- α , IL-1 β , IL-6, subunidad p50 de NF- κ B e I κ B respectivamente.

Las diluciones del ADNc para la realización de la PCR en tiempo real son: 1/5 para TNF- α y IL-1 β , 1/10 para IL-6 y ADNc sin diluir para NF- κ B e I κ B.

3.12. VALORACIÓN DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

3.12.1. Estudio de la expresión del ARNm de ACE y AT-1 en corazón

Por último se ha estudiado la expresión génica de ACE y del receptor AT-1, siguiendo el mismo protocolo de trabajo descrito en el apartado 3.10.10.

Cebador	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
ACE	CAAAGTTCACTTGCTTCTTGG	TACTGTAAATGGTGCTCATGG
AT-1	CACCTATGTAAGATCGCTTC	GCACAATCGCCATAATTATCC

Tabla 3.5: Secuencias de los cebadores objeto de estudio. Los tamaños de las secuencias amplificadas por los cebadores son de 262 y 445 pares de bases para ACE y AT-1 respectivamente.

Las diluciones del ADNc para la realización de la PCR en tiempo real son: 1/5 para ACE y 1/50 para AT-1.

3.13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La comparación entre los diferentes grupos experimentales de animales se ha realizado utilizando el test de ANOVA, y en aquellos casos que han mostrado

significación estadística, se ha aplicado el test de la t de Student, considerándose diferencias estadísticamente significativas para valores de $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANIMALES

4.1.1. Peso corporal

Durante las 12 semanas de tratamiento de los animales se sigue un control semanal del peso corporal, así como de la ingesta de agua bebida para la correcta preparación de la medicación (se realiza cada medición siempre el mismo día y a la misma hora). En la Figura 4.1 se muestra como el peso corporal de los animales no ha mostrado diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales de animales (ver apartado 3.1) al final del periodo de experimentación.

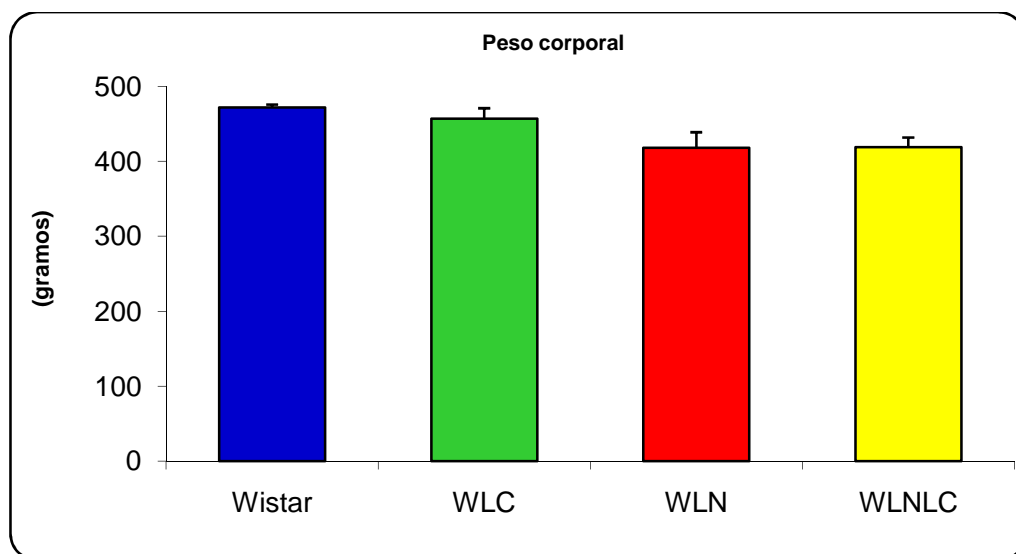


Figura 4.1. Peso corporal en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados, expresados en gramos, representan la media \pm error estándar de entre 10 y 15 animales en cada grupo.

4.1.2. Peso corazón/peso corporal

Transcurridas las 12 semanas del tratamiento, se procede al sacrificio de los animales (proceso explicado en el apartado 3.4.2) para la posterior extracción

del corazón, órgano objeto de nuestro estudio. Se separa el ventrículo izquierdo, se limpia con suero fisiológico y se pesa (apartado 3.5). En la figura 4.2 se muestra la relación del peso del corazón con respecto a la masa corporal al final del tratamiento. Esta relación aumenta de forma significativa en las ratas tratadas con L-NAME con respecto a los valores obtenidos en las ratas Wistar controles. El tratamiento con LC no modifica significativamente esta relación en las ratas controles, tanto normotensas como hipertensas, aunque se observa un ligero descenso de la relación en éstas últimas con respecto a las ratas hipertensas tratadas.

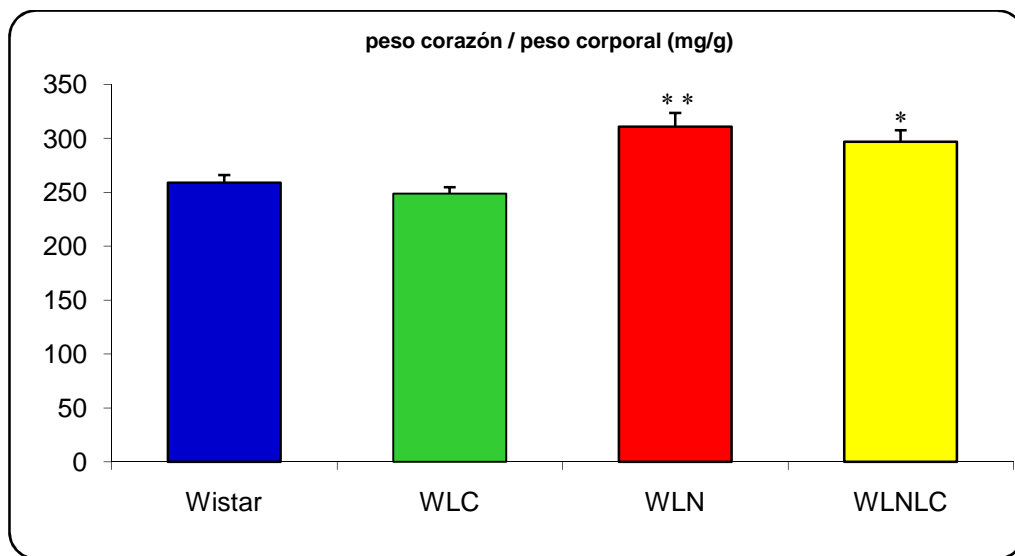


Figura 4.2. Relación entre el peso del corazón y el peso corporal. Los resultados representan la media \pm error estándar de entre 10 y 15 animales en cada grupo. Significación estadística: * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ comparado con Wistar.

4.1.3. Presión sanguínea

En las figuras 4.3, 4.4, 4.5 y 4.6 se muestran, respectivamente, los resultados de las medidas de las presiones arteriales sistólicas y diastólicas tanto semanalmente como al final del tratamiento.

La presión arterial sistólica final es mayor en el grupo con hipertensión inducida por L-NAME en relación al resto. Se observa que tras el tratamiento con LC no varían significativamente los valores de PAS cuando se administra a ratas normotensas (WLC), sin embargo las ratas hipertensas tratadas con LC muestran al final del tratamiento un descenso del 43 % en los valores de la PAS respecto al aumento producido en el grupo WLN), aunque no llega a normalizarse.

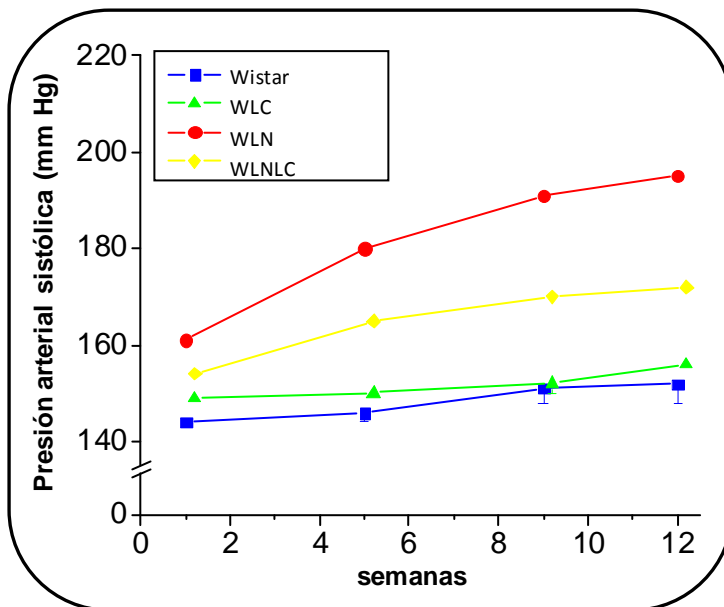


Figura 4.3. Evolución semanal de la presión arterial sistólica en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados están expresados en milímetros de mercurio (mm Hg); y representan la media \pm error estándar de al menos 10 animales en cada grupo.

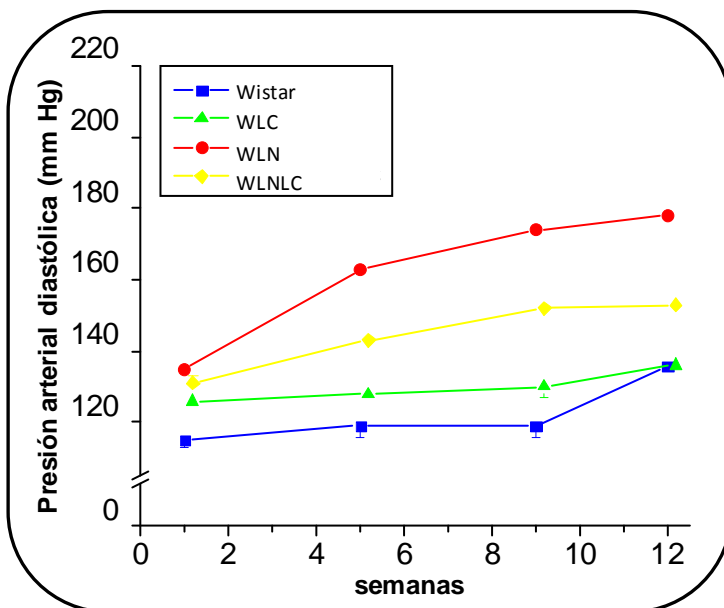


Figura 4.4. Evolución semanal de la presión arterial sistólica en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados están expresados en milímetros de mercurio (mm Hg); y representan la media \pm error estándar de al menos 10 animales en cada grupo.

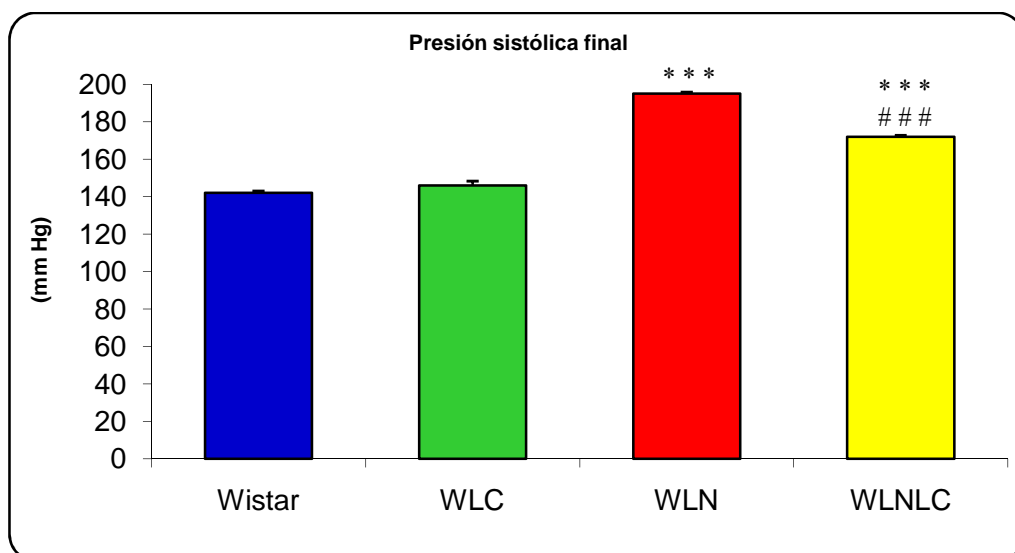


Figura 4.5. Presión arterial sistólica final en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados están expresados en

milímetros de mercurio (mm Hg); y representan la media \pm error estándar de al menos 10 animales en cada grupo. Significación estadística: ***P < 0.001 comparado con Wistar, ###P < 0.001 comparado con WLN.

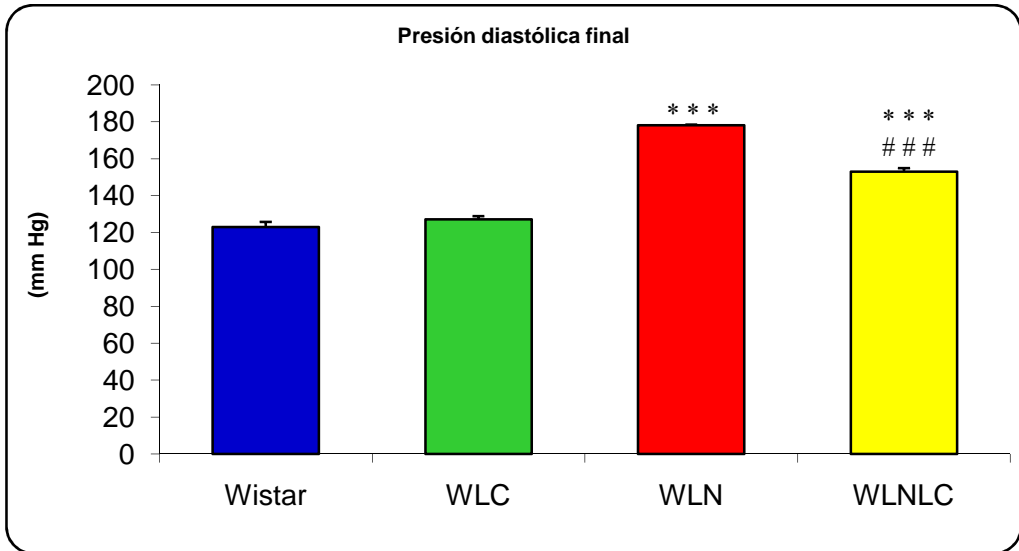


Figura 4.6. Presión arterial diastólica final en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados están expresados en milímetros de mercurio (mm Hg); y representan la media \pm error estándar de al menos 10 animales en cada grupo. Significación estadística: ***P < 0.001 comparado con Wistar, ###P < 0.001 comparado con WLN.

Al analizar las cifras de PAD al final del tratamiento, se observa unos resultados similares a los observados en las cifras de PAS. Tras el tratamiento con LC se consigue una reducción significativa de la PAD en las ratas con hipertensión inducida por L-NAME (mostrándose un descenso del 46 % en las cifras de presión respecto del aumento producido tras la administración de L-NAME), igualmente no llegan a alcanzarse los valores obtenidos en las ratas normotensas controles.

4.2. PERFIL LIPÍDICO

Para definir el perfil lipídico hemos estudiado las concentraciones plasmáticas del colesterol y de los triglicéridos.

4.2.1. Colesterol total

En la figura 4.7 se muestran los resultados de las concentraciones plasmáticas del colesterol total entre los cuatro grupos experimentales de animales. Se observa que tras la ingesta de LC por parte del grupo hipertenso disminuyen las concentraciones del colesterol con respecto al grupo control y al grupo con hipertensión inducida por L-NAME, lo que destacaría el poder hipocolesterolemiante de la LC. Por el contrario, los niveles de colesterol total no se ven afectados en las ratas normotensas por el tratamiento con LC.

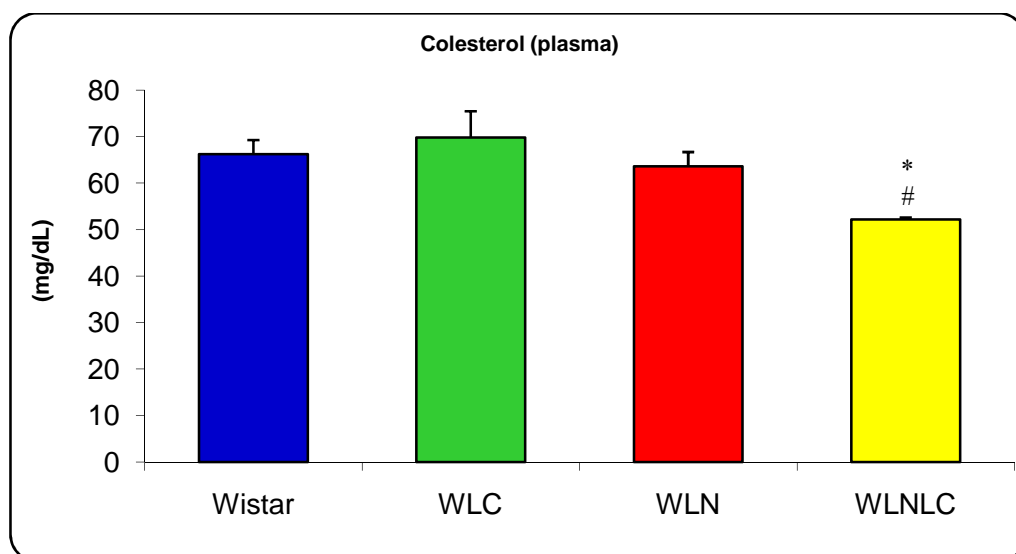


Figura 4.7. Concentración de colesterol total en plasma de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y ratas tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados están expresados en mg por cada decilitro de plasma; y representan la media \pm error estándar de al

menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: * $P < 0.05$ comparado con Wistar y # $P < 0.05$ comparado con WLN.

4.2.2. Triglicéridos totales

En la figura 4.8 se muestran los resultados de las concentraciones plasmáticas de triglicéridos en los cuatro grupos de trabajo. Se observa, al igual que en la gráfica 4.6, una disminución significativa de los valores en el grupo WLNLC con respecto a los grupos Wistar y WLN. Lo que podría destacar, también, el efecto hipotrigliceridemiante de la LC. Tampoco se observan diferencias significativas entre los grupos Wistar y WLC.

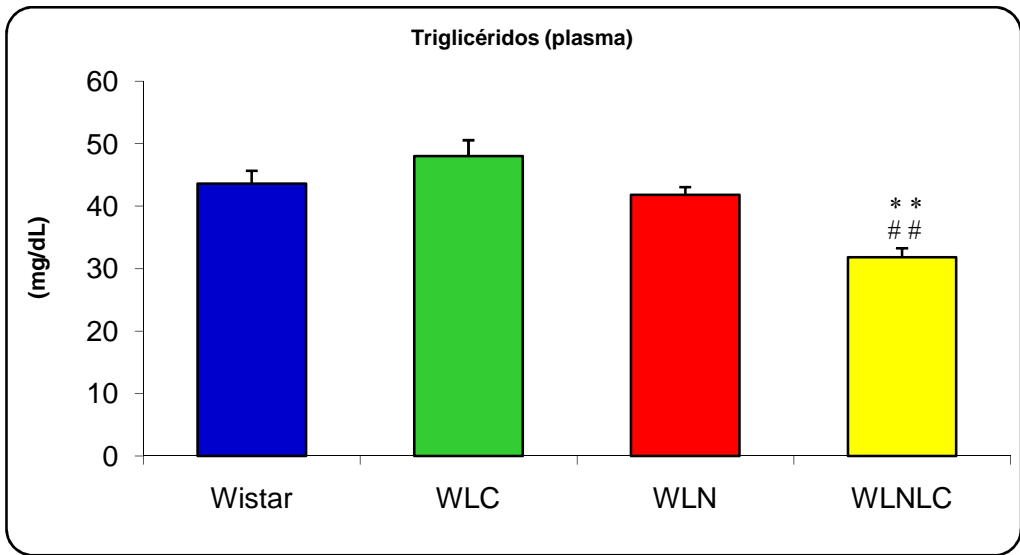


Figura 4.8. Concentración de triglicéridos en plasma de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y ratas tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados están expresados en mg por cada decilitro de plasma; y representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: * $P < 0.01$ comparado con Wistar y ## $P < 0.01$ comparado con WLN.

4.3. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA L-CARNITINA

Para el estudio de la capacidad antioxidante de la LC se ha evaluado el estado antioxidante total y la concentración de óxido nítrico (en plasma y en homogeneizados de corazón), así como el estudio detallado de las enzimas antioxidantes (actividad en eritrocitos y homogeneizados de corazón). Por otro lado, hemos evaluado la abundancia relativa y la expresión relativa de ARN de las enzimas antioxidantes en homogeneizados de corazón con el fin de estudiar la regulación de las citadas enzimas por la administración de LC.

4.3.1. Estado antioxidante total

4.3.1.1. Determinación de la capacidad antioxidante total en plasma

En la figura 4.9 se pueden ver los resultados de la determinación de la capacidad antioxidante total en plasma (medida por el método ORAC-FL) en los cuatro grupos experimentales de animales. Se observa un descenso significativo de los valores en el grupo control hipertenso comparado con las ratas Wistar. Tras la administración de la LC aumentan dichos valores hasta alcanzar los presentados por el grupo normotenso control. No se observan diferencias significativas tras el tratamiento con LC en el grupo WLC.

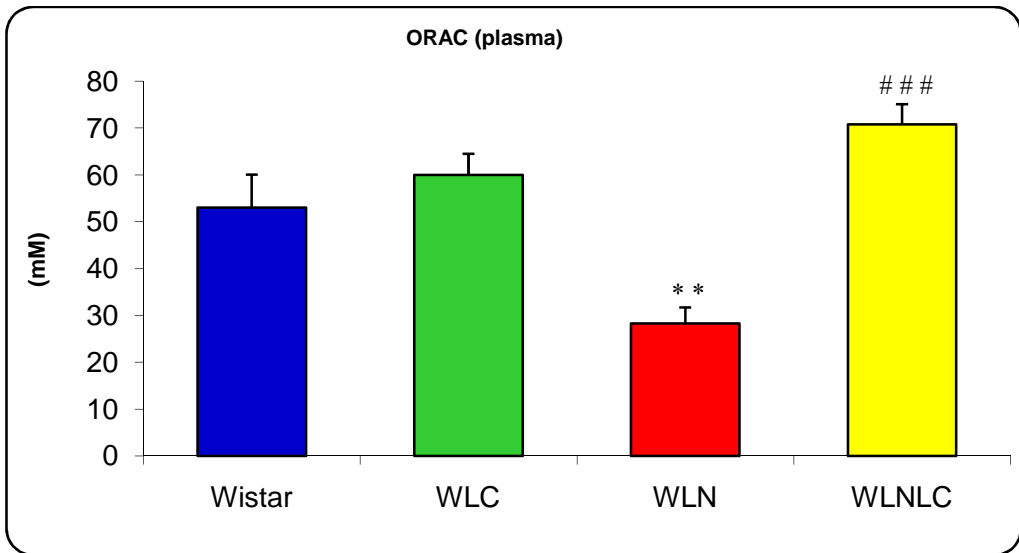


Figura 4.9. Capacidad antioxidante total en plasma de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados están expresados en milimolar (mM); y representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: ** $P < 0.01$ comparado con Wistar y ### $P < 0.001$ comparado con WLN.

4.3.1.2. Peroxidación lipídica en homogeneizados de corazón

Cuando se determinan los niveles de malondialdehído en homogeneizados de corazón como un índice de la peroxidación lipídica (figura 4.10), los resultados muestran que se produce un aumento significativo en el grupo con hipertensión inducida por L-NAME con respecto al grupo control. Estos valores se normalizan tras la administración de LC en el grupo hipertenso (WLNLC).

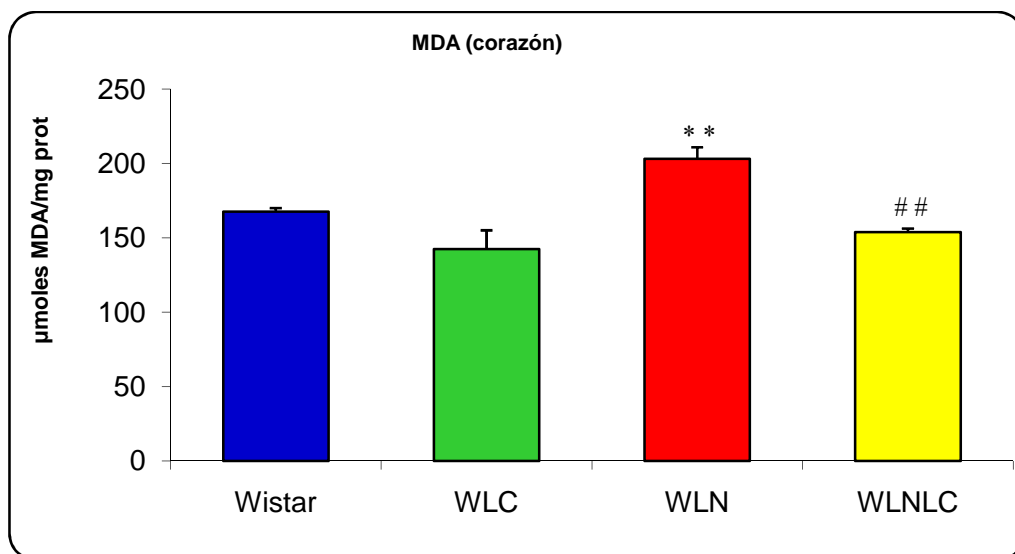


Figura 4.10. Peroxidación lipídica en homogeneizados de corazón procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNL). Los resultados están expresados en μ moles de malondialdehído (MDA) por cada miligramo de proteína; y representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: * * $P < 0.01$ comparado con Wistar y # # $P < 0.01$ comparado con WLN.

4.3.2. Niveles de óxido nítrico

Los niveles de óxido nítrico (NO) son importantes en su relación con la HTA, al ser el agente vasodilatador más importante del organismo. Una menor biodisponibilidad de NO puede ser debida a:

- 1) una mayor utilización por parte de las especies reactivas del oxígeno para transformarlo en ONOO^- en presencia de O_2^- , generándose vasoconstricción y, por lo tanto, aumento de la presión arterial (apartado 2.2.4).
- 2) una menor actividad en la enzima eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial).

4.3.2.1. Óxido nítrico en plasma

Como muestra la figura 4.11, las concentraciones de NO en el grupo WLN son significativamente menores que las del grupo Wistar. Los niveles del NO aumentan tras la administración de LC en el grupo hipertenso (WLNLC), alcanzando la normalidad.

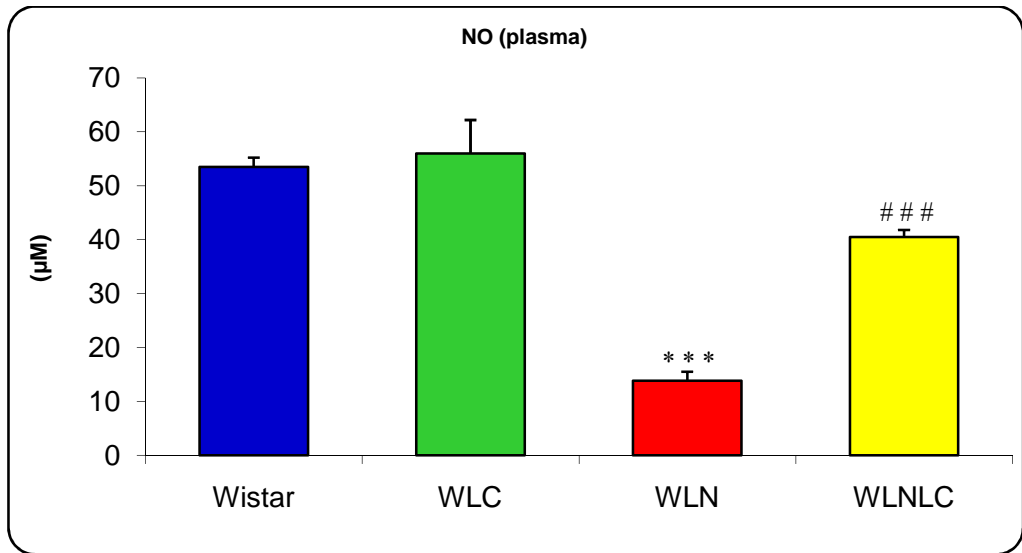


Figura 4.11. Concentración de NO en el plasma de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados se expresan en micromolar; y representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $P < 0.001$ comparado con Wistar y ### $P < 0.001$ comparado con WLN.

4.3.2.2. Óxido nítrico en corazón

Cuando se estudia la concentración de NO en homogeneizados de corazón (figura 4.12), se obtienen resultados similares a los expresados en la figura anterior. Es decir, la concentración de NO disminuye en las ratas con hipertensión inducida con L-NAME. Estos valores aumentan en las ratas hipertensas tras la

administración de LC, llegando a alcanzar los niveles observados en las ratas controles normotensas.

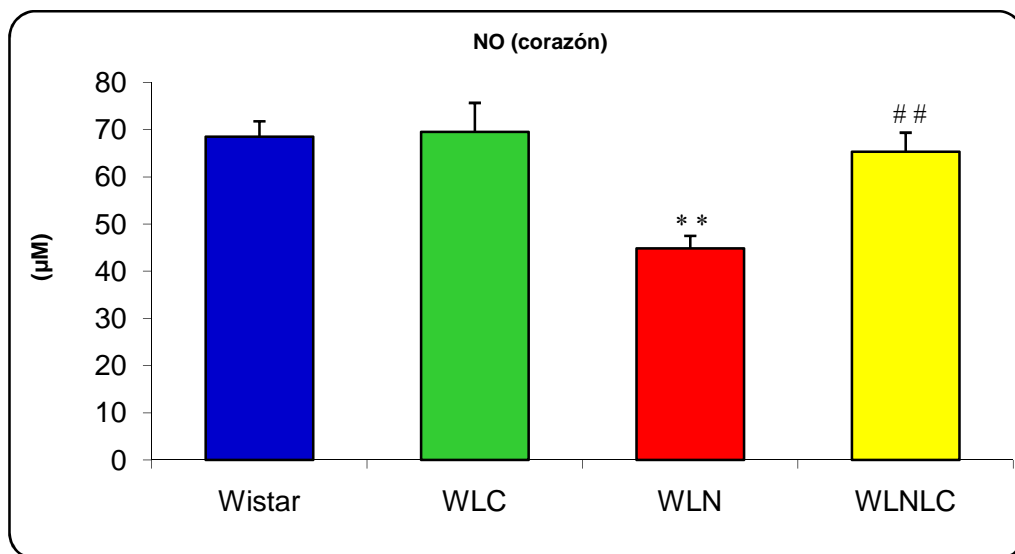


Figura 4.12. Concentración de NO en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLN y WLNLC). Los resultados están expresados en micromolar; y representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: * * $P < 0.01$ comparado con Wistar y ## $P < 0.01$ comparado con WLN.

4.3.3. Enzimas antioxidantes en eritrocitos

4.3.3.1. Glutathion peroxidasa en eritrocitos

En la figura 4.13 se aprecia como disminuye la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en eritrocitos en el grupo hipertenso control con respecto al grupo Wistar. Tras la administración de LC estos valores aumentan hasta alcanzar niveles similares a los del grupo normotenso control.

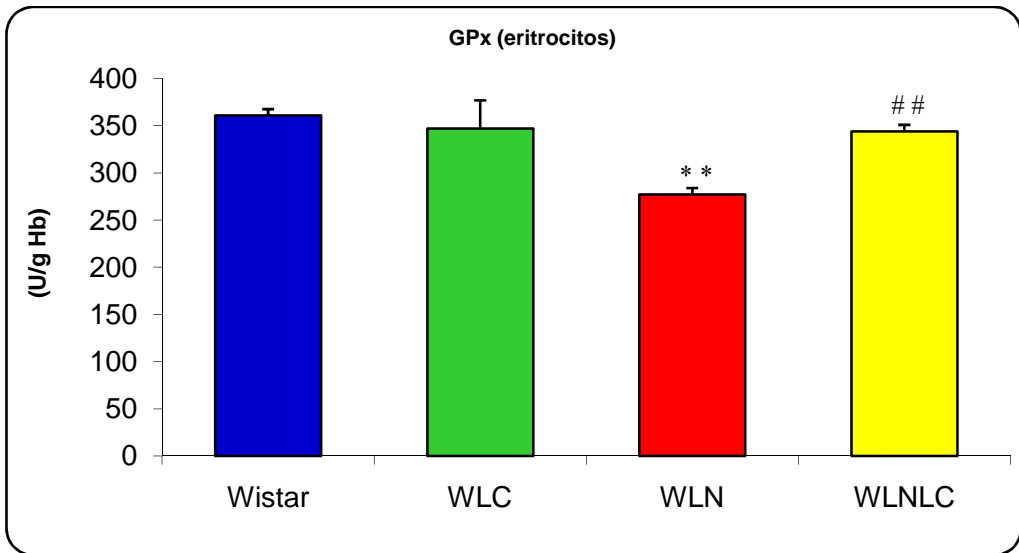


Figura 4.13. Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en eritrocitos procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados están expresados en unidades de actividad enzimática (U) por gramo de hemoglobina; y representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: ** $P < 0.01$ comparado con Wistar y ## $P < 0.01$ comparado con WLN.

4.3.3.2. Glutacion reductasa en eritrocitos

La figura 4.14 muestra la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) en eritrocitos obtenidos de los cuatro grupos experimentales de animales. Se observa que las ratas hipertensas tienen una menor actividad de esta enzima y que el tratamiento con LC la aumenta. No se observan diferencias significativas en el grupo normotenso tras la administración con LC.

4.3.3.3. Superóxido dismutasa en eritrocitos

Cuando se analizan los resultados del estudio de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en eritrocitos procedentes de los cuatro grupos experimentales

de animales (4.15), se observa que sus valores sufren un descenso significativo en las ratas hipertensas controles comparado con los del grupo normotenso control. Estos niveles de actividad se elevan hasta alcanzar la normalidad en el grupo hipertenso tratado con LC. Tampoco se observan diferencias significativas tras la administración de LC en el grupo normotenso.

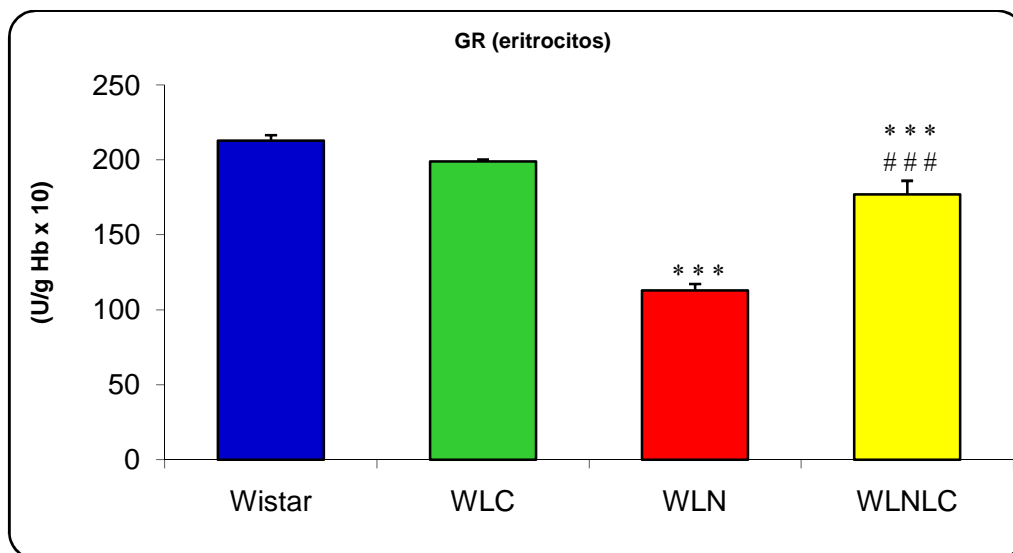


Figura 4.14. Actividad de la enzima glutation reductasa (GR) en eritrocitos procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados están expresados en unidades de actividad enzimática (U) por gramo de hemoglobina y multiplicado por 10; y representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $P < 0.001$ comparado con Wistar y ### $P < 0.001$ comparado con WLN.

4.3.3.4. Relación GSH/GSSG en sangre heparinizada

En la figura 4.16 se muestran los resultados obtenidos al analizar la relación GSH/GSSG en sangre heparinizada procedente de los cuatro grupos experimentales de trabajo. El grupo con hipertensión inducida con L-NAME presenta unos valores significativamente menores a los observados en el grupo

control. La administración de LC provoca un aumento de esta relación GSH/GSSG en el grupo hipertenso (WLNL), sin verse afectado el grupo normotenso (WLC).

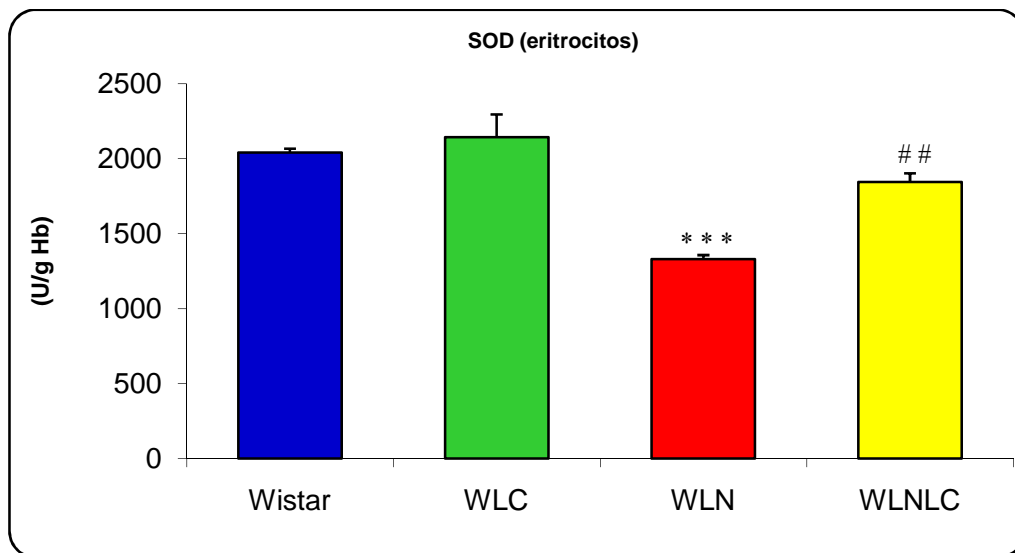


Figura 4.15. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en eritrocitos procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNL). Los resultados están expresados en unidades de actividad enzimática (U) por gramo de hemoglobina; y representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $P < 0.001$ comparado con Wistar y ## $P < 0.01$ comparado con WLN.

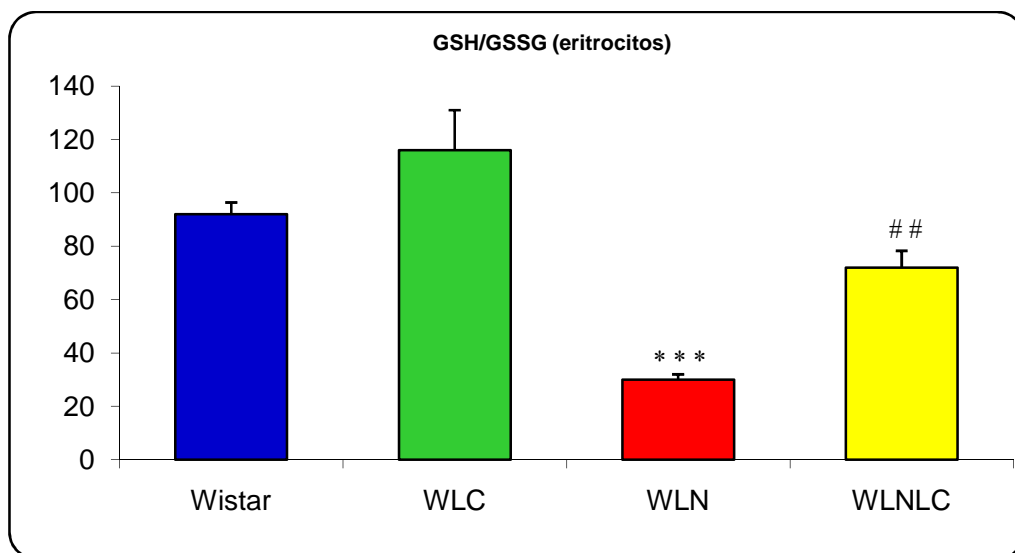


Figura 4.16. Relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) en sangre heparinizada procedente de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $P < 0.001$ comparado con Wistar y ## $P < 0.01$ comparado con WLN.

4.3.4. Enzimas antioxidantes en corazón

Para la realización de este estudio se han utilizado homogeneizados de corazón (ver apartado 3.10.1).

4.3.4.1. Glutatión peroxidasa en homogeneizados de corazón

Al analizar la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa en homogeneizados de corazón procedentes de los cuatro grupos experimentales de animales (figura 4.17), se observa una disminución en los valores de esta enzima en el grupo hipertenso control comparado con el grupo normotenso (Wistar). Tras la administración de LC, la actividad de la GPx aumenta en ratas hipertensas,

aunque no alcanzan los valores presentados por el grupo Wistar. El tratamiento con LC no modifica la actividad GPx en ratas normotensas.

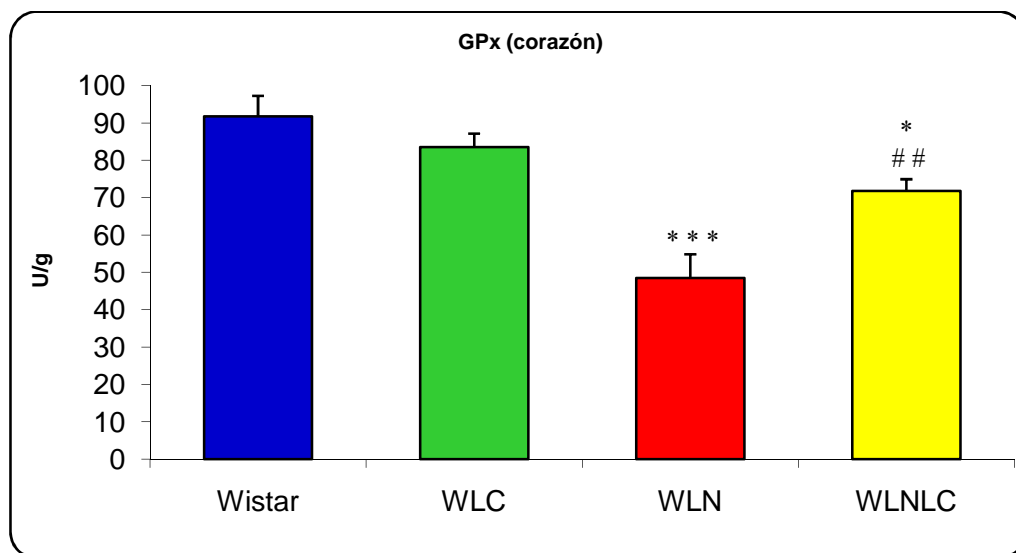


Figura 4.17. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en homogeneizados de corazón procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados están expresados en unidades de actividad enzimática (U) por gramo de proteína; y representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: * $P < 0.05$ y *** $P < 0.001$ comparado con Wistar, y ## $P < 0.01$ comparado con WLN.

4.3.4.2. Glutatión reductasa en homogeneizados de corazón

En la figura 4.18 se observan los resultados obtenidos al analizar la actividad de la enzima glutatión reductasa (GR) en homogeneizados de corazón procedentes de los cuatro grupos de trabajo. La actividad de esta enzima está aumentada en ratas hipertensas controles con respecto a sus controles normotensas. El tratamiento con LC disminuye estos valores hasta llegar a

presentar niveles parecidos a los del grupo Wistar. No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos normotensos (Wistar y WLN).

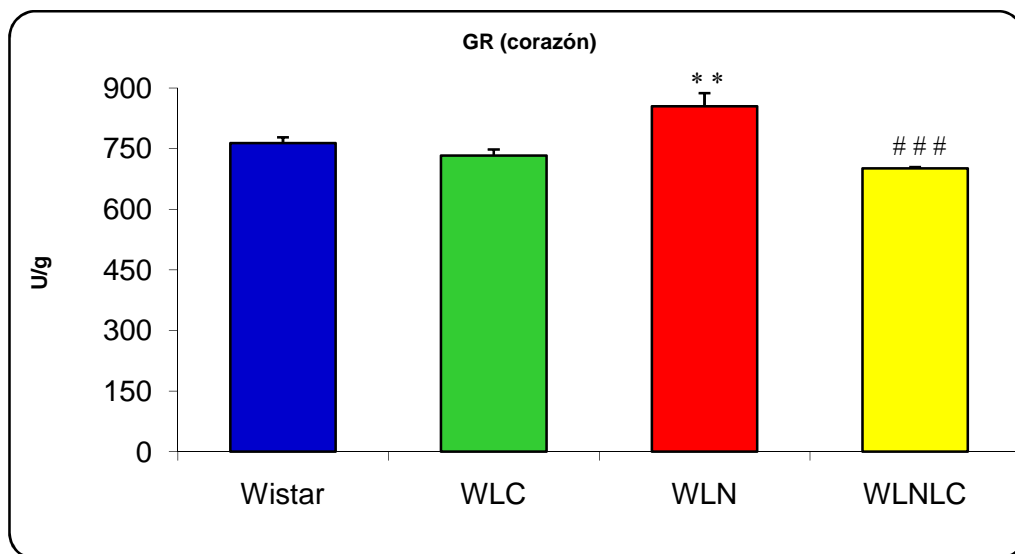


Figura 4.18. Actividad de la enzima glutathione reductasa en homogeneizados de corazón procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados están expresados en unidades de actividad enzimática (U) por gramo de proteína; y representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: * * $P < 0.01$ comparado con Wistar, y # # # $P < 0.001$ comparado con WLN.

4.3.4.3. Superóxido dismutasa en homogeneizados de corazón

La actividad de la SOD presenta valores menores en el grupo WLN que en el grupo Wistar. La administración de LC restablece los valores normales en el grupo WLNLC, sin ejercer ningún efecto sobre el grupo normotenso (WLC) (figura 4.19).

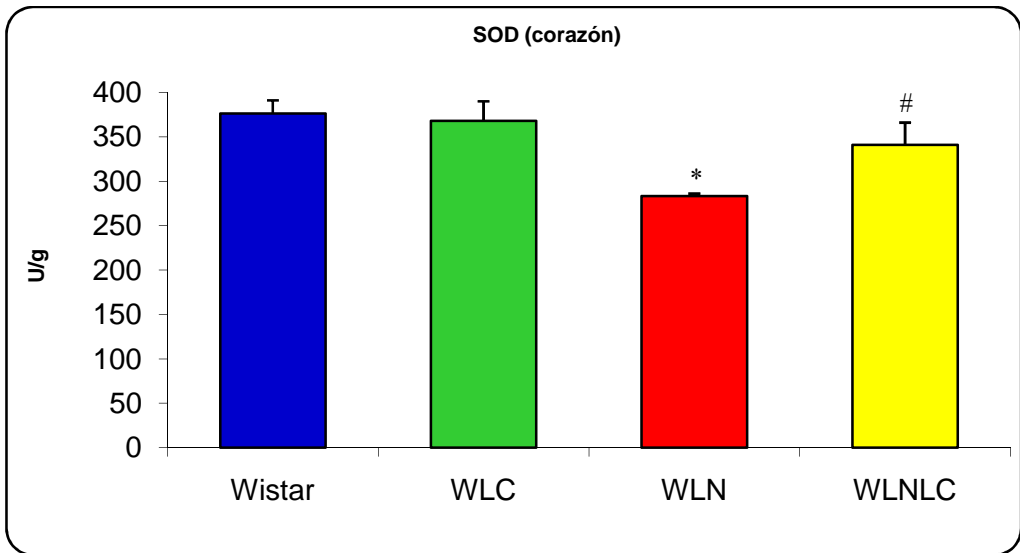


Figura 4.19. Actividad de la enzima superóxido dismutasa en homogeneizados de corazón procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados están expresados en unidades de actividad enzimática (U) por gramo de proteína; y representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: * $P < 0.05$ comparado con Wistar, y # $P < 0.05$ comparado con WLN.

4.3.4.4. Relación GSH/GSSG en homogeneizados de corazón

La figura 4.20 muestra que no existen diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales de animales cuando se analizan los resultados obtenidos de la determinación de la relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) en homogeneizados de corazón.

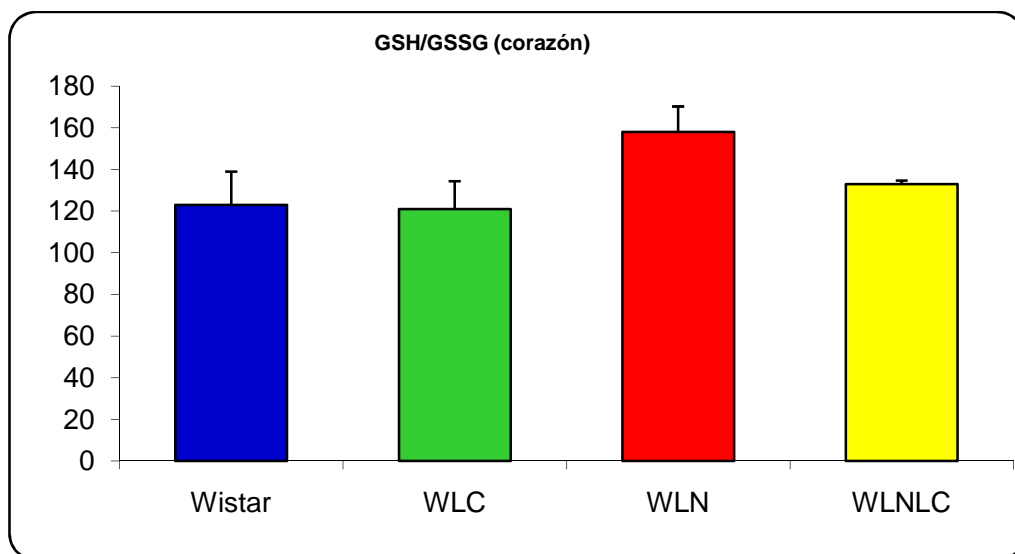


Figura 4.20. Determinación de la relación GSH/GSSG en homogeneizados de corazón procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo.

4.3.5. Expresión proteica relativa de las enzimas antioxidantes y eNOS en corazón

Para la obtención de estos resultados se han utilizado técnicas de Western Blotting (apartado 3.10.9). Las bandas obtenidas en las películas autorradiografiadas fueron analizadas por densitometría utilizando el programa informático PCBAS versión 2.08e. Los resultados de cada una de las autorradiografías de las proteínas objeto del estudio son analizadas en comparación con los resultados de las del GAPDH, que son utilizadas como controles de la técnica, confirmándose la idoneidad del ensayo al ser homogéneas las densidades de las bandas. En las figuras 4.21, 4.22, 4.23 y 4.24 se muestran las bandas correspondientes a los cuatro grupos experimentales de animales de las proteínas en estudio (GPx, GR, SOD y eNOS respectivamente), las del GAPDH y

su análisis comparativo con el control (mediante el diagrama de columnas coloreadas), utilizando el mencionado programa PCBAS.

4.3.5.1. *Western Blotting* de glutatión peroxidasa

En la figura 4.21 se muestran los resultados obtenidos tras la determinación de la expresión proteica de la enzima glutatión peroxidasa (comparada con el control) en homogeneizados de corazón (ver apartado 3.10.9.2). El grupo hipertenso control presenta unos valores significativamente menores que los presentados por el grupo normotenso control. La administración de LC aumenta estos niveles en el grupo hipertenso (WLNLC), alcanzando la normalidad.

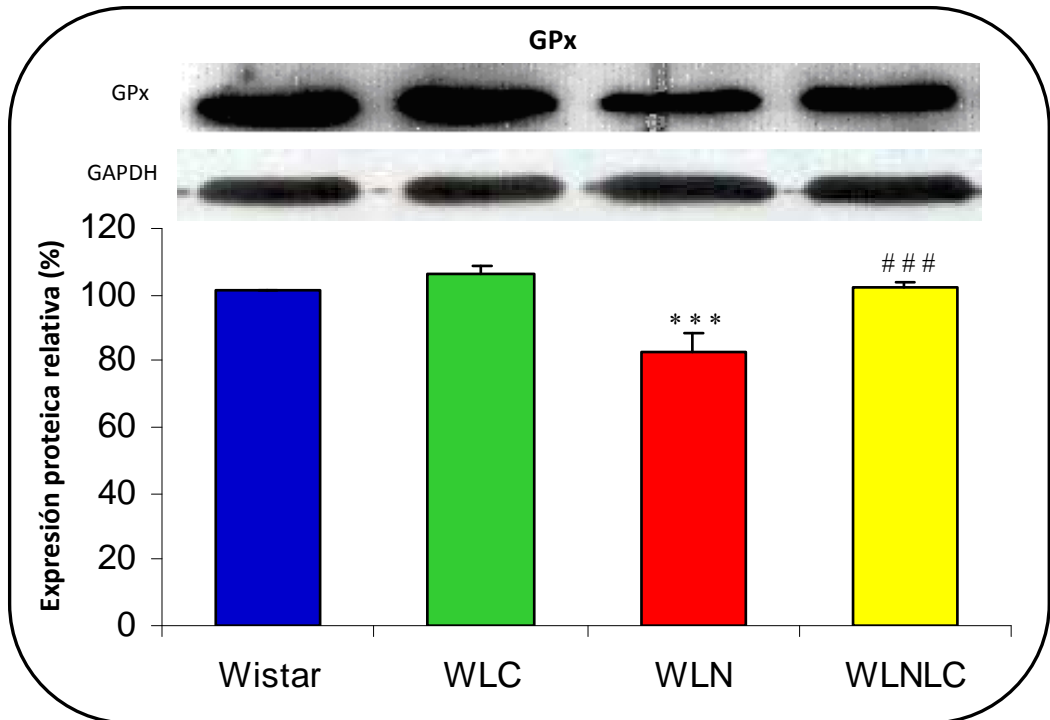


Figura 4.21. Niveles proteicos relativos de la enzima glutatión peroxidasa en homogeneizados de corazón procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y

tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 4 animales en cada grupo. Significación estadística: * * * $P < 0.001$ comparado con Wistar, y # # # $P < 0.001$ comparado con WLN.

4.3.5.2. *Western Blotting* de glutation reductasa

Los niveles relativos de la Glutation Reductasa en homogeneizados de corazón (comparada con el control) no muestra diferencias significativas entre ninguno de los cuatro grupos experimentales de trabajo (figura 4.22).

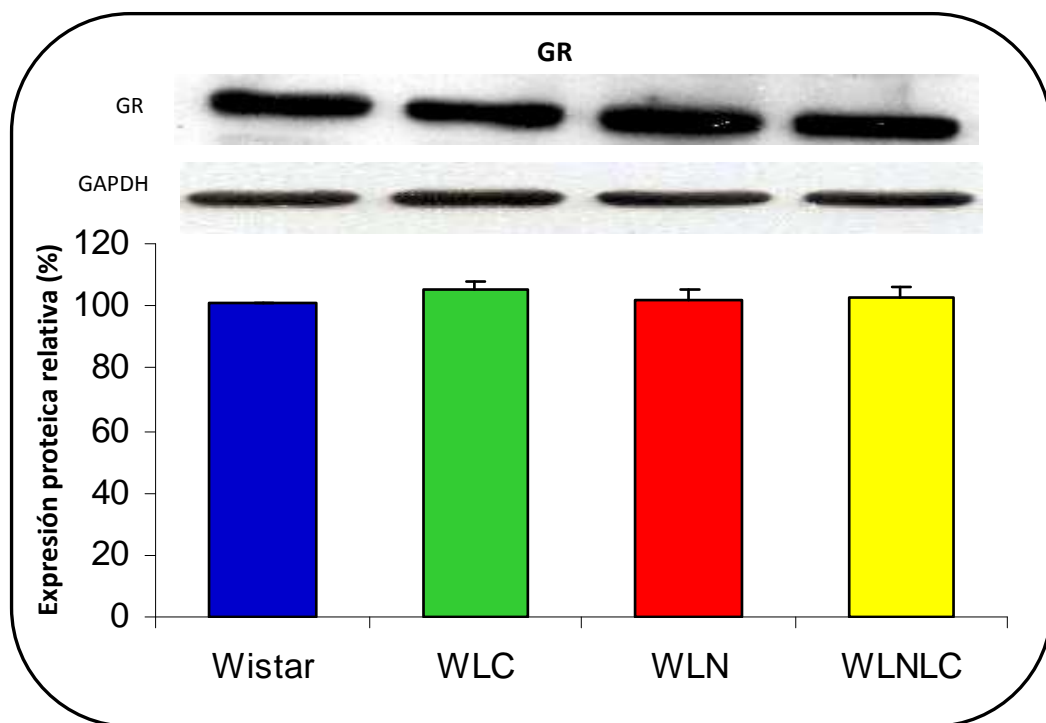


Figura 4.22. Cantidad relativa de la enzima glutation reductasa en homogeneizados de corazón procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y **tratadas con LC (WLC y WLNLC).** Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 4 animales en cada grupo.

4.3.5.3. Western Blotting de superóxido dismutasa

En la figura 4.23 se muestran los resultados del análisis de la expresión proteica relativa de la enzima superóxido dismutasa (comparada con el control) en homogeneizados de corazón procedentes de los cuatro grupos objetivo del estudio. Se observa como el grupo hipertenso control presenta niveles más bajos de esta enzima en comparación con su control normotenso; descenso que aumenta hasta alcanzar los valores normales tras la administración de LC en el grupo hipertenso (WLNL). No se producen diferencias significativas entre el grupo Wistar y el grupo WLC.

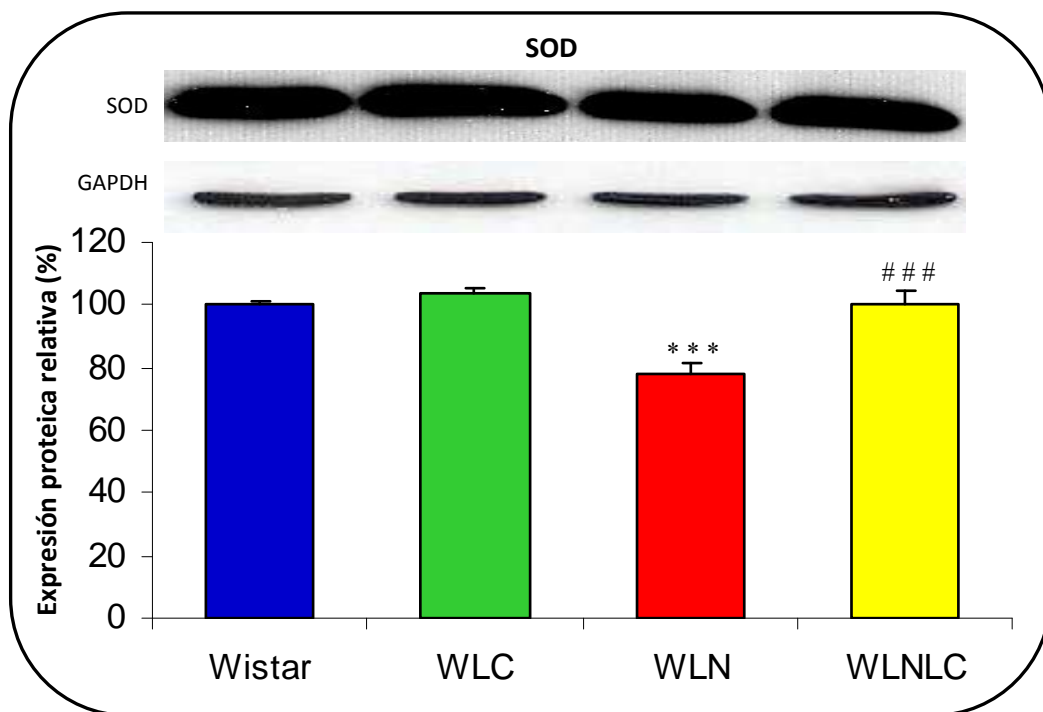


Figura 4.23. Niveles proteicos relativos de la enzima superóxido dismutasa en homogeneizados de corazón procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLN y WLNL). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 4 animales en cada grupo. Significación estadística: * * * $P < 0.001$ comparado con Wistar, y # # # $P < 0.001$ comparado con WLN.

4.3.5.4. Western Blotting de eNOS

En la figura 4.24 se muestran los resultados de la abundancia relativa de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), comparada con el control, en homogeneizados de corazón procedentes de los grupos de animales. El grupo con hipertensión inducida con L-NAME (WLN) presenta niveles disminuidos de la enzima comparados con los del grupo control normotenso. La administración de LC es capaz de revertir estos valores hasta alcanzar cifras normales.

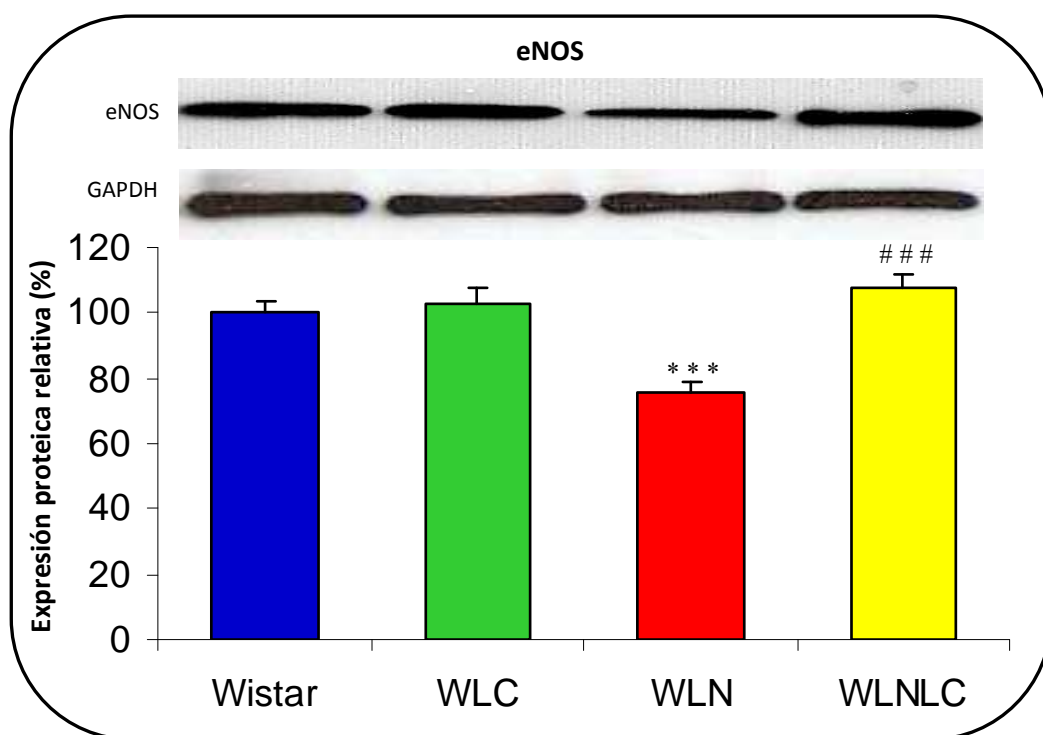


Figura 4.24. Niveles proteicos relativos de la enzima eNOS en homogeneizados de corazón procedentes de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 4 animales en cada grupo. Significación estadística: * * * $P < 0.001$ comparado con Wistar, y # # # $P < 0.001$ comparado con WLN.

4.3.6. Expresión relativa de ARNm de las enzimas antioxidantes, eNOS y p22phox en corazón

Para la obtención de los resultados de la determinación de la expresión relativa de ARN de las enzimas antioxidantes y de eNOS se ha realizado RT-PCR a tiempo real (apartado 3.10.10). Los cambios cuantitativos en la expresión de ARNm se determinan en relación a los niveles de ARNm del GAPDH (utilizado como control) en cada grupo correspondiente y calculado usando el método $2^{-\Delta Ct}$ (apartado 3.10.10.5).

4.3.6.1. RT-PCR en tiempo real de glutathion peroxidasa

Cuando se analizan los resultados obtenidos de la determinación de la expresión relativa de ARN de la GPx (figura 4.25), se observa como disminuyen significativamente en el grupo hipertenso control (WLN) con respecto a su control normotenso. Tras la administración de L-Carnitina, en el grupo con hipertensión (WLNLC) se restauran los valores normales, no observándose efectos significativos en el grupo WLC.

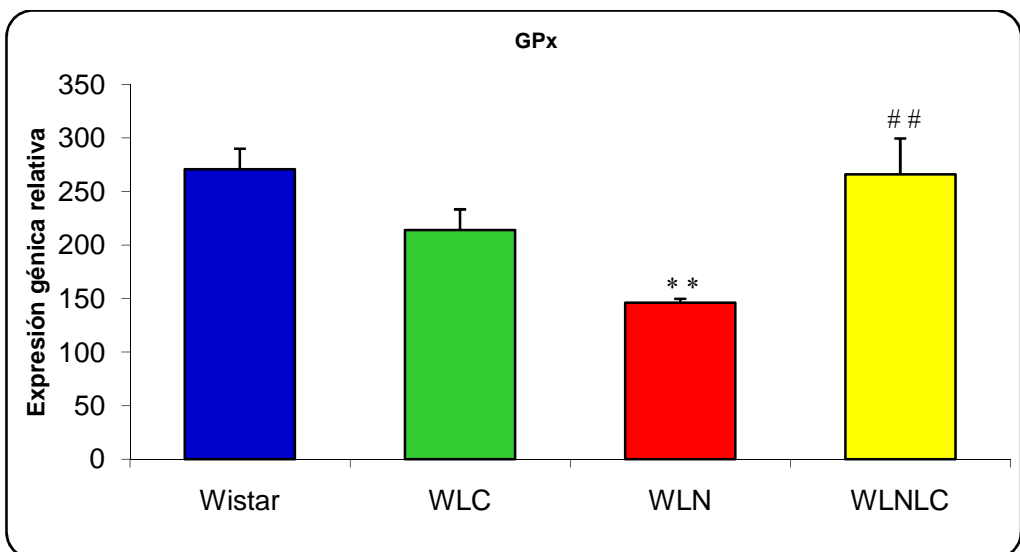


Figura 4.25. Expresión relativa de ARNm de la enzima glutacion peroxidasa en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 5 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en la expresión de ARNm son determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo correspondiente y calculado usando el método $2^{-\Delta Ct}$. Significación estadística: * * $P < 0.01$ comparado con Wistar, y # # $P < 0.01$ comparado con WLN.

4.3.6.2. RT-PCR en tiempo real de glutacion reductasa

La figura 4.26 pone de manifiesto que no existen diferencias significativas entre los cuatro grupos estudiados al determinar la expresión relativa de ARNm de la enzima antioxidante GR.

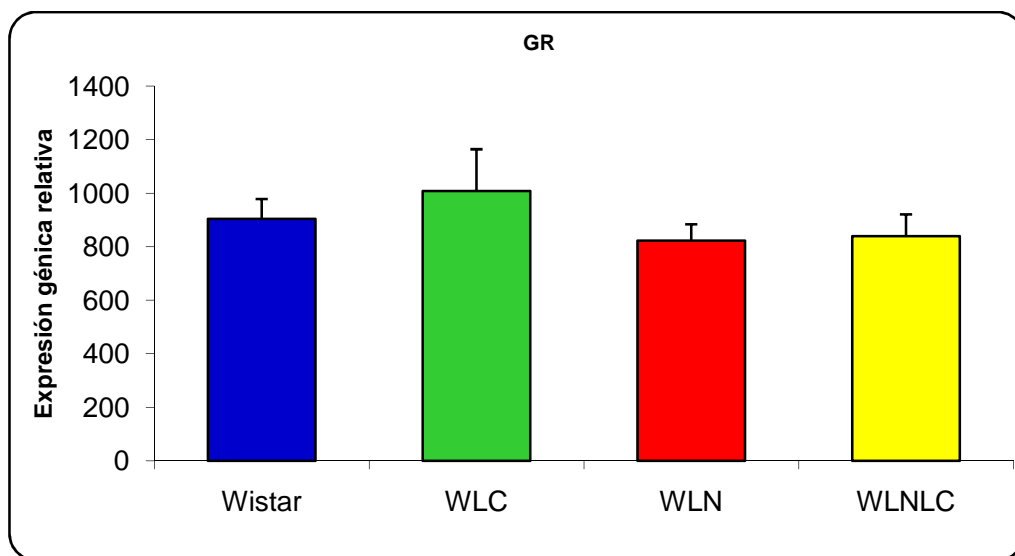


Figura 4.26. Expresión relativa de ARNm de la enzima glutacion reductasa en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 5 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en la expresión de ARNm son determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo correspondiente y calculado usando el método $2^{-\Delta Ct}$.

4.3.6.3. RT-PCR en tiempo real de superóxido dismutasa

La figura 4.27 muestra los resultados obtenidos al analizar la expresión génica relativa de ARNm de la SOD (en relación a los niveles de ARNm del GAPDH) tanto en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) como en tratadas (WLC y WLNLC).

Los niveles de ARNm de las ratas hipertensas (WLN) decrecen con respecto a las ratas normotensas controles. La administración de LC es capaz de contrarrestar este descenso hasta alcanzar la normalidad. No se aprecian efectos significativos entre los grupos Wistar y WLC.

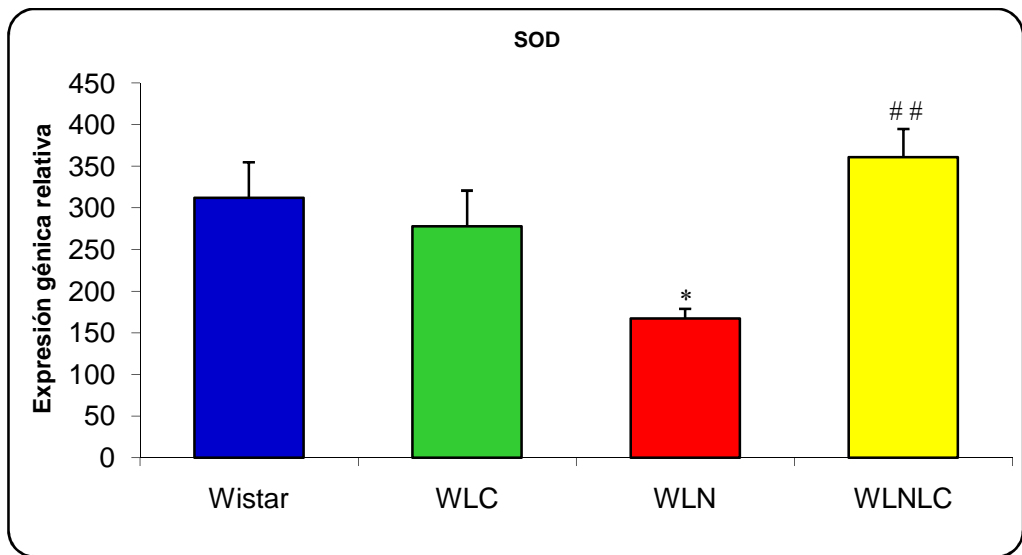


Figura 4.27. Expresión relativa de ARNm de la enzima superóxido dismutasa en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 5 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en la expresión de ARNm son determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo correspondiente y calculado usando el método $2^{-\Delta Ct}$. Significación estadística: * P < 0.05 comparado con Wistar, y # # P < 0.01 comparado con WLN.

4.3.6.4. RT-PCR en tiempo real de eNOS

En la figura 4.28 se observa como los animales con hipertensión inducida con L-NAME presentan valores significativamente menores a los presentados por el grupo Wistar. Estos valores aumentan hasta llegar a la normalidad tras el tratamiento con LC (WLNL). No se aprecian efectos significativos en el grupo WLC tras la ingesta del fármaco.

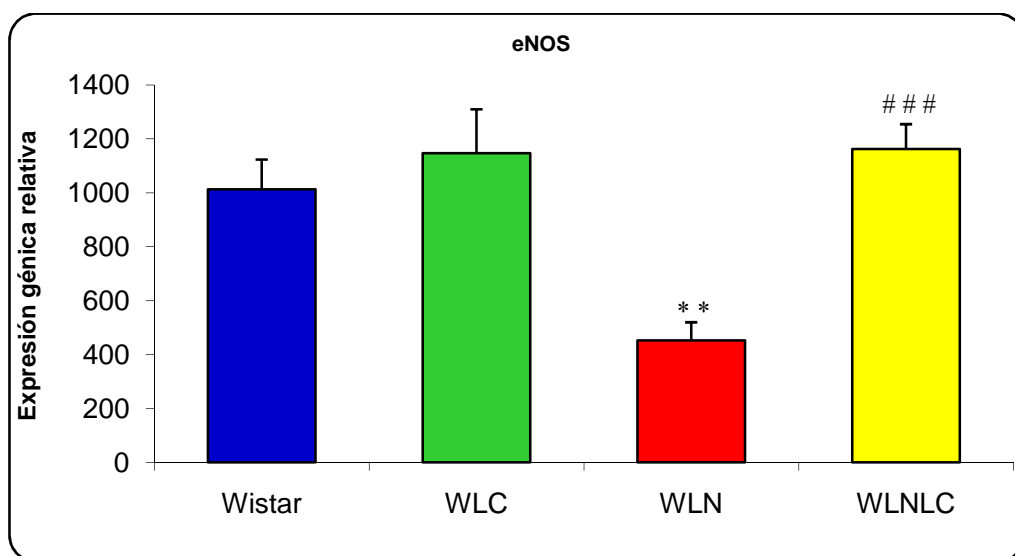


Figura 4.28. Expresión relativa de ARNm de la enzima eNOS en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNL). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 5 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en la expresión de ARNm son determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo correspondiente y calculado usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Significación estadística: * * $P < 0.01$ comparado con Wistar, y # # # $P < 0.001$ comparado con WLN.

4.3.6.5. RT-PCR en tiempo real de p22phox

Una vez analizados los resultados obtenidos de la determinación de la expresión génica de p22phox (subunidad de la enzima NADPH oxidasa), se aprecia un aumento significativo de estos niveles en el grupo con hipertensión inducida por L-NAME (figura 4.29), produciéndose un descenso tras la administración de LC en el grupo WLNLC. No se observan diferencias significativas entre los grupos Wistar y WLC.

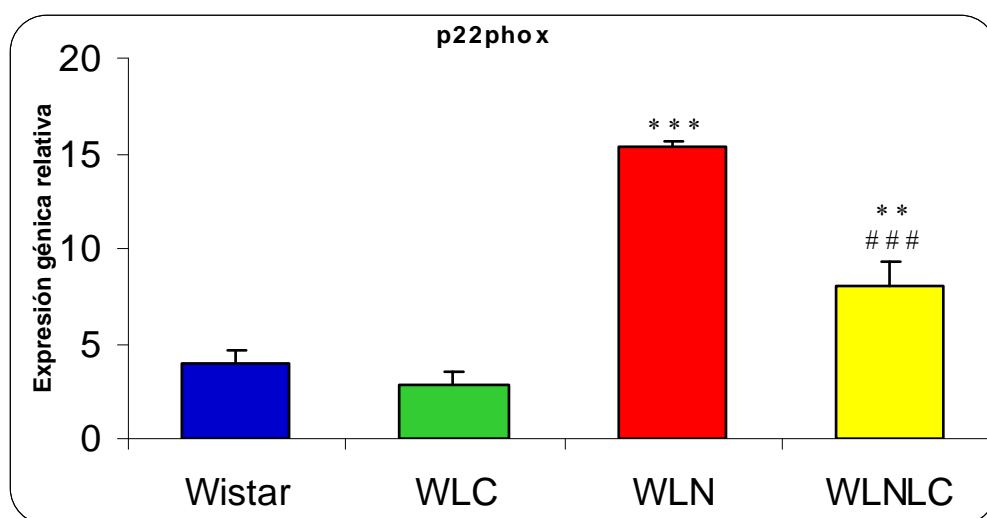


Figura 4.29. Expresión relativa de ARNm de la subunidad p22phox en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 5 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en la expresión de ARNm son determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo correspondiente y calculado usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Significación estadística: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ comparado con Wistar, y ### $P < 0.001$ comparado con WLN.

4.4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LA L-CARNITINA

Para el estudio de la capacidad antiinflamatoria de la LC se ha evaluado la actividad plasmática y la expresión relativa de ARNm en el corazón de tres marcadores inflamatorios: IL-1 β , IL-6, TNF- α . Se trata de citocinas proinflamatorias cuyos niveles son representativos para determinar el estado inflamatorio.

4.4.1. Actividad plasmática de los marcadores inflamatorios

4.4.1.1. Niveles plasmáticos de IL-1 β

En la figura 4.30 se muestran los resultados obtenidos al determinar los niveles plasmáticos de la citocina proinflamatoria IL-1 β en los cuatro grupos experimentales de animales. Se observa como estos valores aumentan significativamente en las ratas con hipertensión (WLN), disminuyendo tras la administración de LC hasta alcanzar valores similares a los del grupo control normotenso.

4.4.1.2. Niveles plasmáticos IL-6

Los resultados obtenidos al analizar los niveles plasmáticos de IL-6 en los cuatro grupos de trabajo se muestran en la figura 4.31. En el grupo con hipertensión inducida por L-NAME los valores de IL-6 en plasma aumentan significativamente con respecto al grupo Wistar. El tratamiento con LC disminuye estos valores incluso por debajo de los presentados por las ratas controles normotensas, pero sin ejercer acción significativa en el grupo WLC.

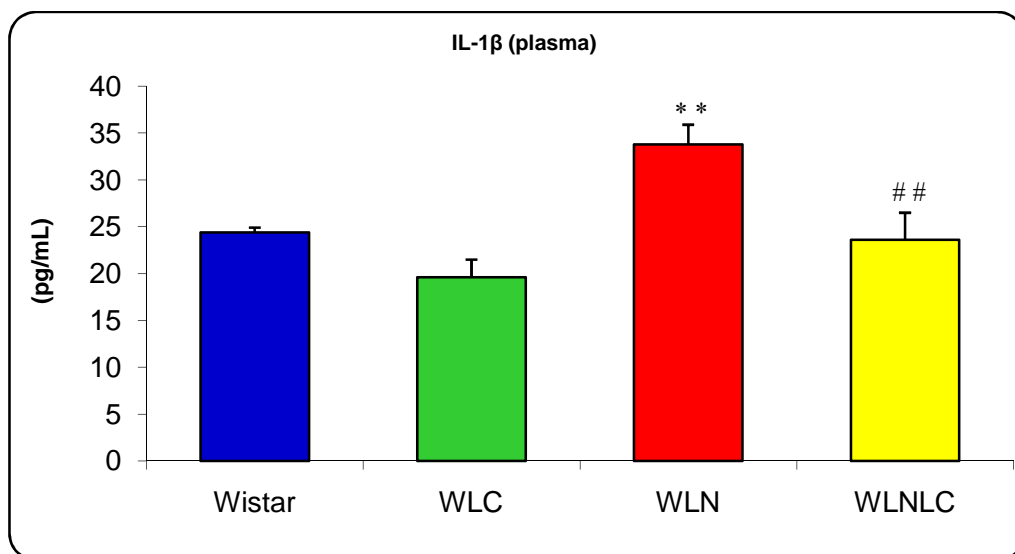


Figura 4.30. Estudio de los niveles plasmáticos de IL-1 β en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados están expresados en picogramos por mililitro y representan la media \pm error estándar de al menos 5 animales en cada grupo. Significación estadística: * * P < 0.01 comparado con Wistar, y # # P < 0.01 comparado con WLN.

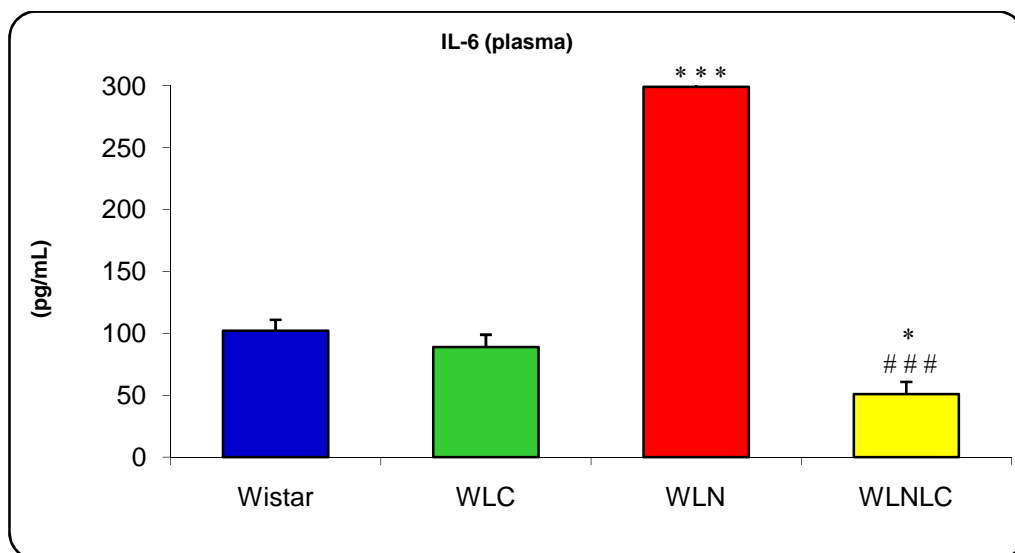


Figura 4.31. Estudio de los niveles plasmáticos de IL-6 en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados están

expresados en picogramos por mililitro y representan la media \pm error estándar de al menos 5 animales en cada grupo. Significación estadística: * $P < 0.05$ y * * * $P < 0.001$ comparado con Wistar, y # # # $P < 0.001$ comparado con WLN.

4.4.1.3. Niveles plasmáticos TNF- α

La determinación de los niveles plasmáticos de TNF- α (figura 4.32) indica que las ratas hipertensas tienden a aumentar su actividad, aunque no llega a ser significativa. Por el contrario, la administración de LC en el grupo hipertenso disminuye significativamente los niveles plasmáticos de esta citoquina proinflamatoria con respecto al grupo WLN.

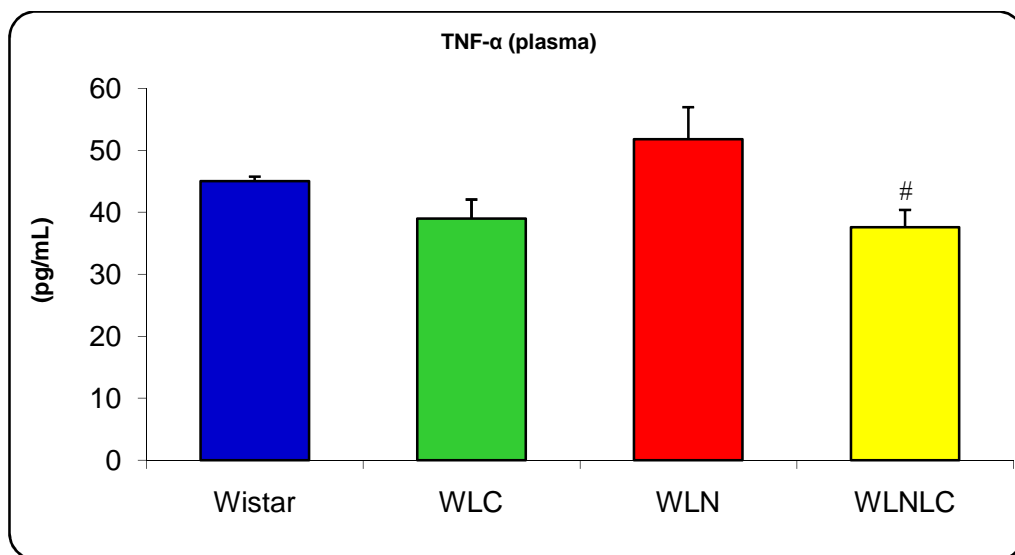


Figura 4.32. Estudio de los niveles plasmáticos de TNF- α en ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados están expresados en picogramos por mililitro y representan la media \pm error estándar de al menos 5 animales en cada grupo. Significación estadística: # $P < 0.05$ comparado con WLN.

4.4.2. Expresión relativa de ARNm de los marcadores inflamatorios, NF- κ B e I κ B en corazón

4.4.2.1. Expresión relativa de ARNm de IL-1 β

La expresión génica relativa del ARNm de corazón de la IL-1 β (en relación al ARNm control del GAPDH) es significativamente mayor en ratas hipertensas controles que en el grupo Wistar. La administración de LC en el grupo WLNLNLC hace descender estos valores, aunque no llega a normalizarlos (figura 4.33).

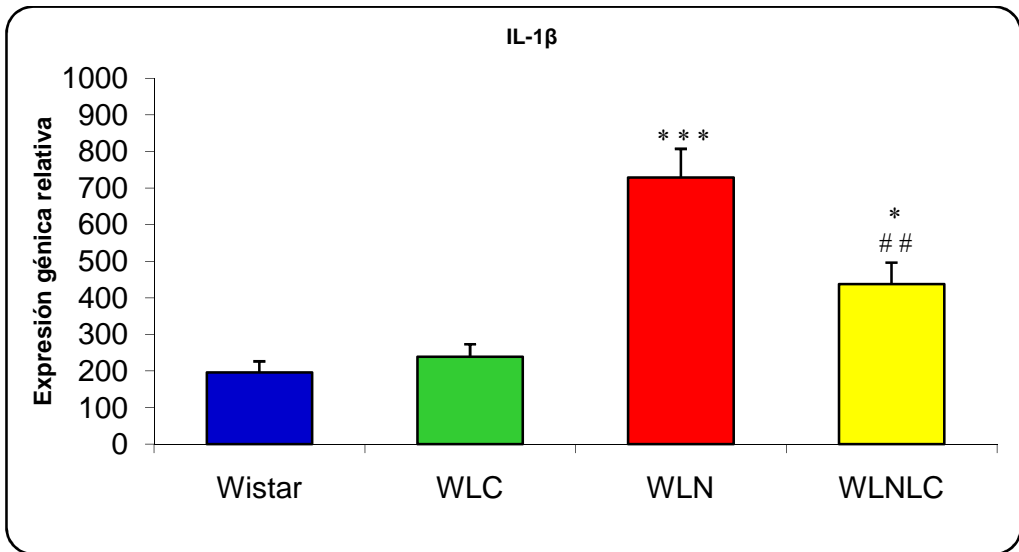


Figura 4.33. Expresión relativa de ARNm de la citocina IL-1 β en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLNLC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 5 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en la expresión de ARNm son determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo correspondiente y calculado usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Significación estadística: * $P < 0.05$ y *** $P < 0.001$ comparado con Wistar, y ## $P < 0.01$ comparado con WLN.

4.4.2.2. Expresión relativa de ARNm de IL-6

En la figura 4.34 se muestran los resultados obtenidos de la determinación de la expresión relativa de ARNm cardíaco de la citocina proinflamatoria de IL-6 (en relación a la expresión de ARNm del GAPDH) en los cuatro grupos experimentales de animales. Esta expresión relativa es significativamente superior en el grupo WLN. La administración de L-Carnitina tiene el efecto de disminuir estos valores en el grupo hipertenso tratado (WLNLC). No existen diferencias significativas entre los dos grupos normotensos (Wistar y WLC).

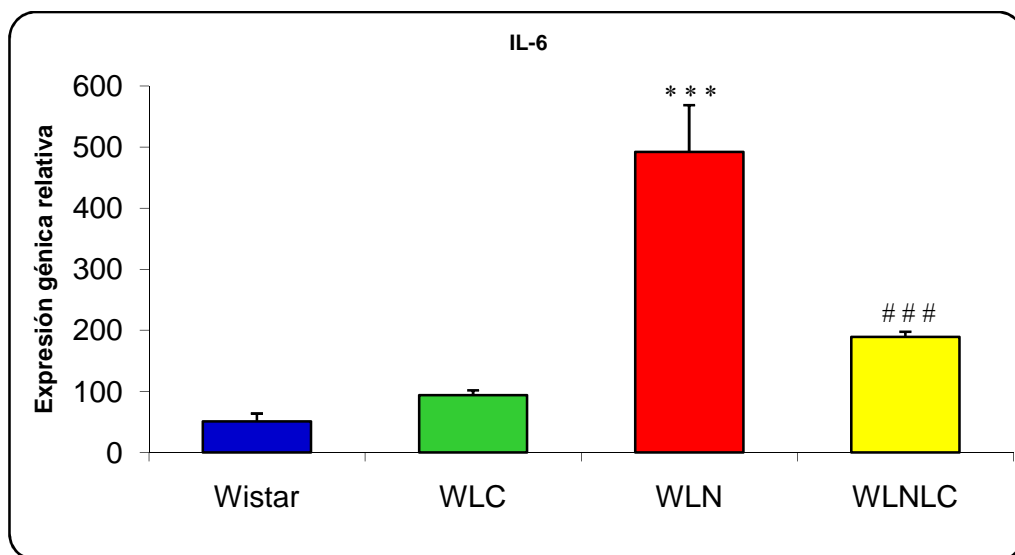


Figura 4.34. Expresión relativa de ARNm de la citocina IL-6 en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 5 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en la expresión de ARNm son determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo correspondiente y calculado usando el método $2^{-\Delta Ct}$. Significación estadística: *** $P < 0.001$ comparado con Wistar, y ### $P < 0.001$ comparado con WLN.

4.4.2.3. Expresión relativa de ARNm de TNF- α

La figura 4.35 muestra los datos obtenidos del estudio de la expresión relativa de ARNm de corazón de TNF- α en ratas controles (Wistar), tratadas con LC (WLC), con hipertensión inducida por la administración de L-NAME (WLN) y ratas hipertensas tratadas con LC (WLNLC). Los resultados ponen de manifiesto que el grupo WLN presenta valores significativamente más elevados que el grupo Wistar control. La administración de LC a las ratas hipertensas reduce estos valores, aunque no llega a alcanzar los observados en las ratas controles normotensas. No se observaron modificaciones entre las ratas controles y aquellas mismas tratadas con LC.

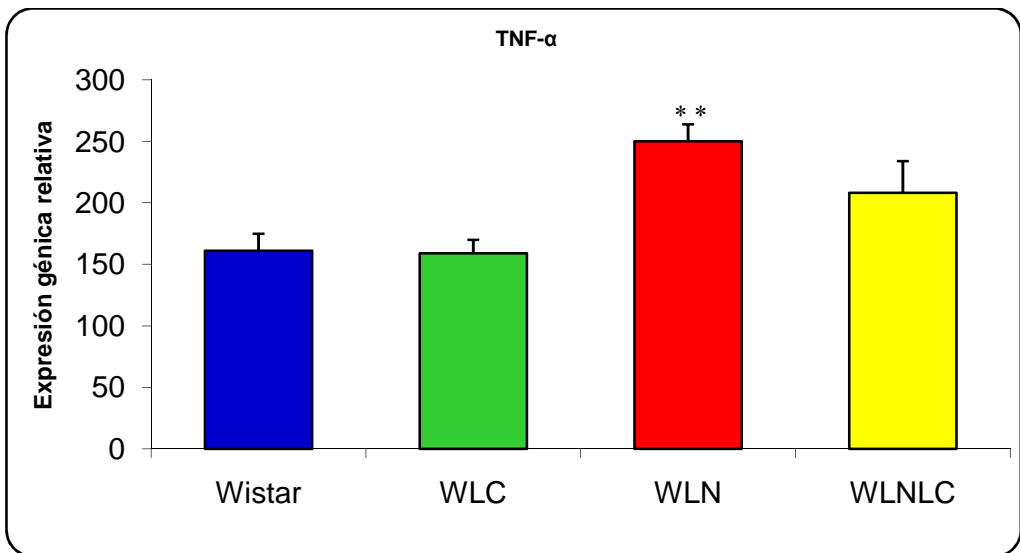


Figura 4.35. Expresión relativa de ARNm de la citocina proinflamatoria TNF- α en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 5 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en la expresión de ARNm son determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo correspondiente y calculado usando el método $2^{-\Delta Ct}$. Significación estadística: ** $P < 0.01$ comparado con Wistar.

4.4.2.4. Expresión relativa de ARNm de NF-κB

Cuando analizamos los resultados obtenidos del estudio de la expresión génica del NF-κB se puede observar como el grupo WLN presenta unos valores significativamente mayores a los presentados por el grupo control. Cifras que se normalizan tras la administración de LC en el grupo hipertenso. No se observan diferencias significativas cuando analizamos los valores presentados por los grupos Wistar y WLC (figura 4.36).

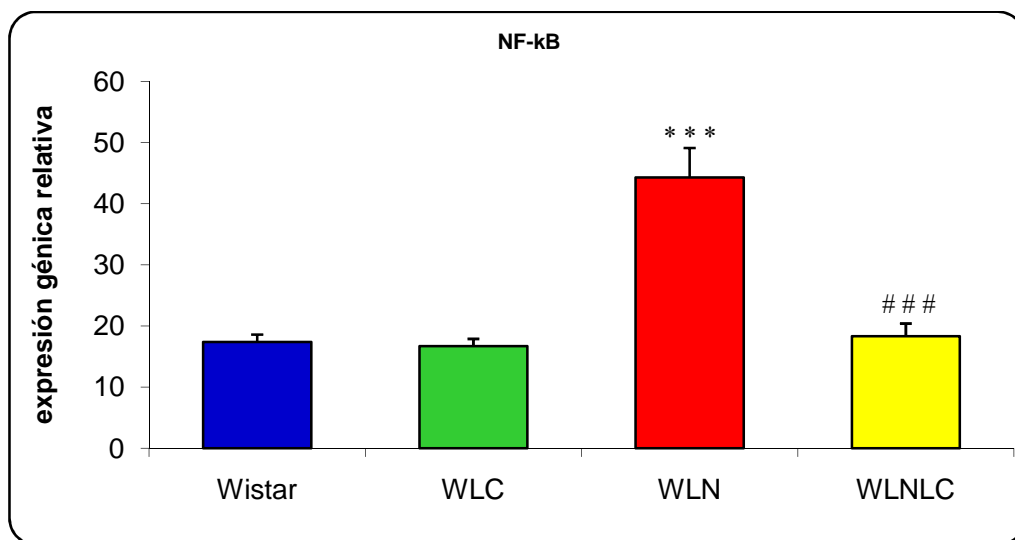


Figura 4.36. Expresión relativa de ARNm de NF-κB en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 5 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en la expresión de ARNm son determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo correspondiente y calculado usando el método $2^{-\Delta Ct}$. Significación estadística: *** $P < 0.001$ comparado con Wistar y ### $P < 0.001$ comparado con WLN.

4.4.2.5. Expresión relativa de ARNm de IκB

La expresión génica de IκB en el grupo con hipertensión inducida por L-NAME (WLN) está disminuida significativamente con respecto al grupo control

(figura 4.37). La administración de LC en el grupo hipertenso (WLNLC) provoca un aumento significativo en estos valores, alcanzando cifras más elevadas que las presentadas por el grupo Wistar. No existen diferencias significativas entre el grupo Wistar y el grupo normotenso tratado con LC (WLC).

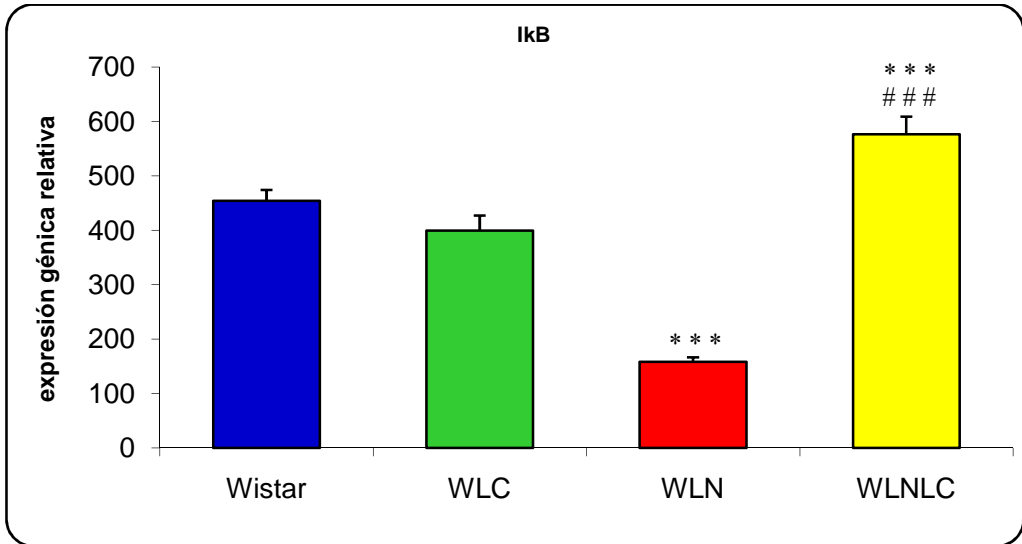


Figura 4.37. Expresión relativa de ARNm de IκB en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados representan la media ± error estándar de al menos 5 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en la expresión de ARNm son determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo correspondiente y calculado usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Significación estadística: *** $P < 0.001$ comparado con Wistar y ### $P < 0.001$ comparado con WLN.

4.5. VALORACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

Con el objetivo de ahondar en los mecanismos de acción de la L-Carnitina se ha realizado un estudio del sistema renina-angiotensina. Para ello se ha determinado la expresión génica de ARNm en corazón de ACE y AT-1 (receptor tipo 1 de la angiotensina).

4.5.1. Expresión relativa de ARNm de ACE en corazón

En la figura 4.38 se representan los resultados correspondientes al estudio de la expresión génica relativa de ARNm de corazón de la enzima convertidora de angiotensina en los cuatro grupos de animales. La expresión de esta enzima se encuentra significativamente elevada en el grupo hipertenso control en relación al grupo Wistar. En el grupo WLNL se observa una disminución significativa tras la administración de la L-Carnitina. No se observan diferencias entre grupo WLC y Wistar.

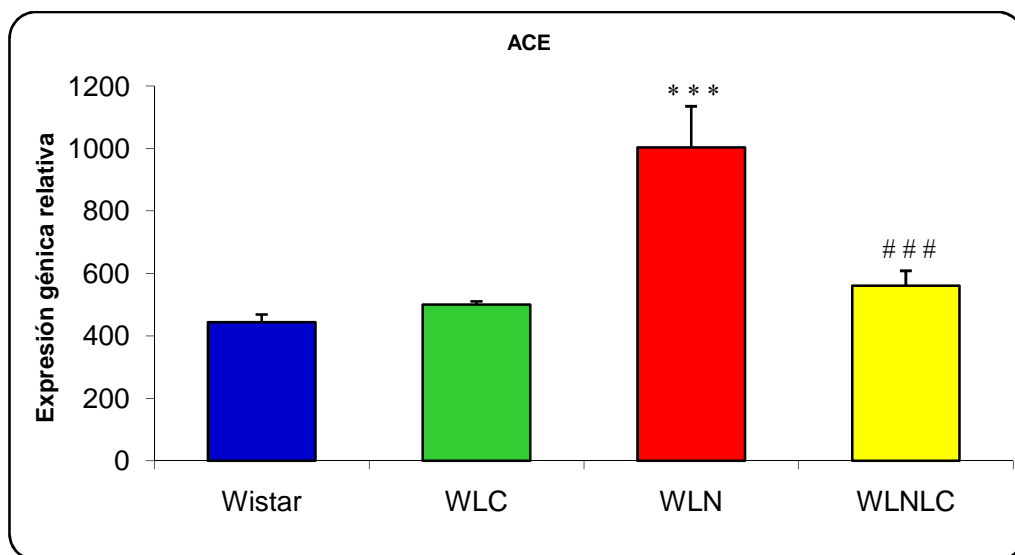


Figura 4.38. Expresión relativa de ARNm de ACE en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNL). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 5 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en la expresión de ARNm son determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo correspondiente y calculado usando el método $2^{-\Delta Ct}$. Significación estadística: *** $P < 0.001$ comparado con Wistar, y ### $P < 0.01$ comparado con WLN.

4.5.2. Expresión relativa de ARN m de AT-1 en corazón

El grupo hipertenso (WLN) presenta valores significativamente superiores en la expresión génica relativa de ARNm de corazón del AT-1 que los presentados por el grupo normotenso control. Tras la administración de L-Carnitina estos niveles disminuyen significativamente hasta llegar a normalizarse en el grupo WLNLC (figura 4.39).

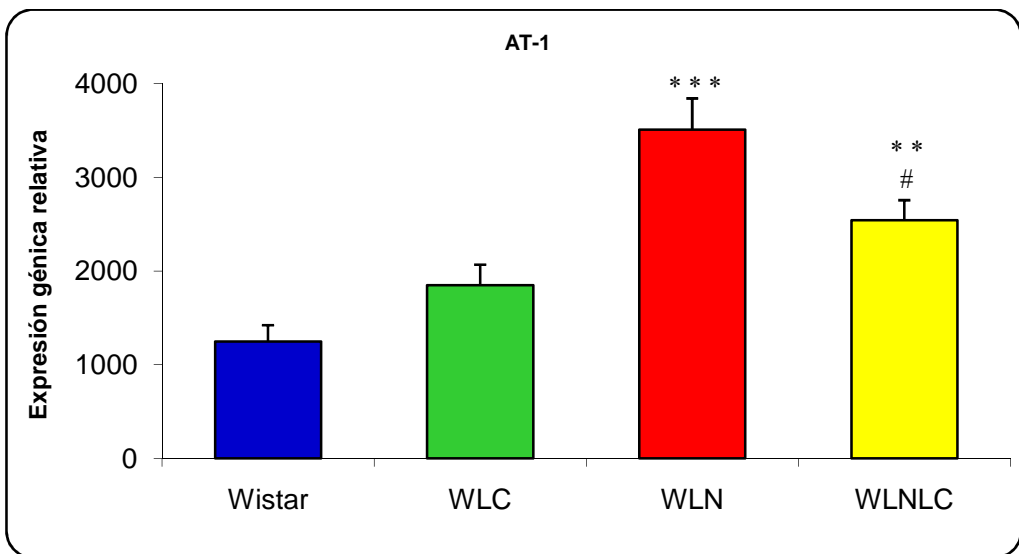


Figura 4.39. Expresión relativa de ARNm de AT-1 en corazón de ratas normotensas e hipertensas controles (Wistar y WLN) y tratadas con LC (WLC y WLNLC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 5 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en la expresión de ARNm son determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo correspondiente y calculado usando el método $2^{-\Delta Ct}$. Significación estadística: * *P < 0.01 y * * * P < 0.001 comparado con Wistar, y # P < 0.05 comparado con WLN.

5. DISCUSIÓN

La HTA es un importante problema de salud en la población ya que repercute en varios órganos diana, entre los que se encuentra el corazón, generándole hipertrofia ventricular izquierda, insuficiencia cardíaca y cardiopatía isquémica. Este efecto orgánico asociado a la HTA complica el pronóstico de la misma, relacionándose su tratamiento a la cuantificación del riesgo cardiovascular. Todo ello hace que sea necesario buscar nuevas terapias que, no sólo actúen como sustancias antihipertensivas, sino que además, posean una acción protectora frente al daño cardíaco asociado, llegando a evitar su desarrollo e incluso a revertirlo (Grassi y col., 2008).

El daño cardíaco ocasionado por la HTA está generado por mecanismos entre los que se incluyen el estrés oxidativo y procesos inflamatorios, que conducen a cambios estructurales y funcionales en las células cardíacas. La relación entre estos dos mecanismos y la presión sanguínea elevada, está muy bien definida y documentada en multitud de trabajos usando animales o pacientes hipertensos (Cleland y col., 2000; Rodríguez-Iturbe y col., 2004; Vaziri y col., 2007); por ello, se han propuesto terapias antioxidantes y/o antiinflamatorias en el tratamiento de la HTA, no solo con el objetivo de disminuir los valores de presión arterial, sino como protección de los órganos dianas (Muller y col., 2000; Rodríguez-Iturbe y col., 2003; Kataoka y col., 2004; Bravo y col., 2007).

Numerosos experimentos usando inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECA), o bloqueadores del receptor de tipo I para la angiotensina II (AT1R) o del receptor de la aldosterona, han confirmado que el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) parece ser, en gran parte, responsable de los mecanismos que subyacen en el daño cardíaco asociado (Pollock y col., 1993; Takemoto y col., 1997; Viridis y col., 2002; Cediél y col., 2003).

El uso de la L-carnitina (LC) en las enfermedades cardiovasculares está clínicamente aceptado. Su beneficio se ha demostrado en pacientes con diagnóstico de angina estable (Schofield y Hill, 2001; Pauly y Pepine, 2004; Parang y col., 2005); en la mejora de los parámetros hemodinámicos asociados a la insuficiencia cardiaca (Loster y col., 1999), en la tasa de supervivencia en individuos hospitalizados por choque cardiogénico (Pipinos y col., 2007), así como en la disminución de los ataques de angina de pecho (Ferrari y col., 2004; Tarantini y col., 2006; Xue y col., 2007). La capacidad antioxidante de la LC, así como su efecto antiinflamatorio, se ha demostrado en situaciones tanto fisiológicas como patológicas caracterizadas por un aumento en el estado oxidativo o en la respuesta inflamatoria (Kalaiselvi y Panneerselvam, 1998; Dayanandan y col., 2001; Sayed-Ahmed y col., 2001; Moretti y col., 2002; Pertosa y col., 2005; Gómez-Amores y col., 2007; Miguel-Carrasco y col., 2008).

Por consiguiente, teniendo en cuenta por un lado la importancia de orientar el objetivo terapéutico no sólo hacia la disminución de las cifras de la presión sanguínea, sino también hacia la protección del corazón frente al daño cardiaco ocasionado por la HTA y por otro, que la LC está indicada en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares actuando con capacidad antioxidante y antiinflamatoria, este estudio se centra en analizar si la LC es capaz de proteger al tejido cardiaco en la HTA.

Los resultados de esta tesis indican que el tratamiento crónico con LC disminuye significativamente los valores de presión sanguínea sistólica y diastólica, y protege, a la sangre y al corazón del estrés oxidativo producido por la administración crónica de L-NAME. Además, observamos que la administración crónica de LC es capaz de mejorar el proceso inflamatorio sistémico que tiene lugar durante la hipertensión arterial, así como modular la expresión cardiaca de

las moléculas inflamatorias implicadas en este proceso (Takemoto y col., 1997; Sanz-Rosa y col., 2005).

5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANIMALES

Para conocer en profundidad los mecanismos implicados en la fisiopatología de la HTA, es útil el empleo de modelos de animales experimentales de hipertensión. El tipo de animal utilizado es la rata de la cepa Wistar. Para la realización de nuestro estudio, se ha utilizado un modelo animal al que se le ha inducido la hipertensión arterial mediante la administración crónica de N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), compuesto que produce una inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) y, por consiguiente, una disminución en los niveles de NO. Este modelo experimental se caracteriza por sufrir cambios estructurales y funcionales en los vasos sanguíneos y en el corazón, debidos a mecanismos oxidativos e inflamatorios, y todo ello mediado por la activación el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Takemoto y col., 1997; Luvará y col., 1998; Kitamoto y col., 2000).

En nuestro estudio, no observamos diferencias significativas en el peso de los animales entre los cuatro grupos experimentales de ratas (figura 4.1) , aunque cabe destacar que existe una ligera tendencia a la pérdida de peso en los grupos tratados con L-NAME (WLN y WLNLC), como previamente fue puesto de manifiesto por otros autores (Duarte y col., 2002). El tratamiento con LC no modifica el peso corporal de los animales, lo que coincide con las observaciones de estudios anteriores realizados en el laboratorio utilizando ratas SHR, otro modelo experimental de hipertensión (Rauchová y col., 1998; Brandsch y Eder, 2002; Gómez-Amores y col., 2003; Gómez-Amores y col., 2007) y en ratas con

hipertensión inducida por dietas ricas en fructosa (Rajasekar y col., 2007). En cuanto al peso relativo del corazón y de acuerdo con resultados previos (Takemoto y col., 1997), observamos un aumento significativo en las ratas con hipertensión inducida por L-NAME con respecto a las ratas controles, relación que no se revierte cuando estas ratas hipertensas son tratadas con LC (figura 4.2). Por tanto, en nuestro estudio, la hipertrofia que aparece en el corazón de las ratas hipertensas no se previene con LC. Similares resultados fueron obtenidos por Rauchová y col. (1998). Sin embargo, Rajasekar y col (2007) observaron en ratas con inducción de la HTA mediante la administración de una dieta rica en fructosa, una disminución en esta relación tras el tratamiento con LC.

Como era de esperar y ha sido demostrado en varios trabajos, el tratamiento crónico con L-NAME conduce a un aumento de la presión arterial sistólica y diastólica (Luvara y col., 1998). Este estudio muestra, claramente, que el tratamiento crónico con LC disminuye, de forma significativa, los valores de la presión arterial sistólica y diastólica, disminución que se observa a partir de la 5ª semana de tratamiento, y que al final del periodo experimental llega a alcanzar una reducción de 23 y 25 mm de Hg respectivamente; valores que corresponden al 43 y 46% de reducción respectivamente, con respecto al incremento sufrido por las ratas con hipertensión arterial inducida (figuras 4.3, 4.4, 4.5, 4.6). Estos resultados indican que la LC previene parcialmente el incremento de presión arterial inducido por la administración de L-NAME. Una pequeña reducción en la presión arterial media y sistólica ha sido observada previamente por Rauchová y col (1998) en ratas SHR tratadas con LC (a dosis de 200 mg por kilogramo de peso y día durante 6 semanas), aunque no observaron cambios en la presión diastólica. Más recientemente, una bajada de presión arterial sistólica, por la administración de LC, se ha demostrado en las ratas hipertensas con dieta rica en fructosa (Rajasekar y col., 2007).

5.2. PERFIL LIPÍDICO

El estudio del perfil lipídico en los cuatro grupos experimentales de animales muestra un efecto hipocolesterolémico e hipotrigliceridemiante de la LC en animales con hipertensión inducida por la administración crónica de L-NAME (figuras 4.7 y 4.8). Estos efectos hipolipemiantes de la LC han sido anteriormente descritos en SHR (Rauchova y col., 1998; Gómez-Amores y col., 2006), en pacientes con hemodiálisis (Vesela y col., 2001; Pertosa y col., 2005), en ratones hipocolesterolémicos (Sayed-Ahmed y col., 2001) y en ratas diabéticas (Irat y col., 2003), y pueden justificar, en parte, el uso beneficioso de este componente en las enfermedades cardiovasculares.

5.3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA L-CARNITINA EN EL TEJIDO CARDIACO Y A NIVEL SISTÉMICO

Con el objetivo de analizar la acción cardioprotectora de la LC en la HTA, nos propusimos el estudio de su acción antioxidante, mediante la determinación de algunos de los parámetros implicados en el estrés oxidativo (tanto del órgano en cuestión como a nivel sistémico).

Se ha observado una disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes GPx, GR y SOD en eritrocitos procedentes de animales tratados con L-NAME (figuras 4.13, 4.14 y 4.15). Los trabajos que muestran las actividades de las enzimas antioxidantes en glóbulos rojos en la patología de la hipertensión arterial son confusos. De tal forma que se muestran en ellos disminución, incremento o actividad no alterada en ratas SHR comparadas con su control WKY (Yuan y col., 1998). Como las enzimas antioxidantes GPx y SOD son responsables de eliminar el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el anión superóxido

($O_2^{\cdot-}$) respectivamente, la disminución en las actividades de estas enzimas sugieren, como previamente se ha demostrado (Kitamoto y col., 2000), un incremento en la producción sistémica de especies reactivas del oxígeno (ROS) en las ratas con hipertensión inducida por administración crónica de L-NAME. La reducción en la relación GSH/GSSG en sangre heparinizada (figura 4.16) y en la capacidad antioxidante total en plasma (ORAC-FL) (figura 4.9) corroboran estas observaciones. Por otro lado, de acuerdo con otros investigadores, (Duarte y col., 2002; Llorens y col., 2005) y según cabía esperar, una disminución de los niveles plasmáticos de NO se ha observado en las ratas tratadas con L-NAME con respecto a las ratas controles (figura 4.11), lo que nos indica una menor biodisponibilidad de NO en estas ratas.

Junto con estos cambios observados en el estado oxidativo sistémico de los animales tratados con L-NAME, el estudio del ventrículo izquierdo de estos animales nos muestra una menor actividad de las enzimas GPx y SOD junto a un aumento significativo en la actividad enzimática de la GR (figuras 4.17, 4.18 y 4.19). Estos resultados coinciden con estudios previos realizados en SHR en hígado (Yuan y col., 1998; Cediél y col., 2003; Gómez-Amores y col., 2006; Gómez-Amores y col., 2007) y corazón (Gómez-Amores y col., 2006; Gómez-Amores y col., 2007). Sin embargo, Sainz y col. (2005) no encontraron cambios en las actividades cardíacas de GPx y GR en ratas con hipertensión inducida por la administración de L-NAME durante 6 semanas. Como muestra la figura 5.1, la enzima antioxidante GPx es la encargada de catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con la ayuda del glutatión reducido (GSH). De tal forma que la menor actividad de GPx observada en los animales hipertensos puede ser debida a la disminución en la concentración de GSH y la relación GSH/GSSG, como respuesta del organismo frente a una mayor actividad de GR, que previamente ha sido demostrada en hígado (Yuan y col., 1998; Cediél y col., 2003; Gómez-

Amores y col., 2006; Gómez-Amores y col., 2007) y corazón (Janero y Burghardt, 1998; Gómez-Amores y col., 2007) de ratas SHR. Sin embargo, cuando la relación GSH/GSSG fue medida, no encontramos diferencias significativas en los niveles cardiacos entre las ratas normotensas y las ratas tratadas con L-NAME, aunque existía en estas ratas una tendencia a un aumento en esta relación (figura 4.20). Como consecuencia de las variaciones observadas en la actividad de las enzimas antioxidantes, un aumento en la expresión génica de la subunidad p22phox, correspondiente a la enzima NADPH oxidasa (figura 4.29), y en los niveles de TBARS (utilizado como marcador del estrés oxidativo) (figura 4.10) se observa en el ventrículo izquierdo de los animales hipertensos, indicándonos, como previamente demostraron Gómez-Amores y col. (2007), un incremento en el estado oxidativo cardiaco en estas ratas. Habría que indicar que el aumento observado en la expresión génica de la enzima NADPH oxidasa no implica un aumento de su actividad, ya que la enzima podría estar inactivada, pero el resto de los resultados obtenidos apuntan a un aumento en el estrés oxidativo y en la producción de la principal especie el anión superóxido en ratas con hipertensión arterial inducida por la administración de L-NAME.

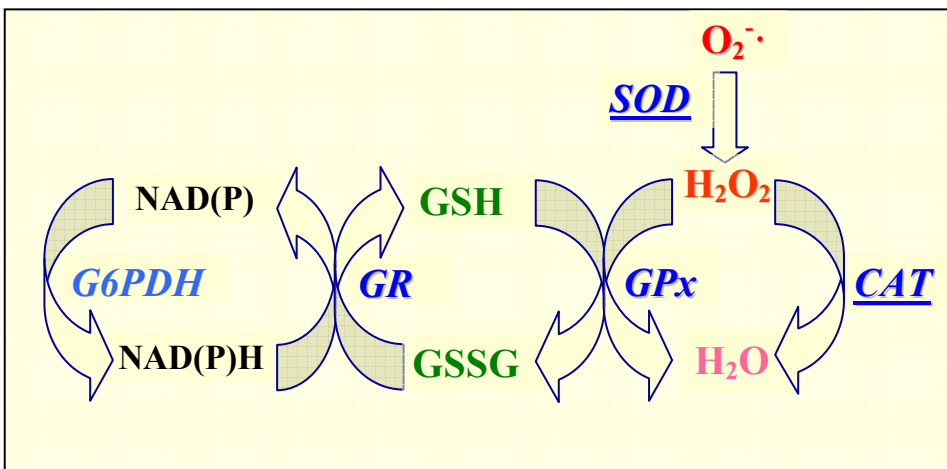


Figura 5.1. Mecanismos enzimáticos antioxidantes. GPx: glutatión peroxidasa; SOD: superóxido dismutasa; GR: glutatión reductasa; CAT: catalasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; NAD(P): nicotinamina adenina dinucleótido fosfato; NAD(P)H: nicotinamina adenina dinucleótido fosfato reducido; G6PDH: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

Cuando los niveles de NO fueron analizados en el corazón de los animales tratados con L-NAME (figura 4.12), una reducción fue encontrada, que podría deberse a la disminución observada en la expresión proteica y génica de la enzima eNOS (figuras 4.24 y 4.28). Pero por otro lado, hay que tener en cuenta, que un aumento en la producción de ROS podría provocar un desacoplamiento de la enzima eNOS, de forma que dicha enzima modificaría su síntesis de NO por la generación de más radical superóxido, que al reaccionar con NO produce una menor disponibilidad del mismo (Droge, 2002; Touyz, 2005). Simko y col. (2007) también observaron una disminución, en el ventrículo izquierdo, de la actividad de eNOS en un modelo de hipertensión inducida por L-NAME; hecho que nosotros no podemos excluir ya que no hemos realizado medidas a este nivel.

Después de la administración crónica de LC durante 12 semanas, las actividades de las enzimas antioxidantes GPx, GR y SOD en los eritrocitos procedentes del grupo tratado con L-NAME incrementan de forma significativa hasta alcanzar valores similares a los presentados por el grupo Wistar control (figura 4.13, 4.14 y 4.15). También se observa un aumento significativo en la relación GSH/GSSG en sangre total (figura 4.16), en la capacidad antioxidante total en plasma (figura 4.9) y en los niveles plasmáticos de NO (figura 4.11), sugiriendo un efecto beneficioso de la L-carnitina sobre el estrés oxidativo sistémico y la biodisponibilidad del NO.

En cuanto a los efectos de la LC sobre el estado oxidativo cardiaco, la LC ha sido capaz de revertir los cambios encontrados en las ratas hipertensas. De

forma que observamos un aumento en la actividad de la GPx y SOD y en la cantidad de NO (figuras 4.17, 4.19 y 4.12), así como una reducción de los valores de la actividad de GR (figura 4.18), de la expresión génica de la p22phox (figura 4.29) y de los niveles de TBARS (figura 4.10), alcanzando en algunos casos valores similares a los encontrados en ratas normotensas.

Por tanto, y como consecuencia de los resultados obtenidos tanto a nivel sistémico como cardiaco, podemos sugerir que la reducción observada en los niveles de presión arterial sanguínea en ratas tratadas conjuntamente con L-NAME y LC, con respecto a los presentados por el grupo con hipertensión inducida con L-NAME, podría asociarse, al menos en parte, a la disminución observada en el estado oxidativo, mostrando la LC una capacidad antioxidante y cardioprotectora. Estos resultados confirman estudios previos, donde igualmente se demuestra el efecto antioxidante de la LC, realizados en distintas condiciones como: envejecimiento (Kalaiselvi y Panneerselvam, 1998), arteriosclerosis (Dayanandan y col., 2001), fallo renal (Sener y col., 2004), ratas genéticamente hipertensas (Gómez-Amores y col., 2006; Gómez-Amores y col., 2007) y ratas con hipertensión inducida por dietas ricas en fructosa (Rajasekar y col., 2007), condiciones caracterizadas todas por un elevado estrés oxidativo.

Con el objeto de evaluar si los cambios encontrados en las actividades de las enzimas antioxidantes en el tejido cardiaco como consecuencia de la administración de LC estaban regulados a nivel molecular, hemos medido la expresión proteica y génica correspondiente a estas enzimas. En los animales hipertensos, se muestra una disminución en la cantidad de proteína y en la expresión de ARNm de las enzimas GPx (figuras 4.21 y 4.25) y SOD (figuras 4.23 y 4.27), que es análoga a la reducción observada en cuanto a la actividad enzimática en este tejido. La administración de LC revierte tanto la expresión

proteica como génica de estas enzimas hasta alcanzar los valores observados en las ratas normotensas (figuras 4.21, 4.23, 4.25 y 4.27). No existe en la literatura consultada un acuerdo generalizado en cuanto a los niveles de ARNm de estas enzimas. Así, la expresión génica de las enzimas GPx y SOD disminuyen o aumentan, respectivamente, en hígado y corazón de ratas SHR comparadas con ratas WKY (Wilson y Johnson, 2000). Por otro lado, Zhan y col. (2004) encontraron un aumento sin modificación en los niveles proteicos de GPx, respectivamente, en la corteza y en la médula renal de ratas SHR, mientras que la cantidad de proteínas de la SOD estaba inalterada o reducida en los mismos tejidos, respectivamente. En cuanto a la enzima antioxidante GR, no hemos encontrado diferencias significativas en la cantidad de proteína y en la expresión de ARNm entre los cuatro grupos experimentales de animales. Todos estos datos indican que la administración crónica de LC ha sido capaz de producir una regulación transcripcional de las enzimas GPx y SOD en el tejido cardíaco de los animales hipertensos, como respuesta al elevado estado oxidativo presente en la hipertensión arterial.

Como comentamos anteriormente, el NO tiene un papel muy importante en el desarrollo de estrés oxidativo. En condiciones normales, existe un equilibrio entre las especies reactivas del oxígeno (principalmente el anión superóxido) y el óxido nítrico en el organismo. Una mayor producción de estos agentes oxidantes va a producir una menor biodisponibilidad de NO, que terminará generando, en último término, vasoconstricción y aumento del estado oxidativo. En nuestras condiciones experimentales, existe igualmente una disminución en la biodisponibilidad de NO por la administración de L-NAME, lo que lleva a una vasoconstricción, aumento en la concentración de ROS y desarrollo de elevadas cifras de presión arterial, como previamente hemos puesto de manifiesto en las ratas tratadas con L-NAME. De todo lo indicado anteriormente, el hecho de que

el tratamiento con LC mejore los valores de presión arterial y el estado oxidativo sistémico y cardiaco en las ratas tratadas con L-NAME sugiere que, la LC, puede realizar su acción mediante un incremento en la biodisponibilidad del NO. Cuando determinamos los niveles de NO a nivel sistémico y cardiaco comprobamos que existía una normalización de los mismos en ratas hipertensas tratadas con LC (figuras 4.11 y 4.12). Esta normalización podría ser en parte debida a una sobre expresión de la enzima eNOS en el grupo WLNLC (figura 4.28). Este hecho pudo ser contrastado con el estudio a nivel molecular de la eNOS, en el que se observa una normalización de la expresión proteica y génica de esta enzima tras la administración de LC en el grupo de animales hipertensos (figuras 4.24 y 4.28). Estos resultados estarían de acuerdo con Calo y col. (2006), que demostraron un aumento en la expresión de eNOS en las células endoteliales humanas sometidas a estrés oxidativo inducido por H₂O₂. Por otro lado, y como se ha demostrado anteriormente por nuestro grupo de trabajo y por otros autores (Bueno y col., 2005; Calo y col., 2006; Gulcin, 2006), la LC con su actividad antioxidante, reduciría la formación de ROS, aumentando la biodisponibilidad de NO, entre otros mediante el desacoplamiento oxidativo de eNOS (Pignatelli y col., 2003).

5.4. CAPACIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LA L-CARNITINA EN EL TEJIDO CARDIACO

Nuestros resultados indican que el modelo experimental de hipertensión arterial que hemos utilizado (generado por la administración de L-NAME) se caracteriza por inducir estrés oxidativo e inflamación en el tejido cardiaco, además de a nivel sistémico (Takemoto y col., 1997; Luvará y col., 1998; Kitamoto y col., 2000). Así, hemos observado en las ratas con hipertensión

arterial inducida por L-NAME, un aumento significativo en los niveles plasmáticos de IL-1 β y IL-6 (figuras 4.30 y 4.31), y una ligera tendencia al alza en los niveles de TNF- α (figura 4.32), acompañados por un incremento en la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) a nivel cardiaco (figuras 4.33, 4.34 y 4.35). Estos resultados coinciden con investigaciones previas realizadas en pacientes hipertensos (Peeters y col., 2001) y en ratas SHR (Sanz-Rosa y col., 2005), las cuales encontraron un aumento en los niveles circulantes de los marcadores inflamatorios. Además, aumentos en estos y en otros marcadores de la inflamación han sido descritos en aortas de ratas hipertensas (Luvara y col., 1998; Gonzalez y col., 2000; Sanz-Rosa y col., 2005), así como en tejido cardiaco de ratas tratadas con L-NAME (Kataoka y col., 2004).

Cuando la LC fue administrada a las ratas hipertensas, se observó una disminución en cuanto a los niveles plasmáticos de las citoquinas y la expresión de ARNm de ellas en el tejido cardiaco, alcanzando en algunos casos valores similares a los observados en las ratas Wistar controles (figuras 4.33, 4.34 y 4.35). Estos resultados sugieren un efecto antiinflamatorio de la LC en la hipertensión arterial, que se caracteriza por mejorar tanto los niveles circulantes de los marcadores inflamatorios como el proceso inflamatorio en el miocardio, sintomatologías ambas que acompañan a la hipertensión arterial inducida por L-NAME.

Por lo tanto, y a la vista de los resultados expuestos podemos concluir que, la reducción de los niveles de presión sanguínea alcanzada con el tratamiento crónico de 12 semanas de LC en ratas con hipertensión inducida por L-NAME puede estar asociado, al menos en parte, con un descenso en el estado oxidativo y en el proceso inflamatorio, mostrando la LC un efecto cardioprotector antioxidante y antiinflamatorio en la hipertensión arterial.

5.5. IMPLICACIÓN DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA Y DEL SISTEMA NF κ B/I κ B EN EL PAPEL CARDIOPROTECTOR DE LA L-CARNITINA

Se sabe que el sistema renina-angiotensina (SRA) está implicado en el daño cardiaco ocasionado por la hipertensión arterial inducida por L-NAME (Pollock y col., 1993; Takemoto y col., 1997; Virdis y col., 2002; Cediél y col., 2003). La activación de este sistema es responsable de los cambios estructurales y funcionales producidos en los vasos y en el corazón de estos animales, ya que promueve en ellos el estrés oxidativo y la inflamación a través de la activación de la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa (Takemoto y col., 1997; Takemoto y col., 1997; Touyz, 2005; Savoia y Schifffrin, 2006; Miranda y col., 2007), la cual a su vez aumenta la producción de ROS y activa factores de transcripción, entre ellos el sistema NF κ B/I κ B.

Por lo tanto, para obtener más información sobre los mecanismos utilizados por la LC para reducir las cifras de presión arterial y proteger al corazón del aumento del estado oxidativo y de la inflamación producida como consecuencia de la HTA, hemos determinado la expresión génica de la ACE y del AT-1 (receptor tipo 1 de la angiotensina II), como estudio del sistema renina-angiotensina, y del NF κ B e I κ B, como estudio del sistema NF κ B / I κ B, en el tejido cardiaco.

Nuestros resultados muestran un aumento significativo de la cantidad de ARNm de ACE y AT-1 en el grupo de animales con hipertensión inducida por L-NAME comparado con los valores presentados por el grupo control (figuras 4.38 y 4.39). Estudios previos indican una sobre expresión del AT-1 en el corazón así como de la ACE en la aorta, en la hipertensión arterial inducida por L-NAME (Katoh y col., 1998; Gonzalez y col., 2000) y en otros modelos experimentales de

hipertensión arterial (Nyby y col., 2007). En cuanto al sistema NFκB / IκB, el aumento en la subunidad p50 del NFκB, encontrado en el tejido cardiaco, fue acompañado por una disminución de su inhibidor IκB en estas mismas ratas hipertensas (figuras 4.36 y 4.37).

Takemoto y col. (1997) observaron un incremento en la actividad cardiaca de ACE en ratas tratadas con L-NAME. En nuestro trabajo no hemos determinado la actividad cardiaca de ACE, pero no podemos excluir la posibilidad de encontrar cambios a este nivel que estén relacionadas con las modificaciones indicadas en la expresión génica de ACE en el corazón.

El tratamiento de LC en las ratas hipertensas produjo una reversión en todos estos valores, a veces incluso llegando a normalizarse con respecto a las ratas normotensas en el caso de la expresión de ACE, NFκB e IκB (figuras 4.36, 4.37 y 4.38). Previamente, una reducción en la actividad plasmática de ACE se ha descrito en ratas con hipertensión arterial inducida por dietas ricas en fructosa tratadas con LC (Rajasekar y col., 2007).

Todos estos resultados sugieren que tanto la formación como el efecto de la angiotensina II, así como la activación de la enzima NADPH oxidasa y del NFκB, aumentan en el corazón de las ratas hipertensas, como previamente se ha puesto de manifiesto (Dworakowski y col., 2006; Seddon y col., 2007; Sirker y col., 2007), y que el tratamiento crónico con LC inactiva el SRA, inactiva a la NADPH oxidasa e inhibe al NFκB; estando por tanto, estos elementos, implicados en el efecto hipotensor, cardioprotector, antioxidante y antiinflamatorio de la LC. La Ang II, al unirse con su receptor AT-1, genera estrés oxidativo e inflamación, mediante la activación de la NADPH oxidasa (Berry y Hare, 2004; Hare y Stamler, 2005; Touyz, 2005; Marchesi y col., 2008). Los resultados demuestran que la LC es capaz de disminuir significativamente los niveles de la expresión

génica de la subunidad p22phox de la enzima NADPH oxidasa, que se encontraban elevados en el grupo de animales con hipertensión inducida por la administración de L-NAME. Muchos son los autores que demuestran niveles elevados de la enzima NADPH oxidasa en tejidos cardiacos afectados por HTA (Hamilton y col., 2004; Touyz, 2005; Valko y col., 2007; Whaley-Connell y col., 2007; Marchesi y col., 2008; Puddu y col., 2008).

Resumiendo, la LC actúa protegiendo al corazón del aumento en el estado oxidativo e inflamatorio producido por la HTA, disminuyendo, de esta forma, las cifras de presión arterial sistólica y diastólica.

6. CONCLUSIONES

El estudio del efecto cardioprotector de la L-carnitina en ratas con hipertensión arterial inducida por la administración de L-NAME permite extraer las siguientes conclusiones:

1. El peso corporal de los animales una vez transcurridas las 12 semanas de tratamiento no ha mostrado diferencias significativas en los cuatro grupos experimentales de trabajo. Sí se observa un aumento en la relación del peso del corazón con respecto a la masa corporal en el grupo hipertenso con respecto al grupo normotenso. El tratamiento con LC no disminuye significativamente estos valores en el grupo tratado con L-NAME.
2. La presión arterial sistólica y diastólica aumenta a lo largo del periodo experimental, siendo estos valores siempre mayores en el grupo con hipertensión inducida que en el grupo control. La administración de LC disminuye de forma significativa estas cifras en el grupo hipertenso a partir de la quinta semana de tratamiento, no viéndose alteradas en el grupo normotenso.
3. El estudio del perfil lipídico muestra un efecto hipocolesterolémico e hipotriglicéridemiante de la LC en las ratas con hipertensión inducida por L-NAME.
4. El análisis a nivel sistémico del estado antioxidante total en los cuatro grupos de trabajo revela una disminución en los valores de la capacidad antioxidante total, del óxido nítrico, de las enzimas antioxidantes (GPx, GR y SOD) y de la relación GSH/GSSG en el grupo tratado con L-NAME con respecto al grupo control. El tratamiento con LC consigue aumentar significativamente estos niveles en el grupo hipertenso, sin apreciarse efecto alguno en el grupo normotenso.

5. La valoración de las enzimas antioxidantes en el corazón indican que la actividad, la expresión proteica y la expresión génica de las enzimas antioxidantes GPx y SOD disminuyen en las ratas hipertensas con respecto de las ratas normotensas; mientras que la actividad de la GR muestra un patrón opuesto, no presentando cambios molecularmente. El tratamiento con LC consigue revertir estos parámetros. La relación GSH/GSSG no presenta cambios significativos en ninguno de los cuatro grupos experimentales de trabajo.
6. La determinación del malondialdehído, como índice de la peroxidación lipídica en el ventrículo izquierdo, nos indica que existe un aumento de estos valores en el grupo hipertenso con respecto al grupo control normotenso; valores que disminuyen tras la administración de LC.
7. Las cifras de óxido nítrico en el tejido cardiaco son menores en el grupo tratado con L-NAME. La LC consigue restaurar los valores normales.
8. El estudio a nivel molecular de la enzima eNOS en el corazón nos revela una menor cantidad proteica y expresión génica en las ratas hipertensas con respecto a las ratas controles. El tratamiento con LC revierte estos valores. Resultados opuestos se han obtenido cuando se analiza la expresión de ARNm de la subunidad p22phox (subunidad catalítica de la enzima NADPH oxidasa).
9. Los niveles plasmáticos de IL-1 β y IL-6 son mayores en el grupo WLN con respecto al grupo Wistar, no presentando cambios el TNF- α . Tras la administración de LC estos valores disminuyen significativamente.
10. La expresión génica de los marcadores inflamatorios (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) y del NF- κ B está aumentada significativamente en el grupo con hipertensión

inducida; normalizándose los valores de IL-1 β , IL-6 y del NF- κ B tras el tratamiento con LC. La expresión de ARNm del inhibidor I κ B presenta el patrón opuesto.

11. La LC actúa disminuyendo los niveles plasmáticos de ACE tanto en el grupo normotenso como en el hipertenso.
12. La expresión relativa de ACE y AT-1 es mayor en el grupo hipertenso con respecto del grupo normotenso. La administración de LC disminuye significativamente estos valores.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. 1998). Clinical outcome with enalapril in symptomatic chronic heart failure; a dose comparison. The NETWORK Investigators. *Eur.Heart J.* 19: 481-489
2. 2005). [Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005)]. *Ital.Heart J.Suppl.* 6: 735-764
3. **A**bbas (2005). *Inmunología celular y molecular*. Ed. McGraw-Hill Interamericana
4. Abrams J (2003). C-reactive protein, inflammation, and coronary risk: an update. *Cardiol.Clin.* 21: 327-331
5. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, y Lomri A (2007). Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine.* 74: 324-329
6. Ago T, Kitazono T, Ooboshi H, Iyama T, Han YH, Takada J, Wakisaka M, Ibayashi S, Utsumi H, y Iida M (2004). Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation.* 109: 227-233
7. Alderman MH, Madhavan S, Ooi WL, Cohen H, Sealey JE, y Laragh JH (1991). Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *N.Engl.J.Med.* 324: 1098-1104
8. Álvarez de SM, Bueno R, Perez-Guerrero C, y Herrera MD (2007). Effect of L-carnitine and propionyl-L-carnitine on endothelial function of small mesenteric arteries from SHR. *J.Vasc.Res.* 44: 354-364
9. Amar J, Chamontin B, Ferrières J, Danchin N, Grenier O, Cantet C y Cambou JP (2002). Hypertension control at hospital discharge after acute coronary event: influence on cardiovascular prognosis--the PREVENIR study. *Heart.* 88(6):587-91
10. Amat di San FC, Pasquali M, y Longo N (2006). Pharmacological rescue of carnitine transport in primary carnitine deficiency. *Hum.Mutat.* 27: 513-523

11. Amat di San FC, Taylor MR, Mestroni L, Botto LD, y Longo N (2008). Cardiomyopathy and carnitine deficiency. *Mol.Genet.Metab.* 94: 162-166
12. Amat di San FC, Wang Y, y Longo N (2003). Functional domains in the carnitine transporter OCTN2, defective in primary carnitine deficiency. *J.Biol.Chem.* 278: 47776-47784
13. An SJ, Boyd R, Zhu M, Chapman A, Pimentel DR, y Wang HD (2007). NADPH oxidase mediates angiotensin II-induced endothelin-1 expression in vascular adventitial fibroblasts. *Cardiovasc.Res.* 75: 702-709
14. Anand I, Chandrashekhan Y, De GF, Pasini E, Mazzeletti A, Confortini R, y Ferrari R (1998). Acute and chronic effects of propionyl-L-carnitine on the hemodynamics, exercise capacity, and hormones in patients with congestive heart failure. *Cardiovasc.Drugs Ther.* 12: 291-299
15. Ángel AG (1986). Carnitine deficiency síndromes and lipid storage myopathies. Engel AG, Bancker BQ, editors. *Myology* (vol. 2). Nueva York: McGraw-Hill, Inc. 1663-1696
16. Argüelles Castillas S (2007). *Bioquímica Humana: de las bases a la clínica*. Ed. Universidad de Cartagena (Colombia). capítulo 5 : bioquímica del envejecimiento y de las especies reactivas de oxígeno. 631 – 685
17. Arisawa F, Tatsuzawa H, Kambayashi Y, Kuwano H, Fujimori K, y Nakano M (2003). MCLA-dependent chemiluminescence suggests that singlet oxygen plays a pivotal role in myeloperoxidase-catalysed bactericidal action in neutrophil phagosomes. *Luminescence.* 18: 229-238
18. Arockia Rani PJ y Panneerselvam C (2001). Carnitine as a free radical scavenger in aging. *Exp.Gerontol.* 36: 1713-1726
19. Arrigoni-Martelli E y Caso V (2001). Carnitine protects mitochondria and removes toxic acyls from xenobiotics. *Drugs Exp.Clin.Res.* 27: 27-49
20. Arsenian MA, New PS, y Cafasso CM (1996). Safety, tolerability, and efficacy of a glucose-insulin-potassium-magnesium-carnitine solution in acute myocardial infarction. *Am.J.Cardiol.* 78: 477-479

21. Asher A, Mule JJ, Reichert CM, Shiloni E, y Rosenberg SA (1987). Studies on the anti-tumor efficacy of systemically administered recombinant tumor necrosis factor against several murine tumors in vivo. *J.Immunol.* 138: 963-974
22. Babior BM (2004). NADPH oxidase. *Curr.Opin.Immunol.* 16: 42-47
23. Babior BM, Lambeth JD, y Nauseef W (2002). The neutrophil NADPH oxidase. *Arch.Biochem.Biophys.* 397: 342-344
24. Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, y Aceto JF (1990). Renin-angiotensin system involvement in pressure-overload cardiac hypertrophy in rats. *Am.J.Physiol.* 259: H324-H332
25. Balligand JL (2002). Heat shock protein 90 in endothelial nitric oxide synthase signaling: following the lead(er)? *Circ.Res.* 90: 838-841
26. Balligand JL, Ungureanu D, Kelly RA, Kobzik L, Pimental D, Michel T, y Smith TW (1993). Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium. *J.Clin.Invest.* 91: 2314-2319
27. Bandyopadhyay D, Chattopadhyay A, Ghosh G, y Datta AG (2004). Oxidative stress-induced ischemic heart disease: protection by antioxidants. *Curr.Med.Chem.* 11: 369-387
28. Bar-Shai M, Carmeli E, Ljubuncic P, y Reznick AZ (2008). Exercise and immobilization in aging animals: the involvement of oxidative stress and NF-kappaB activation. *Free Radic.Biol.Med.* 44: 202-214
29. Bartomeu Martínez y Núñez Pernas (2007). Hipertensión (Madr.); 24, Supl. 3: 10-16
30. Bayraktutan U (2002). Free radicals, diabetes and endothelial dysfunction. *Diabetes Obes.Metab.* 4: 224-238

31. Belay B, Esteban-Cruciani N, Walsh CA, y Kaskel FJ (2006). The use of levo-carnitine in children with renal disease: a review and a call for future studies. *Pediatr.Nephrol.* 21: 308-317
32. Bendall JK, Cave AC, Heymes C, Gall N, y Shah AM (2002). Pivotal role of a gp91(phox)-containing NADPH oxidase in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation.* 105: 293-296
33. Bernardini I, Rizzo WB, Dalakas M, Bernar J, y Gahl WA (1985). Plasma and muscle free carnitine deficiency due to renal Fanconi syndrome. *J.Clin.Invest.* 75: 1124-1130
34. Bernecker OY, Huq F, Heist EK, Podesser BK, y Hajjar RJ (2003). Apoptosis in heart failure and the senescent heart. *Cardiovasc.Toxicol.* 3: 183-190
35. Berry CE y Hare JM (2004). Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J.Physiol.* 555: 589-606
36. Bertelli A, Conte A, Ronca G, Segnini D, y Yu G (1991). Protective effect of propionyl carnitine against peroxidative damage to arterial endothelium membranes. *Int.J.Tissue React.* 13: 41-43
37. Bertomeu Martínez y Núñez Pernas (2007). Antagonistas de los receptores de la angiotensina y protección frente al desarrollo de la cardiopatía hipertensiva. *Hipertensión (Madr.).* 24(3): 10-16
38. Beswick RA, Dorrance AM, Leite R, y Webb RC (2001). NADH/NADPH oxidase and enhanced superoxide production in the mineralocorticoid hypertensive rat. *Hypertension.* 38: 1107-1111
39. Bezaire V, Bruce CR, Heigenhauser GJ, Tandon NN, Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A, y Spriet LL (2006). Identification of fatty acid translocase on human skeletal muscle mitochondrial membranes: essential role in fatty acid oxidation. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.* 290: E509-E515
40. Bohmer T, Bergrem H, y Eiklid K (1978). Carnitine deficiency induced during intermittent haemodialysis for renal failure. *Lancet.* 1: 126-128

41. Boonsanit D, Kanchanapangka S, y Buranakarl C (2006). L-carnitine ameliorates doxorubicin-induced nephrotic syndrome in rats. *Nephrology.(Carlton.)*. 11: 313-320
42. Borum PR y Bennett SG (1986). Carnitine as an essential nutrient. *J.Am.Coll.Nutr.* 5: 177-182
43. Brandsch C y Eder K (2002). Effect of L-carnitine on weight loss and body composition of rats fed a hypocaloric diet. *Ann.Nutr.Metab.* 46: 205-210
44. Bravo Y, Quiroz Y, Ferrebuz A, Vaziri ND, y Rodriguez-Iturbe B (2007). Mycophenolate mofetil administration reduces renal inflammation, oxidative stress, and arterial pressure in rats with lead-induced hypertension. *Am.J.Physiol Renal Physiol.* 293: F616-F623
45. Broderick TL, Quinney HA, Barker CC, y Lopaschuk GD (1993). Beneficial effect of carnitine on mechanical recovery of rat hearts reperfused after a transient period of global ischemia is accompanied by a stimulation of glucose oxidation. *Circulation.* 87: 972-981
46. Bueno R, Álvarez de SM, Perez-Guerrero C, Gomez-Amores L, Vazquez CM, y Herrera MD (2005). L-carnitine and propionyl-L-carnitine improve endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: different participation of NO and COX-products. *Life Sci.* 77: 2082-2097
47. Byrne JA, Grieve DJ, Bendall JK, Li JM, Gove C, Lambeth JD, Cave AC, y Shah AM (2003). Contrasting roles of NADPH oxidase isoforms in pressure-overload versus angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Circ.Res.* 93: 802-805
48. Cacciatore L, Cerio R, Ciarimboli M, Cocozza M, Coto V, D'Alessandro A, D'Alessandro L, Grattarola G, Imparato L, Lingetti M (1991). The therapeutic effect of L-carnitine in patients with exercise-induced stable angina: a controlled study. *Drugs Exp.Clin.Res.* 17: 225-235
49. Cai H y Harrison DG (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ.Res.* 87: 840-844

50. Calabrese V, Giuffrida Stella AM, Calvani M, y Butterfield DA (2006). Acetylcarnitine and cellular stress response: roles in nutritional redox homeostasis and regulation of longevity genes. *J.Nutr.Biochem.* 17: 73-88
51. Calo LA, Pagnin E, Davis PA, Semplicini A, Nicolai R, Calvani M, y Pessina AC (2006). Antioxidant effect of L-carnitine and its short chain esters: relevance for the protection from oxidative stress related cardiovascular damage. *Int.J.Cardiol.* 107: 54-60
52. Calvani M, Benatti P, Mancinelli A, D'Iddio S, Giordano V, Koverech A, Amato A, y Brass EP (2004). Carnitine replacement in end-stage renal disease and hemodialysis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1033:52-66.: 52-66
53. Campbell SE, Janicki JS, y Weber KT (1995). Temporal differences in fibroblast proliferation and phenotype expression in response to chronic administration of angiotensin II or aldosterone. *J.Mol.Cell Cardiol.* 27: 1545-1560
54. Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, y Shah AM (2006). NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid.Redox.Signal.* 8: 691-728
55. Cediél E, Sanz-Rosa D, Oubina MP, de las HN, Gonzalez Pacheco FR, Vegazo O, Jimenez J, Cachofeiro V, y Lahera V (2003). Effect of AT1 receptor blockade on hepatic redox status in SHR: possible relevance for endothelial function? *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol.* 285: R674-R681
56. Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, Rubin SM, Ding J, Simonsick EM, Harris TB, y Pahor M (2003). Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation.* 108: 2317-2322
57. Chabrashvili T, Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Quinn MT, Fujita T, Welch WJ, y Wilcox CS (2002). Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Hypertension.* 39: 269-274

58. Chapoy P, Angelini C, y Cederbaum S (1981). [Systemic carnitine deficiency: its place in Reye's syndrome (author's transl)]. *Nouv.Presse Med.* 10: 499-502
59. Chen QM y Tu VC (2002). Apoptosis and heart failure: mechanisms and therapeutic implications. *Am.J.Cardiovasc.Drugs.* 2: 43-57
60. Chisolm GM y Steinberg D (2000). The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic.Biol.Med.* 28: 1815-1826
61. Chowdhury P, Soulsby M, y Kim K (2007). L-carnitine influence on oxidative stress induced by hind limb unloading in adult rats. *Aviat.Space Environ.Med.* 78: 554-556
62. Cifuentes ME y Pagano PJ (2006). Targeting reactive oxygen species in hypertension. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 15: 179-186
63. Cleland SJ, Sattar N, Petrie JR, Forouhi NG, Elliott HL, y Connell JM (2000). Endothelial dysfunction as a possible link between C-reactive protein levels and cardiovascular disease. *Clin.Sci.(Lond).* 98: 531-535
64. Costanzo A, Moretti F, Burgio VL, Bravi C, Guido F, Levrero M, y Puri PL (2003). Endothelial activation by angiotensin II through NFkappaB and p38 pathways: Involvement of NFkappaB-inducible kinase (NIK), free oxygen radicals, and selective inhibition by aspirin. *J.Cell Physiol.* 195: 402-410
65. Cote CG, Yu FS, Zulueta JJ, Vosatka RJ, y Hassoun PM (1996). Regulation of intracellular xanthine oxidase by endothelial-derived nitric oxide. *Am.J.Physiol.* 271: L869-L874
66. Crabos M, Roth M, Hahn AW, y Erne P (1994). Characterization of angiotensin II receptors in cultured adult rat cardiac fibroblasts. Coupling to signaling systems and gene expression. *J.Clin.Invest.* 93: 2372-2378
67. Csonka C, Pataki T, Kovacs P, Muller SL, Schroeter ML, Tosaki A, y Blasig IE (2000). Effects of oxidative stress on the expression of antioxidative defense enzymes in spontaneously hypertensive rat hearts. *Free Radic.Biol.Med.* 29: 612-619

68. Cuspidi C, Negri F, y Zanchetti A (2008). Angiotensin II receptor blockers and cardiovascular protection: focus on left ventricular hypertrophy regression and atrial fibrillation prevention. *Vasc.Health Risk Manag.* 4: 67-73
69. Dandona P, Dhindsa S, Ghanim H, y Chaudhuri A (2007). Angiotensin II and inflammation: the effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade. *J.Hum.Hypertens.* 21: 20-27
70. Daniels SR, Kimball TR, Khoury P, Witt S, y Morrison JA (1996). Correlates of the hemodynamic determinants of blood pressure. *Hypertension.* 28: 37-41
71. Das DK, Maulik N, y Engelman RM (2004). Redox regulation of angiotensin II signaling in the heart. *J.Cell Mol.Med.* 8: 144-152
72. Davies MJ (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochim.Biophys.Acta.* 1703: 93-109
73. Dayanandan A, Kumar P, y Panneerselvam C (2001). Protective role of L-carnitine on liver and heart lipid peroxidation in atherosclerotic rats. *J.Nutr.Biochem.* 12: 254-257
74. De Backer G, Ambrosioni E, Borch-Johnsen K, Brotons C, Cifkova R, Dallongeville J, Ebrahim S, Faergeman O, Graham I, Mancia G, Cats VM, Orth-Gomer K, Perk J, Pyorala K, Rodicio JL, Sans S, Sansoy V, Sechtem U, Silber S, Thomsen T, y Wood D (2003). European guidelines on cardiovascular disease and prevention in clinical practice. *Atherosclerosis.* 171: 145-155
75. de Lorgeril M y Salen P (2006). Selenium and antioxidant defenses as major mediators in the development of chronic heart failure. *Heart Fail.Rev.* 11: 13-17
76. De Simone, Tzantzoglou S, Famularo G, Moretti S, Paoletti F, Vullo V, y Delia S (1993). High dose L-carnitine improves immunologic and metabolic parameters in AIDS patients. *Immunopharmacol.Immunotoxicol.* 15: 1-12

77. Derosa G, Cicero AF, Gaddi A, Mugellini A, Ciccarelli L, y Fogari R (2003). The effect of L-carnitine on plasma lipoprotein(a) levels in hypercholesterolemic patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin.Ther.* 25: 1429-1439
78. Deswal A y Mann DL (2005). Can valsartan reduce the occurrence of atrial fibrillation in heart failure patients? *Nat.Clin.Pract.Cardiovasc.Med.* 2: 502-503
79. Deten A, Volz HC, Briest W, y Zimmer HG (2002). Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc.Res.* 55: 329-340
80. Dhalla NS, Temsah RM, y Netticadan T (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J.Hypertens.* 18: 655-673
81. Dhitavat S, Ortiz D, Rogers E, Rivera E, y Shea TB (2005). Folate, vitamin E, and acetyl-L-carnitine provide synergistic protection against oxidative stress resulting from exposure of human neuroblastoma cells to amyloid-beta. *Brain Res.* 1061: 114-117
82. Dickinson HO, Mason JM, Nicolson DJ, Campbell F, Beyer FR, Cook JV, Williams B, y Ford GA (2006). Lifestyle interventions to reduce raised blood pressure: a systematic review of randomized controlled trials. *J.Hypertens.* 24: 215-233
83. Diep QN, Amiri F, Touyz RM, Cohn JS, Endemann D, Neves MF, y Schiffrin EL (2002). PPARalpha activator effects on Ang II-induced vascular oxidative stress and inflammation. *Hypertension.* 40: 866-871
84. Digiesi V, Cantini F, Bisi G, Guarino G, y Brodbeck B (1994). L-carnitine adjuvant therapy in essential hypertension. *Clin.Ter.* 144: 391-395
85. Dimmitt SB, West JN, Eames SM, Gibson JM, Gosling P, y Littler WA (1989). Usefulness of ophthalmoscopy in mild to moderate hypertension. *Lancet.* 1: 1103-1106

86. Dinarello CA (1991). Inflammatory cytokines: interleukin-1 and tumor necrosis factor as effector molecules in autoimmune diseases. *Curr.Opin.Immunol.* 3: 941-948
87. Dinarello CA (1991). Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood.* 77: 1627-1652
88. Dokmeci D (2005). Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines. *Folia Med.(Plovdiv).* 47: 26-30
89. Dokmeci D, Akpolat M, Aydogdu N, Doganay L, y Turan FN (2005). L-carnitine inhibits ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Pharmacol.Rep.* 57: 481-488
90. Dostal DE y Baker KM (1999). The cardiac renin-angiotensin system: conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ.Res.* 85: 643-650
91. Doughan AK, Harrison DG, y Dikalov SI (2008). Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ.Res.* 102: 488-496
92. Droge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47-95
93. Duan J y Moffat MP (1991). Protective effects of D,L-carnitine against arrhythmias induced by lysophosphatidylcholine or reperfusion. *Eur.J.Pharmacol.* 192: 355-363
94. Duarte J, Jimenez R, O'Valle F, Galisteo M, Perez-Palencia R, Vargas F, Perez-Vizcaino F, Zarzuelo A, y Tamargo J (2002). Protective effects of the flavonoid quercetin in chronic nitric oxide deficient rats. *J.Hypertens.* 20: 1843-1854
95. Ducher M, Juillard L, Leutenegger E, y Fauvel JP (2008). Major Cardiovascular Risk Factors Are Not Taken Into Account by Physicians When Targeting Blood Pressure Values for Uncontrolled Hypertensive Patients. *Am.J.Hypertens.*

96. Duprez DA (2008). Cardiac autonomic imbalance in pre-hypertension and in a family history of hypertension. *J.Am.Coll.Cardiol.* 51: 1902-1903
97. Dworakowski R, Anilkumar N, Zhang M, y Shah AM (2006). Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Biochem.Soc.Trans.* 34: 960-964
98. Dyck DJ (2000). Dietary fat intake, supplements, and weight loss. *Can.J.Appl.Physiol.* 25: 495-523
99. Emberson JR, Whincup PH, Morris RW, y Walker M (2003). Re-assessing the contribution of serum total cholesterol, blood pressure and cigarette smoking to the aetiology of coronary heart disease: impact of regression dilution bias. *Eur.Heart J.* 24: 1719-1726
100. Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Vander HS, y Murray CJ (2002). Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet.* 360: 1347-1360
101. Famularo G, De SC, Trinchieri V, y Mosca L (2004). Carnitines and its congeners: a metabolic pathway to the regulation of immune response and inflammation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1033:132-8.: 132-138
102. Feil R, Lohmann SM, de JH, Walter U, y Hofmann F (2003). Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ.Res.* 93: 907-916
103. Feletou M y Vanhoutte PM (2006). Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 291: H985-1002
104. Fenton HJH (1894). Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc.* 65: 899
105. Fenton HJH (1899). Oxidation of certain organic acids in the presence of ferrous salts. *Proc. Chem. Soc.* 25: 224

106. Ferrari R, Merli E, Cicchitelli G, Mele D, Fucili A, y Ceconi C (2004). Therapeutic effects of L-carnitine and propionyl-L-carnitine on cardiovascular diseases: a review. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1033:79-91.: 79-91
107. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, y Simmons RL (1992). Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science.* 257: 387-389
108. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, y Simmons RL (1992). Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science.* 257: 387-389
109. Flatman PW (2007). Cotransporters, WNKs and hypertension: important leads from the study of monogenetic disorders of blood pressure regulation. *Clin.Sci.(Lond).* 112: 203-216
110. Forman HJ, Fukuto JM, Miller T, Zhang H, Rinna A, y Levy S (2008). The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. *Arch.Biochem.Biophys.* 477: 183-195
111. Fortunato M, Caruso S, Del VL, Procaccio M, Tedoldi S, Viganò S, y Cusi D (2006). [Genetics and arterial hypertension: monogenic forms]. *G.Ital.Nefrol.* 23: 301-312
112. Foster KA, O'Rourke B, y Reibel DK (1985). Altered carnitine metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Physiol.* 249: E183-E186
113. Franklin SS, Gustin W, Wong ND, Larson MG, Weber MA, Kannel WB, y Levy D (1997). Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The Framingham Heart Study. *Circulation.* 96: 308-315
114. Fraser F y Zammit VA (1999). Submitochondrial and subcellular distributions of the carnitine-acylcarnitine carrier. *FEBS Lett.* 445: 41-44
115. Fukusako T, Negoro K, Tsuda N, Kato M, y Morimatsu M (1995). [A case of secondary carnitine deficiency due to anorexia nervosa and severe liver damage]. *Rinsho Shinkeigaku.* 35: 34-37

116. Furuno T, Kanno T, Arita K, Asami M, Utsumi T, Doi Y, Inoue M, y Utsumi K (2001). Roles of long chain fatty acids and carnitine in mitochondrial membrane permeability transition. *Biochem.Pharmacol.* 62: 1037-1046
117. Gasbarrini G, Mingrone G, Giancaterini A, De GA, Scarfone A, Capristo E, Calvani M, Caso V, y Greco AV (2003). Effects of propionyl-L-carnitine topical irrigation in distal ulcerative colitis: a preliminary report. *Hepatogastroenterology.* 50: 1385-1389
118. Geiszt M (2006). NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc.Res.* 71: 289-299
119. Ghosh S (2000). Linking genotype with phenotype in inflammatory bowel disease--Will we ever have reagent standard patients? *Dis.Markers.* 16: 167-171
120. Ghosh S y Karin M (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* 109 Suppl:S81-96.: S81-S96
121. Ghosh S, Standen NB, y Galinianes M (2001). Failure to precondition pathological human myocardium. *J.Am.Coll.Cardiol.* 37: 711-718
122. Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, y Pelicci PG (2007). Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 8: 722-728
123. Giovannini C, Filesi C, D'Archivio M, Scazzocchio B, Santangelo C, y Masella R (2006). [Polyphenols and endogenous antioxidant defences: effects on glutathione and glutathione related enzymes]. *Ann.Ist.Super.Sanita.* 42: 336-347
124. Gomez-Amores L, Mate A, y Vazquez CM (2003). L-carnitine transport in kidney of normotensive, Wistar-Kyoto rats: effect of chronic L-carnitine administration. *Pharm.Res.* 20: 1133-1140
125. Gomez-Amores L, Mate A, Revilla E, Santa-Maria C, y Vazquez CM (2006). Antioxidant activity of propionyl-L-carnitine in liver and heart of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 78: 1945-1952

126. Gomez-Amores L, Mate A, Miguel-Carrasco JL, Jimenez L, Jos A, Camean AM, Revilla E, Santa-Maria C, y Vazquez CM (2007). L-carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats. *J.Nutr.Biochem.* 18: 533-540
127. Gonzalez W, Fontaine V, Pueyo ME, Laquay N, Messika-Zeitoun D, Philippe M, Arnal JF, Jacob MP, y Michel JB (2000). Molecular plasticity of vascular wall during N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: modulation of proinflammatory signals. *Hypertension.* 36: 103-109
128. Gonzalez A, Fortuno MA, Querejeta R, Ravassa S, Lopez B, Lopez N, y Diez J (2003). Cardiomyocyte apoptosis in hypertensive cardiomyopathy. *Cardiovasc.Res.* 59: 549-562
129. Gonzalez MA y Selwyn AP (2003). Endothelial function, inflammation, and prognosis in cardiovascular disease. *Am.J.Med.* 115 Suppl 8A:99S-106S.: 99S-106S
130. Gonzalez-Juanatey JR (1999). [Arterial hypertension and hypertensive cardiopathy at the turn of the millenium]. *Rev.Esp.Cardiol.* 52 Suppl 3:1-3.: 1-3
131. Gradman AH, Schmieder RE, Lins RL, Nussberger J, Chiang Y, y Bedigian MP (2005). Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients. *Circulation.* 111: 1012-1018
132. Gramignano G, Lusso MR, Madeddu C, Massa E, Serpe R, Deiana L, Lamonica G, Dessi M, Spiga C, Astara G, Maccio A, y Mantovani G (2006). Efficacy of l-carnitine administration on fatigue, nutritional status, oxidative stress, and related quality of life in 12 advanced cancer patients undergoing anticancer therapy. *Nutrition.* 22: 136-145
133. Grassi G, Seravalle G, Calhoun DA, Bolla GB, Giannattasio C, Marabini M, Del BA, y Mancia G (1994). Mechanisms responsible for sympathetic activation by cigarette smoking in humans. *Circulation.* 90: 248-253

- 134.Grassi G, Quarti-Treviso F, Dell'oro R, y Mancia G (2008). Essential hypertension and the sympathetic nervous system. *Neurol.Sci.* 29 Suppl 1:S33-6.: S33-S36
- 135.Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, Li HT, y Karliner JS (1998). Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc.Res.* 40: 352-363
- 136.Griffin MD, Xing N, y Kumar R (2003). Vitamin D and its analogs as regulators of immune activation and antigen presentation. *Annu.Rev.Nutr.* 23:117-45.
- 137.Groppelli A, Giorgi DM, Omboni S, Parati G, y Mancia G (1992). Persistent blood pressure increase induced by heavy smoking. *J.Hypertens.* 10: 495-499
- 138.Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC, Jr., Spertus JA, y Costa F (2005). Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation.* 112: 2735-2752
- 139.Guijarro A, Laviano A, y Meguid MM (2006). Hypothalamic integration of immune function and metabolism. *Prog.Brain Res.* 153:367-405.: 367-405
- 140.Gulcin I (2006). Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci.* 78: 803-811
- 141.Guo G, Yan-Sanders Y, Lyn-Cook BD, Wang T, Tamae D, Ogi J, Khaletskiy A, Li Z, Weydert C, Longmate JA, Huang TT, Spitz DR, Oberley LW, y Li JJ (2003). Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. *Mol.Cell Biol.* 23: 2362-2378
- 142.Guzik TJ, West NE, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, y Channon KM (2000). Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ.Res.* 86: E85-E90

143. Haber F y Weiss J (1934). The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc. Royal. Soc. A.* 147: 332
144. Hall G, Hasday JD, y Rogers TB (2006). Regulating the regulator: NF-kappaB signaling in heart. *J.Mol.Cell Cardiol.* 41: 580-591
145. Hall JE (2003). The kidney, hypertension, and obesity. *Hypertension.* 41: 625-633
146. Halliwell B (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem.Soc.Trans.* 35: 1147-1150
147. Halliwell B y Whiteman M (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br.J.Pharmacol.* 142: 231-255
148. Hamilton CA, Miller WH, Al-Benna S, Brosnan MJ, Drummond RD, McBride MW, y Dominiczak AF (2004). Strategies to reduce oxidative stress in cardiovascular disease. *Clin.Sci.(Lond).* 106: 219-234
149. Hansberg W (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. En: Mensaje bioquímico, vol XXVI. Cea Bonilla A., del Arenal Mena I. P., Riveros Rosas H. y Vázquez-Contreras E. (eds). 19-54
150. Hare JM y Stamler JS (2005). NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J.Clin.Invest.* 115: 509-517
151. Harrison DG, Cai H, Landmesser U, y Griendling KK (2003). Interactions of angiotensin II with NAD(P)H oxidase, oxidant stress and cardiovascular disease. *J.Renin.Angiotensin.Aldosterone.Syst.* 4: 51-61
152. Hassan MQ, Hussain SA, Zaki MA, Alsharif NZ, y Stohs SJ (1995). Protective effects of antioxidants against uraemia-induced lipid peroxidation and glutathione depletion in humans. *Pharmacol.Toxicol.* 77: 407-411
153. Hawkins CL y Davies MJ (2001). Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim.Biophys.Acta.* 1504: 196-219

154. Hawkins CL y Davies MJ (2001). Hypochlorite-induced damage to nucleosides: formation of chloramines and nitrogen-centered radicals. *Chem.Res.Toxicol.* 14: 1071-1081
155. Hayden MS y Ghosh S (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18: 2195-2224
156. He FJ y MacGregor GA (2007). Salt, blood pressure and cardiovascular disease. *Curr.Opin.Cardiol.* 22: 298-305
157. Hebert MJ, Masse M, Vigneault N, Sirois I, Troyanov S, y Madore F (2001). Soluble Fas is a marker of coronary artery disease in patients with end-stage renal disease. *Am.J.Kidney Dis.* 38: 1271-1276
158. Henrotin Y, Kurz B, y Aigner T (2005). Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis.Cartilage.* 13: 643-654
159. Hernandez-Presa MA, Ortego M, Tunon J, Martin-Ventura JL, Mas S, Blanco-Colio LM, Aparicio C, Ortega L, Gomez-Gerique J, Vivanco F, y Egido J (2003). Simvastatin reduces NF-kappaB activity in peripheral mononuclear and in plaque cells of rabbit atheroma more markedly than lipid lowering diet. *Cardiovasc.Res.* 57: 168-177
160. Hiatt WR, Regensteiner JG, Creager MA, Hirsch AT, Cooke JP, Olin JW, Gorbunov GN, Isner J, Lukjanov YV, Tsitsiashvili MS, Zabelskaya TF, y Amato A (2001). Propionyl-L-carnitine improves exercise performance and functional status in patients with claudication. *Am.J.Med.* 110: 616-622
161. Himmelmann A (1999). Hypertension: an important precursor of heart failure. *Blood Press.* 8: 253-260
162. Hirotani S, Otsu K, Nishida K, Higuchi Y, Morita T, Nakayama H, Yamaguchi O, Mano T, Matsumura Y, Ueno H, Tada M, y Hori M (2002). Involvement of nuclear factor-kappaB and apoptosis signal-regulating kinase 1 in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation.* 105: 509-515

- 163.Hoppel C (2003). The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *Am.J.Kidney Dis.* 41: S4-12
- 164.Hosenpud JD, Campbell SM, y Mendelson DJ (1989). Interleukin-1-induced myocardial depression in an isolated beating heart preparation. *J.Heart Transplant.* 8: 460-464
- 165.Humphrey JD (2008). Mechanisms of arterial remodeling in hypertension: coupled roles of wall shear and intramural stress. *Hypertension.* 52(2):195-200
- 166.Iglarz M, Touyz RM, Viel EC, Amiri F, y Schiffrin EL (2004). Involvement of oxidative stress in the profibrotic action of aldosterone. Interaction with the renin-angiotension system. *Am.J.Hypertens.* 17: 597-603
- 167.Ignarro LJ, Sisodia M, Trinh K, Bedrood S, Wu G, Wei LH y Buga GM (2002). Nebivolol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by mechanisms involving nitric oxide but not cyclic GMP. *Nitric oxide.* 7 (2): 83-90
- 168.Ilias I, Manoli I, Blackman MR, Gold PW, y Alesci S (2004). L-Carnitine and acetyl-L-carnitine in the treatment of complications associated with HIV infection and antiretroviral therapy. *Mitochondrion.* 4: 163-168
- 169.Irat AM, Aktan F, y Ozansoy G (2003). Effects of L-carnitine treatment on oxidant/antioxidant state and vascular reactivity of streptozotocin-diabetic rat aorta. *J.Pharm.Pharmacol.* 55: 1389-1395
- 170.Ito T, Sugiyama N, Kobayashi M, Kidouchi K, Itoh T, Uemura O, Sugiyama K, y Togari H (1995). Alteration of ammonia and carnitine levels in short-term treatment with pivalic acid-containing prodrug. *Tohoku J.Exp.Med.* 175: 43-53
- 171.Iyer RN, Khan AA, Gupta A, Vajifdar BU, y Lokhandwala YY (2000). L-carnitine moderately improves the exercise tolerance in chronic stable angina. *J.Assoc.Physicians India.* 48: 1050-1052

172. Izzut-Uysal VN, Agac A, y Derin N (2003). Effect of L-carnitine on carrageenan-induced inflammation in aged rats. *Gerontology*. 49: 287-292
173. Janczewski AM, Kadokami T, Lemster B, Frye CS, McTiernan CF, y Feldman AM (2003). Morphological and functional changes in cardiac myocytes isolated from mice overexpressing TNF- α . *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*. 284: H960-H969
174. Janero DR y Burghardt B (1988). Myocardial vitamin E (alpha-tocopherol) contents of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats. *Int.J.Vitam.Nutr.Res*. 58: 292-294
175. Janssen-Heininger YM, Macara I, y Mossman BT (1999). Cooperativity between oxidants and tumor necrosis factor in the activation of nuclear factor (NF)- κ B: requirement of Ras/mitogen-activated protein kinases in the activation of NF- κ B by oxidants. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol*. 20: 942-952
176. Ji LL, Gomez-Cabrera MC, y Vina J (2007). Role of nuclear factor κ B and mitogen-activated protein kinase signaling in exercise-induced antioxidant enzyme adaptation. *Appl.Physiol Nutr.Metab*. 32: 930-935
177. Kakar SS, Sellers JC, Devor DC, Musgrove LC, y Neill JD (1992). Angiotensin II type-1 receptor subtype cDNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem.Biophys.Res.Commun*. 183: 1090-1096
178. Kalaiselvi T y Panneerselvam C (1998). Effect of L-carnitine on the status of lipid peroxidation and antioxidants in aging rats. *J. Nutr. Biochem*. 9: 575-581
179. Kameda K, Matsunaga T, Abe N, Hanada H, Ishizaka H, Ono H, Saitoh M, Fukui K, Fukuda I, Osanai T, y Okumura K (2003). Correlation of oxidative stress with activity of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease. Possible role for left ventricular remodelling. *Eur.Heart J*. 24: 2180-2185
180. Kannel WB (2002). Cardiovascular hazards of components of blood pressure. *J.Hypertens*. 20: 395-397

181. Kannel WB (2004). Hypertensive risk assessment: cardiovascular risk factors and hypertension. *J.Clin.Hypertens.(Greenwich.)*. 6: 393-399
182. Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ, y Levy D (1998). Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates. *Am.J.Cardiol.* 82: 2N-9N
183. Kaperonis N y Bakris G (2003). Blood pressure, antihypertensive therapy and risk for renal injury in African-Americans. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 12: 79-84
184. Kaplan NM (2003). Hipertensión clínica (4ª edición). Waverly Hispanica. 2003. Capítulo 4
185. Kart A, Yapar K, Karapehliyan M, y Citil M (2007). The possible protective effect of L-carnitine on tilmicosin-induced cardiotoxicity in mice. *J.Vet.Med.A Physiol Pathol.Clin.Med.* 54: 144-146
186. Kaschina E y Unger T (2003). Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press.* 12: 70-88
187. Kasparova S, Brezova V, Valko M, Horecky J, Mlynarik V, Liptaj T, Vancova O, Ulicna O, y Dobrota D (2005). Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. *Neurochem.Int.* 46: 601-611
188. Kataoka C, Egashira K, Ishibashi M, Inoue S, Ni W, Hiasa K, Kitamoto S, Usui M, y Takeshita A (2004). Novel anti-inflammatory actions of amlodipine in a rat model of arteriosclerosis induced by long-term inhibition of nitric oxide synthesis. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 286: H768-H774
189. Kataoka T, Hamasaki S, Ishida S, Saihara K, Okui H, Fukudome T, Shinsato T, Mizoguchi E, Ninomiya Y, Otsuji Y, Minagoe S, y Tei C (2004). Contribution of increased minimal coronary resistance and attenuated vascular adaptive remodeling to myocardial ischemia in patients with systemic hypertension and ventricular hypertrophy. *Am.J.Cardiol.* 94: 484-487

190. Katoh M, Egashira K, Usui M, Ichiki T, Tomita H, Shimokawa H, Rakugi H, y Takeshita A (1998). Cardiac angiotensin II receptors are upregulated by long-term inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Circ.Res.* 83: 743-751
191. Kearney JN (2005). Guidelines on processing and clinical use of skin allografts. *Clin.Dermatol.* 23: 357-364
192. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, y He J (2005). Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet.* 365: 217-223
193. Kelly GS (1998). L-Carnitine: therapeutic applications of a conditionally-essential amino acid. *Altern.Med.Rev.* 3: 345-360
194. Kandler BS (2006). Supplemental conditionally essential nutrients in cardiovascular disease therapy. *J.Cardiovasc.Nurs.* 21: 9-16
195. Kerner J y Hoppel C (2000). Fatty acid import into mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta.* 1486: 1-17
196. Khan BV, Sola S, Lauten WB, Natarajan R, Hooper WC, Menon RG, Lerakis S, y Helmy T (2004). Quinapril, an ACE inhibitor, reduces markers of oxidative stress in the metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 27: 1712-1715
197. Kinnula VL y Crapo JD (2003). Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 167: 1600-1619
198. Kinugawa K, Takahashi T, Kohmoto O, Yao A, Aoyagi T, Momomura S, Hirata Y, y Serizawa T (1994). Nitric oxide-mediated effects of interleukin-6 on $[Ca^{2+}]_i$ and cell contraction in cultured chick ventricular myocytes. *Circ.Res.* 75: 285-295
199. Kitamoto S, Egashira K, Kataoka C, Usui M, Koyanagi M, Takemoto M, y Takeshita A (2000). Chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats increases aortic superoxide anion production via the action of angiotensin II. *J.Hypertens.* 18: 1795-1800

200. Kobayashi A y Fujisawa S (1994). Effect of L-carnitine on mitochondrial acyl CoA esters in the ischemic dog heart. *J.Mol.Cell Cardiol.* 26: 499-508
201. Kodde J, Hofman N, Reichert CL, van L, I, y Wilde AA (2007). Cardiogenetic counselling in a non-university hospital. *Neth.Heart J.* 15: 412-414
202. Koizumi A, Nozaki J, Ohura T, Kayo T, Wada Y, Nezu J, Ohashi R, Tamai I, Shoji Y, Takada G, Kibira S, Matsuishi T, y Tsuji A (1999). Genetic epidemiology of the carnitine transporter OCTN2 gene in a Japanese population and phenotypic characterization in Japanese pedigrees with primary systemic carnitine deficiency. *Hum.Mol.Genet.* 8: 2247-2254
203. Kopp E y Ghosh S (1994). Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science.* 265: 956-959
204. Kosan C, Sever L, Arisoy N, Caliskan S, y Kasapcopur O (2003). Carnitine supplementation improves apolipoprotein B levels in pediatric peritoneal dialysis patients. *Pediatr.Nephrol.* 18: 1184-1188
205. Krohn K, Maier J, y Paschke R (2007). Mechanisms of disease: hydrogen peroxide, DNA damage and mutagenesis in the development of thyroid tumors. *Nat.Clin.Pract.Endocrinol.Metab.* 3: 713-720
206. Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, Demetris AJ, y Feldman AM (1997). Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ.Res.* 81: 627-635
207. Kukreja RC y Hess ML (1992). The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc.Res.* 26: 641-655
208. Kumar A, Singh RB, Saxena M, Niaz MA, Josh SR, Chattopadhyay P, Mechirova V, Pella D, y Fedacko J (2007). Effect of carni Q-gel (ubiquinol and carnitine) on cytokines in patients with heart failure in the Tishcon study. *Acta Cardiol.* 62: 349-354

209. Lahera V y Cachofeiro V (2005). La alteración renal no es el principal mecanismo patogénico en el desarrollo de la hipertensión arterial. (2005). *Hipertensión (Madr.)*; 21 (5): 251-255
210. Lahera V, de las Heras N, Miana M, Fernández T, Giuberti K, Martín B y Cachofeiro V (2007). Importancia del sistema renina-angiotensina en el daño cardiovascular y renal. *Hipertensión (Madr.)*; 24 Supl 5: 4-14
211. Lango R, Smolenski RT, Narkiewicz M, Suchorzewska J, y Lysiak-Szydłowska W (2001). Influence of L-carnitine and its derivatives on myocardial metabolism and function in ischemic heart disease and during cardiopulmonary bypass. *Cardiovasc.Res.* 51: 21-29
212. Laso FJ (2004). *Patología General*. Ed. Masson
213. Lassegue B y Clempus RE (2003). Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol.* 285: R277-R297
214. Laviano A, Meguid MM, Guijarro A, Muscaritoli M, Cascino A, Preziosa I, Molino A, y Rossi FF (2006). Antimyopathic effects of carnitine and nicotine. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care.* 9: 442-448
215. Lawes CM, Vander HS, Law MR, Elliott P, MacMahon S, y Rodgers A (2006). Blood pressure and the global burden of disease 2000. Part II: estimates of attributable burden. *J.Hypertens.* 24: 423-430
216. Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, Malhotra A, Kajstura J, y Anversa P (1998). Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J.Clin.Invest.* 101: 1326-1342
217. Levy S, Breithardt G, Campbell RW, Camm AJ, Daubert JC, Allessie M, Aliot E, Capucci A, Cosio F, Crijns H, Jordaens L, Hauer RN, Lombardi F, y Luderitz B (1998). Atrial fibrillation: current knowledge and recommendations for management. Working Group on Arrhythmias of the European Society of Cardiology. *Eur.Heart J.* 19: 1294-1320

- 218.Lindstedt G y Lindstedt S (1970). Cofactor requirements of gamma-butyrobetaine hydroxylase from rat liver. *J.Biol.Chem.* 245: 4178-4186
- 219.Llorens S, Salazar FJ, y Nava E (2005). Assessment of the nitric oxide system in the heart, aorta and kidney of aged Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J.Hypertens.* 23: 1507-1514
- 220.Longo N, mat di San FC, y Pasquali M (2006). Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. *Am.J.Med.Genet.C.Semin.Med.Genet.* 142C: 77-85
- 221.Lopaschuk G (2000). Regulation of carbohydrate metabolism in ischemia and reperfusion. *Am.Heart J.* 139: S115-S119
- 222.Lorell BH y Carabello BA (2000). Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation.* 102: 470-479
- 223.Loster H, Mieke K, Punzel M, Stiller O, Pankau H, y Schauer J (1999). Prolonged oral L-carnitine substitution increases bicycle ergometer performance in patients with severe, ischemically induced cardiac insufficiency. *Cardiovasc.Drugs Ther.* 13: 537-546
- 224.Loutel A, Moulonguet A, Demaugre F, Janowski M, Lacroix-Jousselin C y Said G (1993). Type II carnitine palmitoyl transferase deficiency complicated by acute respiratory failure. *Rev. Neurol.* 149: 797-799
- 225.Lowitt S, Malone JI, Salem AF, Korthals J, y Benford S (1995). Acetyl-L-carnitine corrects the altered peripheral nerve function of experimental diabetes. *Metabolism.* 44: 677-680
- 226.Luo X, Reichetzer B, Trines J, Benson LN, y Lehotay DC (1999). L-carnitine attenuates doxorubicin-induced lipid peroxidation in rats. *Free Radic.Biol.Med.* 26: 1158-1165
- 227.Luvara G, Pueyo ME, Philippe M, Mandet C, Savoie F, Henrion D, y Michel JB (1998). Chronic blockade of NO synthase activity induces a proinflammatory phenotype in the arterial wall: prevention by angiotensin II antagonism. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 18: 1408-1416

228. **M**accari F, Arseni A, Chiodi P, Ramacci MT, y Angelucci L (1987). The effect of exogenous L-carnitine on biochemical parameters in serum and in heart of the hyperlipidaemic rat. *Basic Res.Cardiol.* 82 Suppl 1:75-81.: 75-81
229. Makino N, Mochizuki Y, Bannai S, y Sugita Y (1994). Kinetic studies on the removal of extracellular hydrogen peroxide by cultured fibroblasts. *J.Biol.Chem.* 269: 1020-1025
230. Mancia G, De BG, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HA, y Zanchetti A (2007). 2007 ESH-ESC Practice Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: ESH-ESC Task Force on the Management of Arterial Hypertension. *J.Hypertens.* 25: 1751-1762
231. Mancia G, De BG, Dominiczak A, Cifkova R, Fagard R, Germano G, Grassi G, Heagerty AM, Kjeldsen SE, Laurent S, Narkiewicz K, Ruilope L, Rynkiewicz A, Schmieder RE, Boudier HA, Zanchetti A, Vahanian A, Camm J, De CR, Dean V, Dickstein K, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen SD, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano JL, Erdine S, Kiowski W, gabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Lindholm LH, Viigimaa M, Adamopoulos S, gabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Bertomeu V, Clement D, Erdine S, Farsang C, Gaita D, Lip G, Mallion JM, Manolis AJ, Nilsson PM, O'Brien E, Ponikowski P, Redon J, Ruschitzka F, Tamargo J, van ZP, Waeber B, y Williams B (2007). 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension: The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J.Hypertens.* 25: 1105-1187
232. Mancia G, Facchetti R, Bombelli M, Polo FH, Grassi G, Giannattasio C, y Sega R (2005). Relationship of office, home, and ambulatory blood pressure to blood glucose and lipid variables in the PAMELA population. *Hypertension.* 45: 1072-1077
233. Mancuso C, Bates TE, Butterfield DA, Calafato S, Cornelius C, De LA, nkova Kostova AT, y Calabrese V (2007). Natural antioxidants in Alzheimer's disease. *Expert.Opin.Investig.Drugs.* 16: 1921-1931

234. Marchesi C, Paradis P, y Schiffrin EL (2008). Role of the renin-Marczin N, El-Habashi N, Hoare GS, Bundy RE, y Yacoub M (2003). Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. *Arch.Biochem.Biophys.* 420: 222-236
235. Marczin N, El-Habashi N, Hoare GS, Bundy RE, Yacoub M (2003). Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. *Arch.Biochem.Biophys.* 420(2): 222-36
236. Marklund SL (1984). Properties of extracellular superoxide dismutase from human lung. *Biochem.J.* 220: 269-272
237. Marzo A, Cardace G, Corbelletta C, Pace S, D'Iddio S, Verrotti C, Cavatorta E, y Grignaffini A (1994). Plasma concentration, urinary excretion and renal clearance of L-carnitine during pregnancy: a reversible secondary L-carnitine deficiency. *Gynecol.Endocrinol.* 8: 115-120
238. Masse M, Hebert MJ, Troyanov S, Vigneault N, Sirois I, y Madore F (2002). Soluble Fas is a marker of peripheral arterial occlusive disease in haemodialysis patients. *Nephrol.Dial.Transplant.* 17: 485-491
239. Mates JM, Perez-Gomez C, y Nunez dC, I (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin.Biochem.* 32: 595-603
240. Mathews CK, van Holde KE y Ahern KG (2002). Transporte electrónico, fosforilación oxidativa y metabolismo del oxígeno. En: *Bioquímica 3ª ed.* Mathews C. K., van Holde K. E. y Ahern K. G. (eds). Addison Wesley. 617-625
241. McCord JM y Fridovich I (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte protein (hemocyanin). *J.Biol.Chem.* 244: 6049-6055
242. Meattini F y col. (2007). The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone Chromogenic System. *Clin. Chem.* 1978; 24 (12): 2161-2165
243. Miguel-Carrasco JL, Mate A, Monserrat MT, Arias JL, Aramburu O, y Vazquez CM (2008). The Role of Inflammatory Markers in the

Cardioprotective Effect of L-Carnitine in L-NAME-Induced Hypertension. *Am.J.Hypertens.* 18 (8): 533-540

244. Millan-Crow LA, Crow JP, y Thompson JA (1998). Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry.* 37: 1613-1622
245. Miranda HR, Castro GP, Verdejo PH, Chiong M, az-Araya G, Mellado R, Rojas D, Concepcion R, y Lavandera S (2007). [Oxidative stress and inflammation in heart failure: mechanisms of damage and therapeutic alternatives]. *Rev.Med.Chil.* 135: 1056-1063
246. Mister M, Noris M, Szymczuk J, Azzollini N, Aiello S, Abbate M, Trochimowicz L, Gagliardini E, Arduini A, Perico N, y Remuzzi G (2002). Propionyl-L-carnitine prevents renal function deterioration due to ischemia/reperfusion. *Kidney Int.* 61: 1064-1078
247. Molavi B y Mehta JL (2004). Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. *Curr.Opin.Cardiol.* 19: 488-493
248. Moretti S, Famularo G, Marcellini S, Boschini A, Santini G, Trinchieri V, Lucci L, Alesse E, y De SC (2002). L-carnitine reduces lymphocyte apoptosis and oxidant stress in HIV-1-infected subjects treated with zidovudine and didanosine. *Antioxid.Redox.Signal.* 4: 391-403
249. Muller M, Schindler E, Kwapisz M, Klemm S, Akinturk H, Heidt M, y Hempelmann G (2000). Effect of intraoperative angiotensin-converting enzyme inhibition by quinaprilat on hypertension after coronary artery surgery. *Br.J.Anaesth.* 84: 396-398
250. Murdoch CE, Zhang M, Cave AC, y Shah AM (2006). NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc.Res.* 71: 208-215
251. Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, y Bernstein KE (1991). Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature.* 351: 233-236

252. Nadel S, Newport MJ, Booy R, y Levin M (1996). Variation in the tumor necrosis factor-alpha gene promoter region may be associated with death from meningococcal disease. *J.Infect.Dis.* 174: 878-880
253. Naito H.K. Cholesterol. Kaplan A et al. *Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton* 1984; 1194-11206 and 437
254. Nathan C (2003). Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J.Clin.Invest.* 111: 769-778
255. Negro R (2008). Endothelial effects of antihypertensive treatment: focus on irbesartan. *Vasc.Health Risk Manag.* 4: 89-101
256. Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Richardt G, Holzapfel H, Jochum M, y Schomig A (1995). Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation.* 92: 748-755
257. Nezu J, Tamai I, Oku A, Ohashi R, Yabuuchi H, Hashimoto N, Nikaido H, Sai Y, Koizumi A, Shoji Y, Takada G, Matsuishi T, Yoshino M, Kato H, Ohura T, Tsujimoto G, Hayakawa J, Shimane M, y Tsuji A (1999). Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat.Genet.* 21: 91-94
258. Nguyen G (2006). Increased cyclooxygenase-2, hyperfiltration, glomerulosclerosis, and diabetic nephropathy: put the blame on the (pro)renin receptor? *Kidney Int.* 70: 618-620
259. Nguyen G (2006). Renin/prorenin receptors. *Kidney Int.* 69: 1503-1506
260. Nishida S (2005). Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus. *Endocrine.* 27: 131-136
261. Nyby MD, Abedi K, Smutko V, Eslami P, y Tuck ML (2007). Vascular Angiotensin type 1 receptor expression is associated with vascular dysfunction, oxidative stress and inflammation in fructose-fed rats. *Hypertens.Res.* 30: 451-457

262. **O**'Brien E, Barton J, Nussberger J, Mulcahy D, Jensen C, Dicker P, y Stanton A (2007). Aliskiren reduces blood pressure and suppresses plasma renin activity in combination with a thiazide diuretic, an angiotensin-converting enzyme inhibitor, or an angiotensin receptor blocker. *Hypertension*. 49: 276-284
263. Onem G, Aral E, Enli Y, Oguz EO, Coskun E, Aybek H, Ozcan AV, Sacar M, Bir LS, Baltarli A, y Baycu C (2006). Neuroprotective effects of L-carnitine and vitamin E alone or in combination against ischemia-reperfusion injury in rats. *J.Surg.Res.* 131: 124-130
264. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, y Sasayama S (1998). Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation*. 98: 149-156
265. Orlandi A, Francesconi A, Marcellini M, Di LA, y Spagnoli LG (2007). Propionyl-L-carnitine reduces proliferation and potentiates Bax-related apoptosis of aortic intimal smooth muscle cells by modulating nuclear factor-kappaB activity. *J.Biol.Chem.* 282: 4932-4942
266. Oudot A, Vergely C, Ecarnot-Laubriet A, y Rochette L (2003). Angiotensin II activates NADPH oxidase in isolated rat hearts subjected to ischaemia-reperfusion. *Eur.J.Pharmacol.* 462: 145-154
267. Ozaki M, Haga S, Zhang HQ, Irani K, y Suzuki S (2003). Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress in HGF-stimulated antiapoptotic signaling: role of PI3-K and Akt kinase upon rac1. *Cell Death.Differ.* 10: 508-515
268. **P**acher P, Schulz R, Liaudet L, y Szabo C (2005). Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. *Trends Pharmacol.Sci.* 26: 302-310
269. Palmer RM, Ferrige AG, y Moncada S (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 327: 524-526

270. Parang P, Singh B, y Arora R (2005). Metabolic modulators for chronic cardiac ischemia. *J.Cardiovasc.Pharmacol.Ther.* 10: 217-223
271. Paravicini TM y Touyz RM (2008). NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 31 Suppl 2:S170-80.: S170-S180
272. Parik T, Allikmets K, Teesalu R, y Zilmer M (1996). Evidence for oxidative stress in essential hypertension: perspective for antioxidant therapy. *J.Cardiovasc.Risk.* 3: 49-54
273. Parodi O, De MR, y Roubina E (2007). Redox state, oxidative stress and endothelial dysfunction in heart failure: the puzzle of nitrate-thiol interaction. *J.Cardiovasc.Med.(Hagerstown).* 8: 765-774
274. Pastoris O, Aquilani R, Foppa P, Bovio G, Segagni S, Baiardi P, Catapano M, Maccario M, Salvadeo A, y Dossena M (1997). Altered muscle energy metabolism in post-absorptive patients with chronic renal failure. *Scand.J.Urol.Nephrol.* 31: 281-287
275. Paul M, Poyan MA, y Kreutz R (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 86: 747-803
276. Paul M, Poyan MA, y Kreutz R (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 86: 747-803
277. Paulson DJ (1998). Carnitine deficiency-induced cardiomyopathy. *Mol.Cell Biochem.* 180: 33-41
278. Paulson DJ y Shug AL (1984). Inhibition of the adenine nucleotide translocator by matrix-localized palmitoyl-CoA in rat heart mitochondria. *Biochim.Biophys.Acta.* 766: 70-76
279. Paulus WJ (2000). Cytokines and heart failure. *Heart Fail.Monit.* 1: 50-56
280. Pauly DF y Pepine CJ (2003). The role of carnitine in myocardial dysfunction. *Am.J.Kidney Dis.* 41: S35-S43

281. Pauly DF y Pepine CJ (2004). Ischemic heart disease: metabolic approaches to management. *Clin.Cardiol.* 27: 439-441
282. Peeters AC, Netea MG, Janssen MC, Kullberg BJ, Van der Meer JW, y Thien T (2001). Pro-inflammatory cytokines in patients with essential hypertension. *Eur.J.Clin.Invest.* 31: 31-36
283. Pérez Arellano JL (2005). Manual de Patología general. Ed. Masson. 6ª edición. Capítulo 10
284. Pertosa G, Grandaliano G, Simone S, Soccio M, Schena FP (2005). Inflammation and carnitine in hemodialysis patients. *J. Ren. Nutr.* 15(1): 8-12.
285. Pieper GM y Murray WJ (1987). In vivo and in vitro intervention with L-carnitine prevents abnormal energy metabolism in isolated diabetic rat heart: chemical and phosphorus-31 NMR evidence. *Biochem.Med.Metab Biol.* 38: 111-120
286. Pignatelli P, Lenti L, Sanguigni V, Frati G, Simeoni I, Gazzaniga PP, Pulcinelli FM, y Violi F (2003). Carnitine inhibits arachidonic acid turnover, platelet function, and oxidative stress. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol.* 284: H41-H48
287. Pilz B, Shagdarsuren E, Wellner M, Fiebeler A, Dechend R, Gratz P, Meiners S, Feldman DL, Webb RL, Garrelds IM, Jan Danser AH, Luft FC, y Muller DN (2005). Aliskiren, a human renin inhibitor, ameliorates cardiac and renal damage in double-transgenic rats. *Hypertension.* 46: 569-576
288. Pipinos II, Judge AR, Selsby JT, Zhu Z, Swanson SA, Nella AA, y Dodd SL (2007). The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: part 1. Functional and histomorphological changes and evidence for mitochondrial dysfunction. *Vasc.Endovascular.Surg.* 41: 481-489
289. Pollock DM, Polakowski JS, Divish BJ, y Opgenorth TJ (1993). Angiotensin blockade reverses hypertension during long-term nitric oxide synthase inhibition. *Hypertension.* 21: 660-666

290. Poorabbas A, Fallah F, Bagdadchi J, Mahdavi R, Aliasgarzadeh A, Asadi Y, Koushavar H, y Vahed JM (2007). Determination of free L-carnitine levels in type II diabetic women with and without complications. *Eur.J.Clin.Nutr.* 61: 892-895
291. Puddu P, Puddu GM, Cravero E, Rosati M, y Muscari A (2008). The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. *Blood Press.* 17: 70-77
292. Rajasekar P, Palanisamy N, y Anuradha CV (2007). Increase in nitric oxide and reductions in blood pressure, protein kinase C beta II and oxidative stress by L-carnitine: a study in the fructose-fed hypertensive rat. *Clin.Exp.Hypertens.* 29: 517-530
293. Rajasekar P, Viswanathan P, y Anuradha CV (2008). Renoprotective action of L-carnitine in fructose-induced metabolic syndrome. *Diabetes Obes.Metab.* 10: 171-180
294. Rauchova H, Dobesova Z, Drahota Z, Zicha J, y Kunes J (1998). The effect of chronic L-carnitine treatment on blood pressure and plasma lipids in spontaneously hypertensive rats. *Eur.J.Pharmacol.* 342: 235-239
295. Rebouche CJ (2004). Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1033:30-41.: 30-41
296. Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M, y Stampfer MJ (1999). Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *BMJ.* 319: 1523-1528
297. Rizos I (2000). Three-year survival of patients with heart failure caused by dilated cardiomyopathy and L-carnitine administration. *Am.Heart J.* 139: S120-S123
298. Rodriguez-Iturbe B, Zhan CD, Quiroz Y, Sindhu RK, y Vaziri ND (2003). Antioxidant-rich diet relieves hypertension and reduces renal immune infiltration in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 41: 341-346

299. Rodriguez-Iturbe B, Quiroz Y, Ferrebuz A, Parra G, y Vaziri ND (2004). Evolution of renal interstitial inflammation and NF-kappaB activation in spontaneously hypertensive rats. *Am.J.Nephrol.* 24: 587-594
300. Roepstorff C, Halberg N, Hillig T, Saha AK, Ruderman NB, Wojtaszewski JF, Richter EA, y Kiens B (2005). Malonyl-CoA and carnitine in regulation of fat oxidation in human skeletal muscle during exercise. *Am.J.Physiol. Endocrinol.Metab.* 288: E133-E142
301. Rogg H, de GM, Graedel E, Stulz P, Burkart F, Eberhard M, y Erne P (1996). Angiotensin II-receptor subtypes in human atria and evidence for alterations in patients with cardiac dysfunction. *Eur.Heart J.* 17: 1112-1120
302. Roig E, Orus J, Pare C, Azqueta M, Filella X, Perez-Villa F, Heras M, y Sanz G (1998). Serum interleukin-6 in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am.J.Cardiol.* 82: 688-90, A8
303. Roszkopf D, Schurks M, Rimbach C, y Schafers R (2007). Genetics of arterial hypertension and hypotension. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 374: 429-469
304. Rudman D, Sewell CW, y Ansley JD (1977). Deficiency of carnitine in cachectic cirrhotic patients. *J.Clin.Invest.* 60: 716-723
305. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Konig S, Wittig B, y Egido J (2000). Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. *Circ.Res.* 86: 1266-1272
306. Ryter SW y Tyrrell RM (1998). Singlet molecular oxygen ((1)O2): a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic.Biol.Med.* 24: 1520-1534
307. Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA, Harsha D, Obarzanek E, Conlin PR, Miller ER, III, Simons-Morton DG, Karanja N, y Lin PH (2001). Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group. *N.Engl.J.Med.* 344: 3-10

308. Sadoshima J y Izumo S (1993). Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ.Res.* 73: 413-423
309. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, y Izumo S (1993). Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell.* 75: 977-984
310. Sainz J, Wangenstein R, Rodriguez G, I, Moreno JM, Chamorro V, Osuna A, Bueno P, y Vargas F (2005). Antioxidant enzymes and effects of tempol on the development of hypertension induced by nitric oxide inhibition. *Am.J.Hypertens.* 18: 871-877
311. Saito Y y Berk BC (2001). Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J.Mol.Cell Cardiol.* 33: 3-7
312. San JG, Moreno MU, Olivan S, Beloqui O, Fortuno A, Diez J, y Zalba G (2004). Functional effect of the p22phox -930A/G polymorphism on p22phox expression and NADPH oxidase activity in hypertension. *Hypertension.* 44: 163-169
313. Sandvik L, Erikssen J, Thaulow E, Erikssen G, Mundal R, y Rodahl K (1993). Physical fitness as a predictor of mortality among healthy, middle-aged Norwegian men. *N.Engl.J.Med.* 328: 533-537
314. Sanz-Rosa D, Cediel E, de las HN, Miana M, Balfagon G, Lahera V, y Cachofeiro V (2005). Participation of aldosterone in the vascular inflammatory response of spontaneously hypertensive rats: role of the NFkappaB/IkappaB system. *J.Hypertens.* 23: 1167-1172
315. Satoh J, Fujiwara F, y Ishii M (2005). [TNF-alpha gene polymorphism, insulin resistance and type 2 diabetes in humans]. *Nippon Rinsho.* 63 Suppl 2:189-92.
316. Saudubray JM, Martin D, de LP, Touati G, Poggi-Travert F, Bonnet D, Jouvet P, Boutron M, Slama A, Vianey-Saban C, Bonnefont JP, Rabier D, Kamoun P, y Brivet M (1999). Recognition and management of fatty acid oxidation defects: a series of 107 patients. *J.Inherit.Metab Dis.* 22: 488-502

- 317.Savica V, Calvani M, Benatti P, Santoro D, Monardo P, Peluso G, y Bellinghieri G (2004). Carnitine system in uremic patients: molecular and clinical aspects. *Semin.Nephrol.* 24: 464-468
- 318.Savoia C y Schiffrin EL (2006). Inflammation in hypertension. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 15: 152-158
- 319.Sawa Y, Ichikawa H, Kagisaki K, Ohata T, y Matsuda H (1998). Interleukin-6 derived from hypoxic myocytes promotes neutrophil-mediated reperfusion injury in myocardium. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* 116: 511-517
- 320.Sayed-Ahmed MM, Shaarawy S, Shouman SA, y Osman AM (1999). Reversal of doxorubicin-induced cardiac metabolic damage by L-carnitine. *Pharmacol.Res.* 39: 289-295
- 321.Sayed-Ahmed MM, Khattab MM, Gad MZ, y Mostafa N (2001). L-carnitine prevents the progression of atherosclerotic lesions in hypercholesterolaemic rabbits. *Pharmacol.Res.* 44: 235-242
- 322.Scaglia F, Wang Y, Singh RH, Dembure PP, Pasquali M, Fernhoff PM, y Longo N (1998). Defective urinary carnitine transport in heterozygotes for primary carnitine deficiency. *Genet.Med.* 1: 34-39
- 323.Scaglia F, Wang Y, y Longo N (1999). Functional characterization of the carnitine transporter defective in primary carnitine deficiency. *Arch.Biochem.Biophys.* 364: 99-106
- 324.Schmieder RE (2005). The role of non-haemodynamic factors of the genesis of LVH. *Nephrol.Dial.Transplant.* 20: 2610-2612
- 325.Schmieder RE, Schrader J, Zidek W, Tebbe U, Bramlage P, Paar WD, y Bohm M (2006). [Subclinical albuminuria, microalbuminuria and proteinuria-accepted cardiovascular risk markers?]. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 131: 2665-2671
- 326.Schofield RS y Hill JA (2001). Role of metabolically active drugs in the management of ischemic heart disease. *Am.J.Cardiovasc.Drugs.* 1: 23-35

327. Schonekess BO, Allard MF, y Lopaschuk GD (1995). Propionyl L-carnitine improvement of hypertrophied rat heart function is associated with an increase in cardiac efficiency. *Eur.J.Pharmacol.* 286: 155-166
328. Schorb W, Booz GW, Dostal DE, Conrad KM, Chang KC, y Baker KM (1993). Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Circ.Res.* 72: 1245-1254
329. Schreiber B (2005). Levocarnitine and dialysis: a review. *Nutr.Clin.Pract.* 20: 218-243
330. Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, y Lorell BH (1990). Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J.Clin.Invest.* 86: 1913-1920
331. Scott MD (2006). H₂O₂ injury in beta thalassemic erythrocytes: protective role of catalase and the prooxidant effects of GSH. *Free Radic.Biol.Med.* 40: 1264-1272
332. Sears C, Olesen J, Rubin D, Finley D, y Maniatis T (1998). NF-kappa B p105 processing via the ubiquitin-proteasome pathway. *J.Biol.Chem.* 273: 1409-1419
333. Seddon M, Looi YH, y Shah AM (2007). Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart.* 93: 903-907
334. Selimoglu MA y Yagci RV (2004). Plasma and liver carnitine levels of children with chronic hepatitis B. *J.Clin.Gastroenterol.* 38: 130-133
335. Sener G, Paskaloglu K, Satiroglu H, Alican I, Kacmaz A, y Sakarcan A (2004). L-carnitine ameliorates oxidative damage due to chronic renal failure in rats. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 43: 698-705
336. Sethi R, Wang X, Ferrari R, y Dhalla NS (2004). Improvement of cardiac function and beta-adrenergic signal transduction by propionyl L-carnitine in congestive heart failure due to myocardial infarction. *Coron.Artery Dis.* 15: 65-71

337. Shinyashiki M, Pan CJ, Lopez BE, y Fukuto JM (2004). Inhibition of the yeast metal reductase heme protein *fre1* by nitric oxide (NO): a model for inhibition of NADPH oxidase by NO. *Free Radic. Biol. Med.* 37: 713-723
338. Shores NJ y Keeffe EB (2008). Is oral L-acyl-carnitine an effective therapy for hepatic encephalopathy? Review of the literature. *Dig. Dis. Sci.* 53: 2330-2333
339. Shug AL y Subramanian R (1987). Modulation of adenine nucleotide translocase activity during myocardial ischemia. *Z. Kardiol.* 76 Suppl 5:26-33.
340. Sies H (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27: 916-921
341. Simko F, Matuskova J, Luptak I, Pincikova T, Krajcirovicova K, Stvrtina S, Pomsar J, Pelouch V, Paulis L, y Pechanova O (2007). Spironolactone differently influences remodeling of the left ventricle and aorta in L-NAME-induced hypertension. *Physiol Res.* 56 Suppl 2:S25-32. Epub; %2007 Sep 5.: S25-S32
342. Sirker A, Zhang M, Murdoch C, y Shah AM (2007). Involvement of NADPH oxidases in cardiac remodelling and heart failure. *Am. J. Nephrol.* 27: 649-660
343. Sitta A, Barschak AG, Deon M, de Mari JF, Barden AT, Vanzin CS, Biancini GB, Schwartz IV, Wajner M, y Vargas CR (2008). L: -Carnitine Blood Levels and Oxidative Stress in Treated Phenylketonuric Patients. *Cell Mol. Neurobiol.* 29(2): 211-218
344. Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer KM, MacLellan WR, DeMayo FJ, Spinale FG, y Mann DL (2001). Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation.* 104: 826-831
345. Skultetyova D, Filipova S, Riecansky I, y Skultety J (2007). The role of angiotensin type 1 receptor in inflammation and endothelial dysfunction. *Recent Patents. Cardiovasc. Drug Discov.* 2: 23-27

346. Solfrizzi V, Capurso C, Colacicco AM, D'Introno A, Fontana C, Capurso SA, Torres F, Gadaleta AM, Koverech A, Capurso A, y Panza F (2006). Efficacy and tolerability of combined treatment with L-carnitine and simvastatin in lowering lipoprotein(a) serum levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 188: 455-461
347. Sowers JR (2002). Hypertension, angiotensin II, and oxidative stress. *N.Engl.J.Med.* 346: 1999-2001
348. Spiekerkoetter U, Huener G, Baykal T, Demirkol M, Duran M, Wanders R, Nezu J, y Mayatepek E (2003). Silent and symptomatic primary carnitine deficiency within the same family due to identical mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2. *J.Inherit.Metab Dis.* 26: 613-615
349. Staessen JA, Wang J, Bianchi G, y Birkenhager WH (2003). Essential hypertension. *Lancet*. 361: 1629-1641
350. Stamler J, Stamler R, y Neaton JD (1993). Blood pressure, systolic and diastolic, and cardiovascular risks. US population data. *Arch.Intern.Med.* 153: 598-615
351. Steinberg D y Witztum JL (2002). Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation*. 105: 2107-2111
352. Stephens FB, Constantin-Teodosiu D, Laithwaite D, Simpson EJ, y Greenhaff PL (2006). An acute increase in skeletal muscle carnitine content alters fuel metabolism in resting human skeletal muscle. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 91: 5013-5018
353. Stephens FB, Constantin-Teodosiu D, y Greenhaff PL (2007). New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J.Physiol.* 581: 431-444
354. Stephens FB, Evans CE, Constantin-Teodosiu D, y Greenhaff PL (2007). Carbohydrate ingestion augments L-carnitine retention in humans. *J.Appl.Physiol.* 102: 1065-1070

355. Strawn WB (2002). [Pathophysiological and clinical implications of AT(1) and AT(2) angiotensin II receptors in metabolic disorders: hypercholesterolaemia and diabetes]. *Drugs. 62 Spec No 1*:31-41.: 31-41
356. Stumpf DA, Parker WD, Jr., y Angelini C (1985). Carnitine deficiency, organic acidemias, and Reye's syndrome. *Neurology. 35*: 1041-1045
357. Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, Kang D, Ikeuchi M, Ide T, Hayashidani S, Shiomi T, Kubota T, Hamasaki N, y Takeshita A (2003). Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation. 107*: 1418-1423
358. Sugishita K, Kinugawa K, Shimizu T, Harada K, Matsui H, Takahashi T, Serizawa T, y Kohmoto O (1999). Cellular basis for the acute inhibitory effects of IL-6 and TNF- alpha on excitation-contraction coupling. *J.Mol.Cell Cardiol. 31*: 1457-1467
359. Sushamakumari S, Jayadeep A, Kumar JS, y Menon VP (1989). Effect of carnitine on malondialdehyde, taurine and glutathione levels in heart of rats subjected to myocardial stress by isoproterenol. *Indian J.Exp.Biol. 27*: 134-137
360. Suzuki K, Murtuza B, Smolenski RT, Sammut IA, Suzuki N, Kaneda Y, y Yacoub MH (2001). Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist provides cardioprotection against ischemia-reperfusion injury associated with reduction in apoptosis. *Circulation. 104*: I308-I313
361. Suzuki Y, Kamikawa T, y Yamazaki N (1981). Effects of L-carnitine on ventricular arrhythmias in dogs with acute myocardial ischemia and a supplement of excess free fatty acids. *Jpn.Circ.J. 45*: 552-559
362. Takemiya K, Koga M, Yamamoto T, y Imaizumi T (2004). Pressure-independent effects of angiotensin II on hypertensive myocardial fibrosis. *Hypertension. 43*: 499-503
363. Takemoto M, Egashira K, Tomita H, Usui M, Okamoto H, Kitabatake A, Shimokawa H, Sueishi K, y Takeshita A (1997). Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor blockade:

effects on cardiovascular remodeling in rats induced by the long-term blockade of nitric oxide synthesis. *Hypertension*. 30: 1621-1627

364. Takemoto M, Egashira K, Usui M, Numaguchi K, Tomita H, Tsutsui H, Shimokawa H, Sueishi K, y Takeshita A (1997). Important role of tissue angiotensin-converting enzyme activity in the pathogenesis of coronary vascular and myocardial structural changes induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *J.Clin.Invest*. 99: 278-287
365. Takimoto E y Kass DA (2007). Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension*. 49: 241-248
366. Tanaka H, Matsumura I, Ezoe S, Satoh Y, Sakamaki T, Albanese C, Machii T, Pestell RG, y Kanakura Y (2002). E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination. *Mol.Cell*. 9: 1017-1029
367. Taniyama Y y Griendling KK (2003). Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 42: 1075-1081
368. Tanphaichitr V y Broquist HP (1973). Role of lysine and -N-trimethyllysine in carnitine biosynthesis. II. Studies in the rat. *J.Biol.Chem*. 248: 2176-2181
369. Tarantini G, Scrutinio D, Bruzzi P, Boni L, Rizzon P, y Iliceto S (2006). Metabolic treatment with L-carnitine in acute anterior ST segment elevation myocardial infarction. A randomized controlled trial. *Cardiology*. 106: 215-223
370. Tastekin N, Aydogdu N, Dokmeci D, Usta U, Birtane M, Erbas H, y Ture M (2007). Protective effects of L-carnitine and alpha-lipoic acid in rats with adjuvant arthritis. *Pharmacol.Res*. 56: 303-310
371. Tein I (2003). Carnitine transport: pathophysiology and metabolism of known molecular defects. *J.Inherit.Metab Dis*. 26: 147-169

372. Tengattini S, Reiter RJ, Tan DX, Terron MP, Rodella LF, y Rezzani R (2008). Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J.Pineal Res.* 44: 16-25
373. Thaik CM, Calderone A, Takahashi N, y Colucci WS (1995). Interleukin-1 beta modulates the growth and phenotype of neonatal rat cardiac myocytes. *J.Clin.Invest.* 96: 1093-1099
374. Thangasamy T, Jeyakumar P, Sittadjody S, Joyee AG, y Chinnakannu P (2008). L- Carnitine mediates protection against DNA damage in lymphocytes of aged rats. *Biogerontology.*
375. Thannickal VJ y Fanburg BL (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.* 279: L1005-L1028
376. Theuer J, Dechend R, Muller DN, Park JK, Fiebeler A, Barta P, Ganten D, Haller H, Dietz R, y Luft FC (2002). Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC.Cardiovasc.Disord.* 2:3.
377. Thielmann M, Dorge H, Martin C, Belosjorow S, Schwanke U, van De SA, Konietzka I, Buchert A, Kruger A, Schulz R, y Heusch G (2002). Myocardial dysfunction with coronary microembolization: signal transduction through a sequence of nitric oxide, tumor necrosis factor-alpha, and sphingosine. *Circ.Res.* 90: 807-813
378. Thomas F, Rudnichi A, Bacri AM, Bean K, Guize L, y Benetos A (2001). Cardiovascular mortality in hypertensive men according to presence of associated risk factors. *Hypertension.* 37: 1256-1261
379. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R, y Mann DL (1995). Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation.* 92: 1487-1493
380. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R, y Mann DL (1995). Expression and functional significance of tumor necrosis factor receptors in human myocardium. *Circulation.* 92: 1487-1493

381. Touyz RM (2004). Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz.J.Med.Biol.Res.* 37: 1263-1273
382. Touyz RM (2004). Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension.* 44: 248-252
383. Touyz RM (2005). Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: role of angiotensin II. *Exp.Physiol.* 90: 449-455
384. Touyz RM (2005). Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid.Redox.Signal.* 7: 1302-1314
385. Touyz RM y Schiffrin EL (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol.Rev.* 52: 639-672
386. Touyz RM y Schiffrin EL (2003). Role of endothelin in human hypertension. *Can.J.Physiol Pharmacol.* 81: 533-541
387. Traenckner EB y Baeuerle PA (1995). Appearance of apparently ubiquitin-conjugated I kappa B-alpha during its phosphorylation-induced degradation in intact cells. *J.Cell Sci.Suppl.* 19:79-84.: 79-84
388. Troyanov S, Hebert MJ, Masse M, Vigneault N, Sirois I, y Madore F (2003). Soluble Fas: a novel predictor of atherosclerosis in dialysis patients. *Am.J.Kidney Dis.* 41: 1043-1051
389. Uchida K (2000). Cellular response to bioactive lipid peroxidation products. *Free Radic.Res.* 33: 731-737
390. Ulker S, McMaster D, McKeown PP, y Bayraktutan U (2003). Impaired activities of antioxidant enzymes elicit endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats despite enhanced vascular nitric oxide generation. *Cardiovasc.Res.* 59: 488-500

391. Valerio LG, Jr. y Petersen DR (1998). Formation of liver microsomal MDA-protein adducts in mice with chronic dietary iron overload. *Toxicol.Lett.* 98: 31-39
392. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, y Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 39: 44-84
393. van Kesteren CA, Danser AH, Derkx FH, Dekkers DH, Lamers JM, Saxena PR, y Schalekamp MA (1997). Mannose 6-phosphate receptor-mediated internalization and activation of prorenin by cardiac cells. *Hypertension.* 30: 1389-1396
394. van Roermund CW, Hetteema EH, van den BM, Tabak HF, y Wanders RJ (1999). Molecular characterization of carnitine-dependent transport of acetyl-CoA from peroxisomes to mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of a plasma membrane carnitine transporter, Agp2p. *EMBO J.* 18: 5843-5852
395. Vaz FM y Wanders RJ (2002). Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem.J.* 361: 417-429
396. Vaziri ND, Bai Y, Ni Z, Quiroz Y, Pandian R, y Rodriguez-Iturbe B (2007). Intra-renal angiotensin II/AT1 receptor, oxidative stress, inflammation, and progressive injury in renal mass reduction. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 323: 85-93
397. Venturini E and Papeschi L (1994). Myoglobinuria due to a deficiency of carnitine palmitoyltransferase II. A clinical case report. *Recenti. Prog. Med.* 85(5):282-3
398. Verdecchia P, Angeli F, Borgioni C, Gattobigio R, de SG, Devereux RB, y Porcellati C (2003). Changes in cardiovascular risk by reduction of left ventricular mass in hypertension: a meta-analysis. *Am.J.Hypertens.* 16: 895-899
399. Verdecchia P, Reboldi G, Gattobigio R, Bentivoglio M, Borgioni C, Angeli F, Carluccio E, Sardone MG, y Porcellati C (2003). Atrial fibrillation in hypertension: predictors and outcome. *Hypertension.* 41: 218-223

400. Vescovo G, Ravara B, Gobbo V, Sandri M, Angelini A, Della BM, Dona M, Peluso G, Calvani M, Mosconi L, y Dalla LL (2002). L-Carnitine: a potential treatment for blocking apoptosis and preventing skeletal muscle myopathy in heart failure. *Am.J.Physiol Cell Physiol.* 283: C802-C810
401. Vesela E, Racek J, Trefil L, Jankovy'ch V, y Pojer M (2001). Effect of L-carnitine supplementation in hemodialysis patients. *Nephron.* 88: 218-223
402. Vicari E y Calogero AE (2001). Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostato-vesiculo-epididymitis. *Hum.Reprod.* 16: 2338-2342
403. Vijg J (2000). Somatic mutations and aging: a re-evaluation. *Mutat.Res.* 447: 117-135
404. Vijg J (2000). The science of aging and the need for a mechanistic approach. *Mech.Ageing Dev.* 114: 1-3
405. Villamil A, Chrysant SG, Calhoun D, Schober B, Hsu H, Matrisciano-Dimichino L, y Zhang J (2007). Renin inhibition with aliskiren provides additive antihypertensive efficacy when used in combination with hydrochlorothiazide. *J.Hypertens.* 25: 217-226
406. Villani RG, Gannon J, Self M, y Rich PA (2000). L-Carnitine supplementation combined with aerobic training does not promote weight loss in moderately obese women. *Int.J.Sport Nutr.Exerc.Metab.* 10: 199-207
407. Villarreal FJ, Bahnson T, y Kim NN (1998). Human cardiac fibroblasts and receptors for angiotensin II and bradykinin: a potential role for bradykinin in the modulation of cardiac extracellular matrix. *Basic Res.Cardiol.* 93 Suppl 3:4-7.: 4-7
408. Virag JI y Murry CE (2003). Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair. *Am.J.Pathol.* 163: 2433-2440
409. Virdis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM, y Schiffrin EL (2002). Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension.* 40: 504-510

410.

411. Virmani A, Gaetani F, y Binienda Z (2005). Effects of metabolic modifiers such as carnitines, coenzyme Q10, and PUFAs against different forms of neurotoxic insults: metabolic inhibitors, MPTP, and methamphetamine. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1053:183-91.: 183-191

412. Ward NC y Croft KD (2006). Hypertension and oxidative stress. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.* 33: 872-876

413. Wassmann S, Wassmann K, y Nickenig G (2004). Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension.* 44: 381-386

414. Whaley-Connell A, Govindarajan G, Habibi J, Hayden MR, Cooper SA, Wei Y, Ma L, Qazi M, Link D, Karuparthi PR, Stump C, Ferrario C, y Sowers JR (2007). Angiotensin II-mediated oxidative stress promotes myocardial tissue remodeling in the transgenic (mRen2) 27 Ren2 rat. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab.* 293: E355-E363

415. Whelton PK, Appel LJ, Espeland MA, Applegate WB, Ettinger WH, Jr., Kostis JB, Kumanyika S, Lacy CR, Johnson KC, Folmar S, y Cutler JA (1998). Sodium reduction and weight loss in the treatment of hypertension in older persons: a randomized controlled trial of nonpharmacologic interventions in the elderly (TONE). TONE Collaborative Research Group. *JAMA.* 279: 839-846

416. Wilson PW, Castelli WP, y Kannel WB (1987). Coronary risk prediction in adults (the Framingham Heart Study). *Am.J.Cardiol.* 59: 91G-94G

417. Wilson DO y Johnson P (2000). Exercise modulates antioxidant enzyme gene expression in rat myocardium and liver. *J.Appl.Physiol.* 88: 1791-1796

418. Winter BK, Fiskum G, y Gallo LL (1995). Effects of L-carnitine on serum triglyceride and cytokine levels in rat models of cachexia and septic shock. *Br.J.Cancer.* 72: 1173-1179

419. Woldegiorgis G, Yousufzai SY, y Shrago E (1982). Studies on the interaction of palmitoyl coenzyme A with the adenine nucleotide translocase. *J.Biol.Chem.* 257: 14783-14787
420. Wolf G y Wenzel UO (2004). Angiotensin II and cell cycle regulation. *Hypertension.* 43: 693-698
421. Xue YZ, Wang LX, Liu HZ, Qi XW, Wang XH, y Ren HZ (2007). L-carnitine as an adjunct therapy to percutaneous coronary intervention for non-ST elevation myocardial infarction. *Cardiovasc.Drugs Ther.* 21: 445-448
422. Yang XP, Samaja M, English E, Benatti P, Tarantola M, Cardace G, Motterlini R, Micheletti R, y Bianchi G (1992). Hemodynamic and metabolic activities of propionyl-L-carnitine in rats with pressure-overload cardiac hypertrophy. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 20: 88-98
423. Yayama K y Okamoto H (2008). Angiotensin II-induced vasodilation via type 2 receptor: role of bradykinin and nitric oxide. *Int.Immunopharmacol.* 8: 312-318
424. Yoon HR, Hong YM, Boriack RL, y Bennett MJ (2003). Effect of L-carnitine supplementation on cardiac carnitine palmitoyltransferase activities and plasma carnitine concentrations in adriamycin-treated rats. *Pediatr.Res.* 53: 788-792
425. Yuan YV, Kitts DD, y Godin DV (1998). Variations in dietary fat and cholesterol intakes modify antioxidant status of SHR and WKY rats. *J.Nutr.* 128: 1620-1630
426. Zalba G, Beaumont FJ, San JG, Fortuno A, Fortuno MA, Etayo JC, y Diez J (2000). Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 35: 1055-1061
427. Zalba G, Beaumont FJ, San JG, Fortuno A, Fortuno MA, y Diez J (2001). Is the balance between nitric oxide and superoxide altered in spontaneously hypertensive rats with endothelial dysfunction? *Nephrol.Dial.Transplant.* 16 Suppl 1:2-5.: 2-5

428. Zalba G, San JG, Moreno MU, Fortuno MA, Fortuno A, Beaumont FJ, y Diez J (2001). Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension*. 38: 1395-1399
429. Zeidan Q, Strauss M, Porras N, y Anselmi G (2002). Differential long-term subcellular responses in heart and liver to adriamycin stress. Exogenous L-carnitine cardiac and hepatic protection. *J.Submicrosc.Cytol.Pathol.* 34: 315-321
430. Zhan CD, Sindhu RK, Pang J, Ehdaie A, y Vaziri ND (2004). Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the spontaneously hypertensive rat kidney: effect of antioxidant-rich diet. *J.Hypertens.* 22: 2025-2033
431. Zhang L, Zalewski A, Liu Y, Mazurek T, Cowan S, Martin JL, Hofmann SM, Vlassara H, y Shi Y (2003). Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries. *Circulation*. 108: 472-478
432. Zhou LZ, Johnson AP, y Rando TA (2001). NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic.Biol.Med.* 31: 1405-1416

