



EFFECTO CARDIOPROTECTOR DE LA L-CARNITINA EN RATAS TRATADAS CON SUNITINIB

Tesis Doctoral

M^a VICTORIA RUIZ ARMENTA

Directores

ALFONSO MATE BARRERO

CARMEN MARÍA VÁZQUEZ CUETO

ÓSCAR ARAMBURU BODAS

Sevilla, 2014

ALFONSO MATE BARRERO, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Sevilla, CARMEN MARÍA VÁZQUEZ CUETO, Catedrática del Departamento de Fisiología de la Universidad de Sevilla y ÓSCAR ARAMBURU BODAS, Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla,

INFORMAN

Que la Tesis titulada *EFECTO CARDIOPROTECTOR DE LA L-CARNITINA EN RATAS TRATADAS CON SUNITINIB*, presentada por la Lda. M^a VICTORIA RUIZ ARMENTA para optar al grado de doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología 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 7 de Enero de 2014.

Fdo.: Dr. Alfonso Mate Barrero

Fdo.: Dra. Carmen M^a Vázquez Cueto

Fdo.: Dr. Óscar Aramburu Bodas

Este trabajo de investigación ha sido subvencionado por las ayudas:

- *FIS PS09/01395 del Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo (Instituto de Salud Carlos III).*
- *PI-0034/2008 de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía.*
- *PI-0060/2012 de la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía.*
- *RED07/0003/2010 de las Redes Temáticas de Investigación Cooperativa del Instituto de Salud Carlos III (RETICS).*

Durante su realización la autora ha disfrutado de contratos de apoyo de personal de investigación subvencionados por la Junta de Andalucía (PI-0060/2012), por la Fundación Pública Andaluza para la Gestión de Investigación en Salud de Sevilla (FISEVI). Unidad de Investigación. Hospital Universitario Virgen Macarena (RED07/0003/2010) y por EGMASA (Empresa de Gestión Medioambiental, SA) (0302/0180).

ÍNDICE

ABREVIATURAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
INTRODUCCIÓN	1
1. SUNITINIB	3
1.1. Indicaciones terapéuticas	3
1.2. Propiedades farmacocinéticas	3
1.3. Mecanismo de acción.....	4
1.4. Efectos adversos	6
1.5. Posibles mecanismos de toxicidad cardiovascular del sunitinib.....	8
1.5.1. HTA inducida por sunitinib.....	8
1.5.2. Cardiotoxicidad del sunitinib	9
2. ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN	11
2.1. Daño oxidativo	11
2.2. Mecanismos de defensa antioxidante	14
2.3. Producción de las ERO en el sistema cardiovascular. Relevancia en la fisiopatología del daño cardíaco asociado a la HTA	14
2.4. Inflamación en la fisiopatología del daño cardíaco asociado a la HTA	20
3. FIBROSIS	22
3.1. Matriz extracelular	22
3.2. Fibrosis miocárdica en la HTA	22
3.2.1. Modificaciones de los cardiomiocitos.....	23
3.2.2. Modificaciones del intersticio	24
3.2.3. Activación de fibroblastos.....	24
3.3. Factor de crecimiento transformante β tipo I (TGF- β 1).....	25
4. L-CARNITINA	28
4.1. Biosíntesis y metabolismo.....	28
4.2. Funciones fisiológicas.....	29
4.3. Deficiencias	29
4.4. Aplicaciones clínicas.....	30

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	33
1. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO	35
2. OBJETIVOS.....	35
2.1. Objetivo general.....	35
2.2. Objetivos específicos.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y TRATAMIENTOS.....	39
2. PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS	40
3. CONTROL DE LA PRESIÓN ARTERIAL	43
4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE ESTUDIO	44
5. ANÁLISIS EN ERITROCITOS.....	44
5.1. Determinación de hemoglobina.....	44
5.2. Determinación de la actividad glutatión peroxidasa (GPx).....	45
5.3. Determinación de la actividad glutatión reductasa (GR)	47
5.4. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD).....	49
6. ANÁLISIS EN HOMOGENEIZADOS DE CORAZÓN Y ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA.....	51
6.1. Homogeneización del corazón	51
6.2. Determinación de la concentración de proteínas.....	52
6.3. Determinación de la actividad GPx	52
6.4. Determinación de la actividad GR.....	52
6.5. Determinación de la actividad SOD.....	53
6.6. Determinación de la relación GSH/GSSG	53
6.7. Determinación de la peroxidación lipídica.....	55
6.8. Determinación de la cantidad de NO	57
6.9. Estudios de expresión génica	58
6.9.1. Extracción de ARN total	58
6.9.2. Retrotranscripción	60
6.9.3. PCR a tiempo real.....	61
6.10. Estudios de expresión proteica	64
6.10.1. Fundamento del Western blotting.....	64
6.10.2. Preparación de las muestras.....	65
6.10.3. Electroforesis	65
6.10.4. Transferencia	66

6.10.5. Inmunodetección	67
7. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS	68
7.1. Procesado de los tejidos	69
7.1.1. Fijación	69
7.1.2. Deshidratación	69
7.1.3. Inclusión en parafina y formación de bloques.....	69
7.2. Tinción de Masson-Goldner (Tricrómico de Masson)	71
7.3. Cuantificación de colágeno. Tinción de Rojo Sirio	73
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74
RESULTADOS.....	75
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANIMALES	77
1.1. Peso corporal y peso/índice cardiacos.....	77
1.2. Presión sanguínea	77
2. ESTUDIOS EN SANGRE PERIFÉRICA.....	78
2.1. Actividad de enzimas antioxidantes en eritrocitos.....	78
3. ESTUDIOS EN CORAZÓN	79
3.1. Actividad de enzimas antioxidantes.....	79
3.2. Expresión génica y proteica de enzimas antioxidantes	80
3.3. Relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG).....	82
3.4. Grado de peroxidación lipídica	83
3.5. Grado de nitrosilación de proteínas.....	83
3.6. Niveles de óxido nítrico.....	84
3.7. Expresión génica y proteica, y grado de fosforilación de eNOS.....	85
3.8. Expresión génica de iNOS.....	86
3.9. Expresión génica y proteica de Nox2	87
3.10. Expresión génica de citoquinas inflamatorias.....	88
3.11. Estudio morfométrico del grado de fibrosis cardiaca	89
3.12. Expresión génica de colágeno fibrilar tipo I	91
3.13. Expresión génica de factores profibróticos.....	92
3.14. Expresión génica de ET-1	93
3.15. Expresión génica de NF-κB.....	93
3.16. Expresión génica de PPAR-γ	94

DISCUSIÓN	95
1. ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE SUNITINIB EN RATAS: EFECTOS ADVERSOS ASOCIADOS ..	97
2. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE L-CARNITINA EN RATAS TRATADAS CON SUNITINIB	102
CONCLUSIONES	109
BIBLIOGRAFÍA	113

ABREVIATURAS

·O₂⁻	radical superóxido
·OH	radical hidroxilo
·OONO⁻	anión peroxinitrito
ADP	adenosín difosfato
AMPK	kinasa activada por monofosfato de adenosina
Ang II	angiotensina II
AP-1	proteína activadora 1
ATB	ácido tiobarbitúrico
ATP	adenosín trifosfato
BH₄	tetrahidrobiopterina
BHT	butilhidroxitolueno
BSA	albúmina de suero bovino
CAT	catalasa
CCR	carcinoma de células renales
cKIT	receptor del factor de células madre
Col	colágeno
COX	ciclooxigenasa
CSF-1R	receptor de los factores estimulantes de colonias tipo 1
CTGF	factor de crecimiento de tejido conectivo
DEPC	dietilpirocarbonato
DTNB	ácido 5,5'-ditiomis-2-nitrobenzoico
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	receptor de factor de crecimiento epidérmico
EMT	transición epitelial-mesenquimal
EndMT	transición endotelial-mesenquimal
eNOS	óxido nítrico sintasa endotelial
ERO	especies reactivas del oxígeno
ET-1	endotelina-1
FAD	flavín adenín dinucleótido

FC	frecuencia cardiaca
FEVI	fracción de eyección del ventrículo izquierdo
FGF	factor de crecimiento fibroblástico
FLT3	receptor tirosina kinasa-3 tipo fms
G6P	glucosa-6-fosfato
G6PDH	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
GIST	tumores del estroma gastrointestinal
GPx	glutación peroxidasa
GR	glutación reductasa
GSH	glutación reducido
GSSG	glutación oxidado
H₂O₂	peróxido de hidrógeno
HIF-1	factor inducible por hipoxia 1
HTA	hipertensión arterial
ICC	insuficiencia cardiaca congestiva
IGFR	receptor del factor de crecimiento sensible a insulina
IL-10	interleuquina-10
IL-1β	interleuquina-1 β
IL-6	interleuquina-6
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
ITK	inhibidor de la tirosina kinasa
LAP	proteína asociada de latencia
LC	L-carnitina
L-NAME	NG-nitro-L-arginina metil éster
LOX-1	enzima lisil oxidasa
LPS	lipopolisacárido
LTBP$\frac{1}{2}$	proteína de unión al TGF- β latente
MAPK	proteína kinasa activada por mitógeno
MDA	malondialdehído

MEC	matriz extracelular
MMP	metaloproteinasa de la matriz
MPA	ácido metafosfórico
NADP⁺	nicotinamín adenín dinucleótido fosfato
NADPH	nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido
NF-κB	factor de activación nuclear κB
nNOS	óxido nítrico sintasa neuronal
NO	óxido nítrico
NO₂⁻	nitrito
NO₃⁻	nitrato
NOS	óxido nítrico sintasa
NT	nitrotirosina
O₂	oxígeno molecular
OCTN	<i>Organic Cation Transporter Novel</i>
PCR	proteína C reactiva
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR	receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
pNET	tumores neuroendocrinos pancreáticos
PPAR	receptor activado por el proliferador de peroxisomas
RET	receptor del factor neurotrófico derivado de células gliales
RTK	receptor tirosina kinasa
SDS	dodecil sulfato de sodio
SHR	<i>spontaneously hypertensive rats</i> (ratas genéticamente hipertensas)
α-SMA	alfa-actina de músculo liso
Smad	<i>small mothers against decapentaplegic</i>
SOD	superóxido dismutasa
TGF-β₁	factor de crecimiento transformante β tipo I
TIMP	inhibidores tisulares de las metaloproteinasas
TMP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
TNF- α	factor de necrosis tumoral-α

Tyr	residuo de tirosina
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	receptor del factor de crecimiento endotelial vascular
VHL	<i>von Hippel-Lindau</i>
VI	ventrículo izquierdo
VSMC	células de la musculatura lisa vascular

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del L-malato de sunitinib	3
Figura 2. Activación de un RTK (A) Mecanismo de acción de un ITK (B).....	5
Figura 3. Mecanismo de acción del sunitinib en el CCR.....	6
Figura 4. Esquema de los posibles mecanismos de toxicidad cardiovascular del sunitinib.....	11
Figura 5. Metabolismo de las especies reactivas del oxígeno	12
Figura 6. Estructura y activación de la NADPH oxidasa fagocítica	16
Figura 7. Mecanismos moleculares por los cuales las ERO producen daño cardíaco.....	19
Figura 8. Activación y mecanismo de acción del TGF- β 1	26
Figura 9. Estructura química de la L-carnitina.....	28
Figura 10. Instrumental utilizado para la medición de la presión sanguínea en los cuatro grupos experimentales de ratas.....	43
Figura 11. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real.....	62
Figura 12. Equipo necesario para la realización de la técnica de <i>Western blotting</i>	65
Figura 13. Esquema representativo del procesado de los tejidos	71
Figura 14. Presión arterial sistólica (A), presión arterial diastólica (B) y frecuencia cardíaca (C), al final del periodo de tratamiento	78
Figura 15. Actividad de las enzimas glutatión peroxidasa, GPx (A), glutatión reductasa, GR (B) y superóxido dismutasa, SOD (C) en eritrocitos	79
Figura 16. Actividad de las enzimas glutatión peroxidasa, GPx (A), glutatión reductasa, GR (B) y superóxido dismutasa, SOD (C) en homogeneizados de corazón	80
Figura 17. Expresión génica de las enzimas glutatión peroxidasa, GPx (A), glutatión reductasa, GR (B) y superóxido dismutasa, SOD (C) en corazón	81
Figura 18. Expresión proteica de las enzimas glutatión peroxidasa, GPx (A), glutatión reductasa, GR (B) y superóxido dismutasa, SOD (C) en homogeneizados de corazón	82
Figura 19. Determinación de la relación GSH/GSSG en homogeneizados de corazón	83
Figura 20. Peroxidación lipídica en homogeneizados de corazón	83
Figura 21. Expresión proteica de nitrotirosina en homogeneizados de corazón	84
Figura 22. Concentración de NO en homogeneizados de corazón	84
Figura 23. Expresión génica de la enzima eNOS en corazón.....	85
Figura 24. Grado de fosforilación de la enzima eNOS en homogeneizados de corazón	86
Figura 25. Expresión génica de la enzima iNOS en corazón.....	86

Figura 26. Expresión génica de la subunidad Nox2 de la enzima NADPH oxidasa en corazón...	87
Figura 27. Expresión proteica de la subunidad Nox2 de la enzima NADPH oxidasa en homogeneizados de corazón	88
Figura 28. Expresión génica de la citoquina IL-1 β (A), IL-6 (B) e IL-10 (C) en corazón	89
Figura 29. Estudio de la fibrosis en muestras de corazón teñidas con tricrómico de Masson ...	90
Figura 30. Estudio morfométrico de la fibrosis intersticial cardiaca.....	91
Figura 31. Expresión génica de colágeno tipo I en corazón	92
Figura 32. Expresión génica de TGF- β 1 (A) y CTGF (B) en corazón	92
Figura 33. Expresión génica de la ET-1 en corazón	93
Figura 34. Expresión génica de NF- κ B en corazón	94
Figura 35. Expresión génica de PPAR- γ en corazón	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Distribución de la NADPH oxidasa	17
Tabla II. Reactivos necesarios para la realización de la PCR a tiempo real	62
Tabla III. Secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados	63
Tabla IV. Programa utilizado en el <i>Light Cycler® 480 Detection System</i> para la realización de la PCR a tiempo real	64
Tabla V. Condiciones para la Inmunodetección de cada anticuerpo	68
Tabla VI. Peso corporal inicial y final de los animales, y peso del corazón e índice cardiaco	77

Introducción

1. SUNITINIB

El sunitinib (fármaco comercializado en forma de L-malato de sunitinib; figura 1) se denomina, atendiendo a su fórmula química, como la sal (1:1) del ácido 2(S)-hidroxibutanodioico (ácido L-málico) con la N-[2-(dietilamino)etil]-5-[(Z)-(5-fluoro-1,2-dihidro-2-oxo-3H-indol-3-iliden)metil]-2,4-dimetil-1H-pirrol-3-carboxamida. Como se describe a continuación, esta sustancia se emplea actualmente como agente antineoplásico.¹

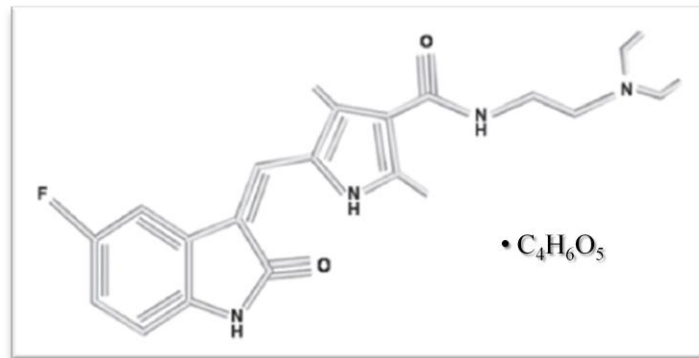


Figura 1. Estructura química del L-malato de sunitinib

1.1. Indicaciones terapéuticas

El sunitinib es un fármaco administrado por vía oral e indicado actualmente para el tratamiento del carcinoma de células renales (CCR) avanzado o metastásico,² el tratamiento de los tumores del estroma gastrointestinal (GIST) como alternativa al imatinib, tras resistencia o intolerancia al mismo,³ y el tratamiento de tumores neuroendocrinos pancreáticos (pNET) bien diferenciados, no resecables, localmente avanzados o metastásicos y con progresión de la enfermedad.⁴

De manera adicional, la utilidad de este compuesto está siendo evaluada en otros tipos de tumores sólidos, incluyendo tumores de pulmón, de mama, colorrectales y de próstata,⁵⁻⁹ aunque de momento el sunitinib no está autorizado para el tratamiento de estos tumores.

1.2. Propiedades farmacocinéticas

El sunitinib se absorbe fácilmente en el tracto digestivo, con una buena biodisponibilidad oral y una cinética lineal a dosis clínicamente relevantes. Las concentraciones plasmáticas máximas (Cmax) se observan generalmente entre las 6 y 12 horas (Tmax) después de la administración oral. Se metaboliza principalmente a través del citocromo P450 (CYP3A4), por lo que hay que tener especial precaución cuando se administra con otros fármacos

inhibidores o inductores de esta enzima. Tiene una vida media elevada, lo que permite que su administración sea de una sola dosis diaria. La principal vía de eliminación es a través de las heces.¹⁰

1.3. Mecanismo de acción

El sunitinib inhibe las vías de señalización intracelular por unión a múltiples receptores tirosina kinasa (RTKs).¹¹ Por ello, esta molécula pertenece al grupo de los denominados inhibidores de tirosinas kinasas (ITKs).

Los RTKs se encuentran en la superficie celular y están involucrados en la regulación de diferentes procesos como la proliferación, diferenciación y supervivencia celular (figura 2A). De manera que la sobreexpresión o las mutaciones de estos receptores y/o de sus ligandos pueden provocar el desarrollo de neoplasias.¹² Es por ello que se ha diseñado un nuevo tipo de fármaco para desregular las vías de señalización intracelular en el cáncer, los ITKs, con objeto de atenuar la proliferación y supervivencia de las células tumorales (figura 2B).

Entre los RTKs que el sunitinib es capaz de inhibir se encuentran los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α y PDGFR β), los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), el receptor del factor de células madre (c-KIT), el receptor tirosina kinasa-3 tipo fms (Flt3), el receptor del factor estimulante de colonias tipo 1 (CSF-1R) y el receptor del factor neurotrófico derivado de células gliales (RET), algunos de los cuales están implicados en el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la progresión metastásica del cáncer.¹³⁻¹⁵

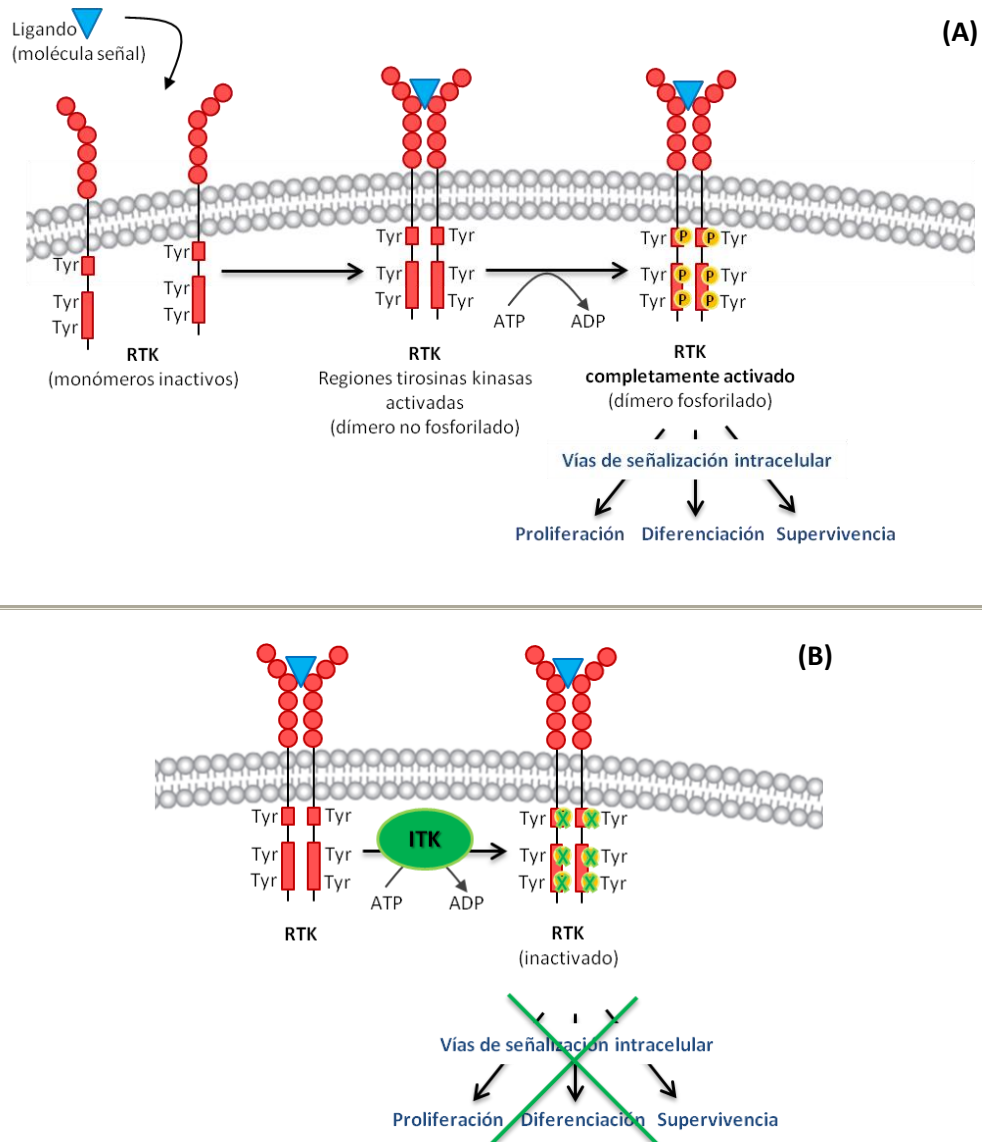


Figura 2. Activación de un RTK (A). La estructura de un RTK consta de un dominio extracelular, donde se unen los ligandos, un dominio transmembrana hidrofóbico, y un dominio citoplasmático con actividad tirosina quinasa. El ligando se une al receptor por el dominio extracelular, estabilizando así el dominio intracelular con actividad tirosina quinasa, lo que induce la dimerización del receptor y su autofosforilación. Esta activación del receptor provoca la estimulación de las vías de señalización intracelular que promueven los diferentes procesos celulares. **Mecanismo de acción de un ITK (B).** El ITK compite con el ATP para la unión al dominio intracelular con actividad tirosina quinasa del receptor, impidiendo su autofosforilación y bloqueando así las vías de señalización intracelular que promueven los diferentes procesos celulares. ADP: adenosín difosfato; ATP: adenosín trifosfato; ITK: inhibidor tirosina quinasa; P: fosforilación; RTK: receptor tirosina quinasa; Tyr: residuo de tirosina.

Podemos ver un ejemplo claro de cómo actúa el sunitinib en el CCR. En esta enfermedad se producen mutaciones y deleciones genéticas que conducen a modificaciones y disminuciones en los niveles funcionales del gen *von Hippel-Lindau* (VHL). Este gen codifica una proteína (p-VHL) que está implicada en la regulación de la producción del factor de

crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La inactivación del gen VHL causa la sobreexpresión de estos factores de crecimiento, los cuales se unen a sus receptores (PDGFRs y VEGFRs) en la superficie de los pericitos vasculares y de las células endoteliales, respectivamente. Como resultado, se promueve la angiogénesis tumoral, el crecimiento del tumor y la metástasis. El sunitinib, que actúa inhibiendo a estos receptores de tirosina kinasa, bloquea la señalización intracelular y de este modo evita que se den estos procesos celulares (figura 3).^{2,16}

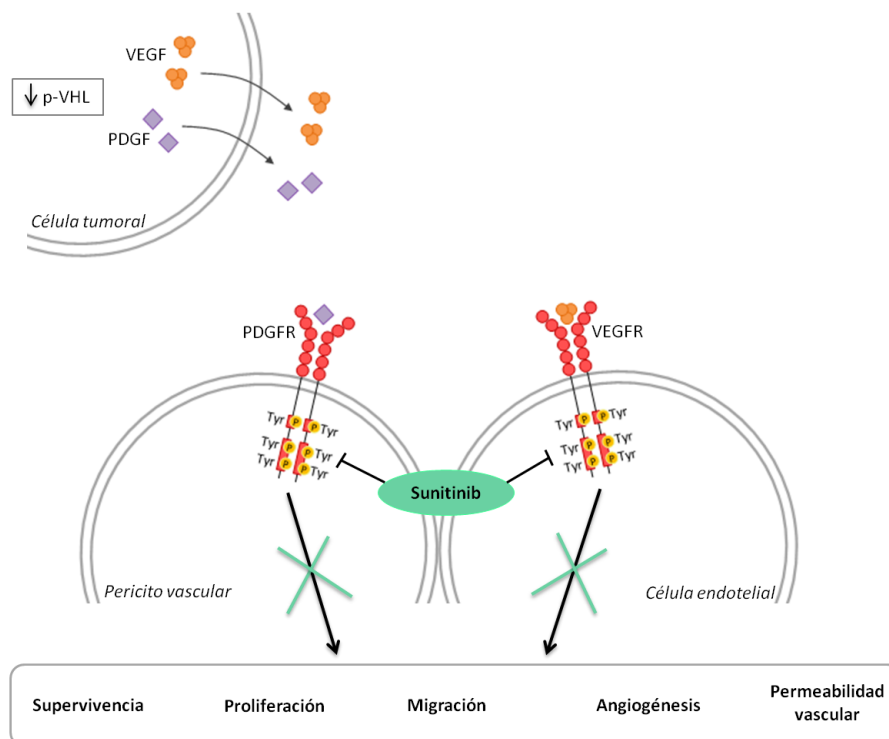


Figura 3. Mecanismo de acción del sunitinib en el CCR. p-VHL: proteína *von Hippel-Lindau*; P: fosforilación; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; PDGFR: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas; Tyr: residuo de tirosina; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; VEGFR: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular.

1.4. Efectos adversos

Los éxitos alcanzados en el tratamiento de estos tumores con los ITKs no están exentos de efectos adversos. Así, el uso del sunitinib se ha asociado con efectos tales como astenia, despigmentación del cabello, cardiotoxicidad, hipotiroidismo, hipertensión arterial (HTA), trastornos hematológicos, alteraciones en la piel y mucosas, y otros de menor entidad.^{17,18}

La toxicidad cardiovascular, que aparece en un porcentaje no despreciables de casos, es una de las complicaciones más importantes en el tratamiento con los ITKs.¹⁹ Este daño puede manifestarse con la aparición de trastornos electrocardiográficos, HTA, disfunción ventricular izquierda, insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) e infarto de miocardio.²⁰

Motzer y col.²¹ han descrito que, tras el uso del sunitinib, entre un 10 y un 21% de los pacientes sufrieron un descenso significativo en la fracción de eyección⁽¹⁾ del ventrículo izquierdo (FEVI). De este porcentaje de pacientes, entre un 3 y un 15% desarrolló además ICC.

En un estudio prospectivo de pacientes con GIST resistentes a imatinib, el 47% de éstos desarrolló HTA; el 20% tenía una reducción de la FEVI de al menos el 50%; el 18% desarrolló ICC, y el 3% de los pacientes tuvo infarto de miocardio.²² En otro estudio retrospectivo, solo el 2,7% de los pacientes con CCR y GIST resistentes a imatinib desarrolló ICC poco después del inicio con sunitinib. Esto se asoció con una disminución de la función cardiaca y la elevación de la presión arterial, que no reverteó en la mayoría de los pacientes una vez eliminado el tratamiento.²³

Telli y col.²⁴ demostraron que el 12,5% de los pacientes que recibieron sunitinib tanto en GIST como en CCR desarrollaron ICC de grado III o IV. En otro estudio realizado en pacientes con GIST, el 11% de éstos se relacionó con la aparición de disfunción ventricular izquierda.²⁵

En un meta-análisis que incluyó 13 ensayos clínicos, la incidencia de HTA total fue del 21,6%, siendo la incidencia de HTA de grado 3 o 4 del 6,8%. Los autores de este estudio concluyeron que la elevación de la presión arterial es rápida y sostenida durante el tratamiento con sunitinib, pero la mayoría de las veces reversible cuando se interrumpe el tratamiento.²⁶ Rini y col.²⁷ observaron que el 8% de los pacientes con CCR tratados con sunitinib desarrolló HTA con una presión arterial sistólica > 140 mmHg, y el 67% de los pacientes tenía una presión arterial diastólica > 90 mmHg. En otro estudio de pacientes con CCR tratados con sunitinib, el 23% de ellos desarrolló HTA, uno de los cuales sufrió un ataque isquémico transitorio.²⁸

Después de esta breve revisión sobre los diferentes ensayos clínicos en pacientes en tratamiento con sunitinib, podemos decir que este fármaco se asocia con una alta incidencia de HTA (de hecho, la HTA se perfila como uno de los efectos adversos más comunes de la terapia con sunitinib) y con una incidencia menor, pero no insignificante, de disfunción ventricular izquierda y de riesgo de ICC.

Curiosamente, estudios recientes indican que los pacientes que desarrollan HTA durante el tratamiento con fármacos antiangiogénicos mejoran la eficacia antitumoral.²⁹ Así, Rini y col.²⁷ encontraron que los pacientes con CCR metastásico tratados con sunitinib que

⁽¹⁾ Porcentaje del volumen telediastólico expulsado del ventrículo en cada sístole.

desarrollan HTA han mejorado sus efectos antitumorales. Mientras se evalúa la posibilidad de utilizar la HTA como un biomarcador de la eficacia tumoral, también aumenta la preocupación de que el tratamiento de la HTA pueda limitar de algún modo la eficacia de los ITKs. Sin embargo, los datos en modelos animales en los que se administran fármacos antiangiogénicos concomitantes con fármacos antihipertensivos, revelan que no parece afectarse la eficacia antitumoral del fármaco antineoplásico.^{30,31}

La aparición de toxicidad cardiovascular complica el pronóstico del paciente, empeora su calidad de vida, y obliga a efectuar cambios en la estrategia del tratamiento antineoplásico. Si aparecen síntomas, hay que añadir tratamientos cardiovasculares que inicialmente no estaban indicados en el paciente.³² No obstante, hay que destacar que, a pesar de los numerosos estudios en los que la terapia con sunitinib se asocia con varios efectos secundarios bien caracterizados, los mecanismos moleculares responsables de esta toxicidad cardiovascular no están claros. De este modo, existen varias teorías que explican la cardiotoxicidad y la aparición de HTA asociada al uso del sunitinib, como se expone a continuación.

1.5. Posibles mecanismos de toxicidad cardiovascular del sunitinib

Se piensa que la inhibición de los receptores diana del sunitinib podría explicar su toxicidad cardiovascular. De todas las dianas del sunitinib, las únicas que se expresan en el sistema cardiovascular son los PDGFRs y los VEGFRs, que desempeñan una función importante en el mantenimiento del corazón y la vasculatura, respectivamente.³³ Esto sería un ejemplo de toxicidad cardiovascular *dentro del objetivo del fármaco*, ya que se desarrolla por inhibición de kinasas que son dianas específicas del sunitinib.³⁴

1.5.1. HTA inducida por sunitinib

Los mecanismos fisiopatológicos asociados a la HTA inducida por los ITKs se intuyen complejos y multifactoriales. Pueden estar relacionados con dos parámetros:

A) Con su efecto antagonista sobre las vías de señalización del VEGF:

- Una de las teorías más importantes es la inhibición o falta de estimulación de la vía del óxido nítrico (NO). El VEGF aumenta la transcripción de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS),^{35,36} incrementando la producción de NO, un potente vasodilatador. Por ello, la inhibición de la vía de señalización del VEGF reduce la

biodisponibilidad del NO, resultando en vasoconstricción sistémica, disfunción endotelial y desarrollo de HTA.³⁷⁻⁴⁰

- Otra teoría barajada es la presencia de estrés oxidativo. Para reducir los efectos endoteliales dañinos de las especies reactivas del oxígeno (ERO), se aumenta la producción de VEGF y VEGFR en la vasculatura. De hecho, se ha demostrado que el VEGF ejerce un papel protector contra el daño endotelial ejercido por las ERO.⁴¹⁻⁴³ Por lo tanto, en pacientes tratados con ITKs se puede perder este efecto protector, permitiendo que el estrés oxidativo contribuya al desarrollo o empeoramiento de la hipertensión arterial.⁴⁴
- Otro mecanismo postulado es una reducción en la densidad de los lechos microvasculares, fenómeno denominado *rarefacción vascular*. Esta reducción de la superficie vascular conduce a un aumento de la resistencia vascular sistémica y, por consiguiente, a la elevación de la presión arterial.⁴⁵

B) Con el sistema de la endotelina. Nuevos hallazgos indican que el sistema de la endotelina juega un papel importante en el desarrollo de la HTA inducida por sunitinib.⁴⁶⁻⁴⁸ Así, la endotelina-1 (ET-1) ejerce parte de su efecto vasoconstrictor a través de la activación de la NADPH (nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido) oxidasa y de la generación de ERO.⁴⁹

1.5.2. Cardiotoxicidad del sunitinib

No está claro si la disfunción ventricular izquierda es un efecto secundario de la HTA o una lesión directa de los cardiomiocitos inducida por el sunitinib. Aunque la disfunción cardíaca puede verse agravada por la HTA, se han descrito casos de pacientes en tratamiento con sunitinib que desarrollaron cardiotoxicidad sin presentar HTA, sugiriendo la existencia de mecanismos fisiopatológicos adicionales.²²

Los PDGFRs se expresan en los cardiomiocitos, y la sobreexpresión de PDGF puede ser señal de la supervivencia de éstos, por lo que la inhibición de estos receptores puede promover la apoptosis.⁵⁰ Chintalgattu y col.⁵¹ han demostrado la importancia de la vía PDGFR en la biología cardiovascular. Así, estos autores sostienen que la expresión de PDGFR en los cardiomiocitos es una vía fundamental para la adaptación cardíaca a situaciones de estrés inducidas por la carga de presión excesiva. Este modelo propone que el sunitinib puede conducir a disfunción del ventrículo izquierdo e insuficiencia cardíaca, ya que inhibe la vía de señalización de PDGFR en los cardiomiocitos, impidiendo la adaptación de éstos a estas situaciones de estrés.

Por otro lado, también existe la cardiotoxicidad *no relacionada con el objetivo del fármaco*. En este caso, la toxicidad se desarrollaría por unión a una diana inespecífica, de manera que el sunitinib inhibe a una kinasa que no estaba destinada a ser inhibida y que además juega un papel importante en el corazón.⁵² Kerkela y col.³³ propusieron que el sunitinib ejerce su cardiotoxicidad a través de la inhibición de la kinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK), una kinasa que desempeña un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis metabólica del corazón, manteniendo el equilibrio energético en el cardiomiocito. Otros investigadores se basan en el daño mitocondrial y en el consecuente deterioro del tejido cardíaco, pero los datos disponibles al respecto no son concluyentes. Will y col.⁵³ no encuentran dañada la función mitocondrial en una línea celular de mioblastos procedentes de ratas tratadas con sunitinib. Sin embargo, otros estudios en ratas tratadas con sunitinib sí que han demostrado lesiones estructurales en los cardiomiocitos, con alteración de la función mitocondrial, deterioro en la generación de ATP y aumento de la apoptosis.²²

En resumen, los efectos cardiotóxicos del sunitinib se relacionan, por un lado, con toxicidad directa sobre el cardiomiocito, cuyos mecanismos no se conocen bien pero entre los que se incluyen la inhibición de la vía de señalización de los PDGFRs y una alteración de la función mitocondrial; y, por otro lado, con la aparición de HTA asociada al uso de este fármaco, cuyos mecanismos tampoco son del todo conocidos, aunque se piensa que pueden estar relacionados con la inhibición de la vía VEGF y con el sistema de la endotelina, y que también desempeña un papel primordial en el desarrollo de la cardiopatía (figura 4).

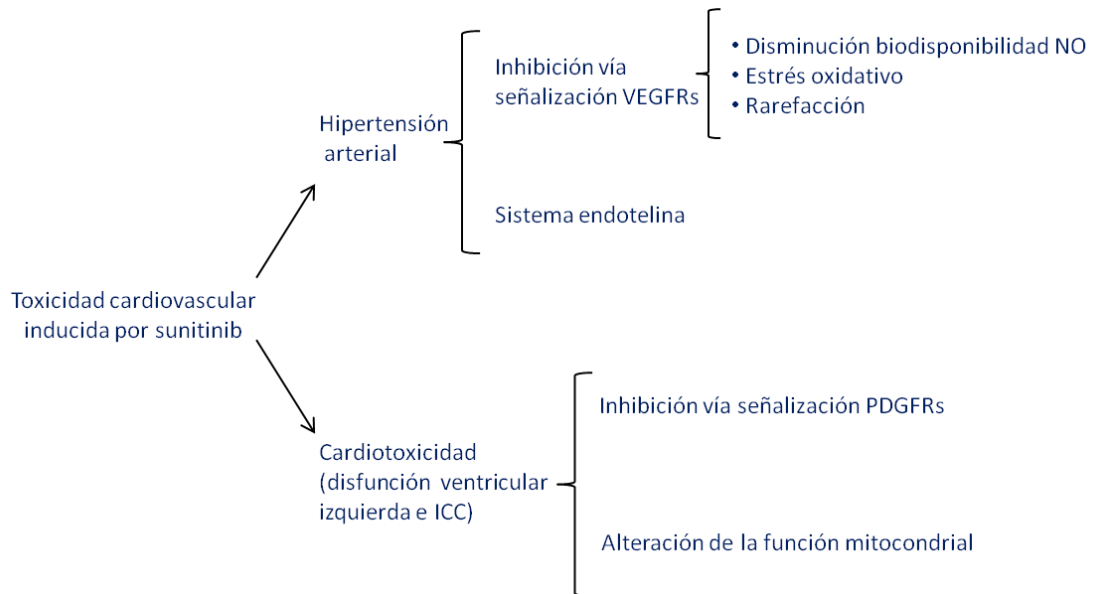


Figura 4. Esquema de los posibles mecanismos de toxicidad cardiovascular del sunitinib. AMPK: kinasa activada por monofosfato de adenosina; ICC: insuficiencia cardiaca congestiva; NO: óxido nítrico; PDGFRs: receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas; VEGFRs: receptores del factor de crecimiento endotelial vascular.

2. ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN

2.1. Daño 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. Así, este desbalance puede ser debido bien a una excesiva producción de especies reactivas prooxidantes, o bien a una deficiencia en los mecanismos antioxidantes.⁵⁴

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son un conjunto de moléculas entre las que se incluye el oxígeno molecular (O_2) y sus derivados, y son producidas por la incompleta reducción del oxígeno hasta el agua.⁵⁵ En estado de reposo, el O_2 es poco reactivo; sin embargo, diferentes elementos endógenos (mitocondria, retículo endoplasmático, peroxisomas) y exógenos (tabaco, medicamentos, ozono) provocan la formación de las ERO (figura 5).

Tradicionalmente, estas ERO se han clasificado como derivados tóxicos del metabolismo aeróbico, debido a su capacidad de oxidar macromoléculas biológicas como el ADN, los carbohidratos, los lípidos y las proteínas. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que las ERO desempeñan un papel muy importante como segundos mensajeros dentro de las vías de señalización de diversas funciones, tales como el control de crecimiento, la apoptosis y la supervivencia celular.^{56,57} Esta diversidad de acciones

radica en la heterogeneidad de las ERO que pueden producirse, así como en su localización celular y en la variada cinética de producción, lo que les permite regular el fenotipo celular tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

En condiciones fisiológicas, existe una homeostasis de óxido-reducción (redox) gracias a que las fuentes de ERO y los sistemas antioxidantes se encuentran en un estado de equilibrio. En condiciones patológicas, en cambio, se generan grandes cantidades de ERO y/o los sistemas antioxidantes se encuentran comprometidos; de este modo, se produce una alteración de la homeostasis redox que da lugar a la situación de estrés oxidativo.⁵⁶

Las especies principales reactivas del oxígeno son: el anión radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el anión peroxinitrito ($\cdot\text{OONO}^-$). La mayor parte de las ERO se originan a partir del O_2 , el cual sufre una serie de reacciones univalentes a través de las cuales se producen de manera secuencial las distintas ERO (figura 5).

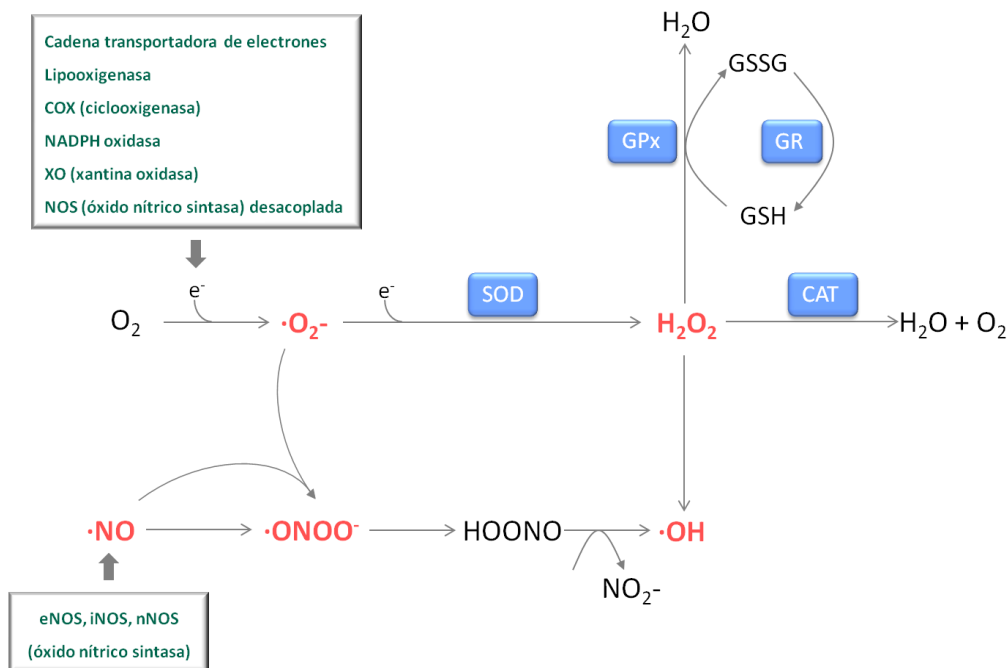


Figura 5. Metabolismo de las especies reactivas del oxígeno. ERO: Radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), anión peroxinitrito ($\cdot\text{OONO}^-$). Fuentes enzimáticas de las ERO: cadena transportadora de electrones mitocondrial, lipooxigenasa, ciclooxigenasa (COX), xantina oxidasa (XO), NADPH oxidasa, óxido nítrico sintasa (NOS) desacoplada, óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS). Enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), catalasa (CAT).

El **anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$)** 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. Otras fuentes enzimáticas capaces de generar $\cdot\text{O}_2^-$ son las enzimas lipooxigenasa, ciclooxigenasa, NADPH (nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido) oxidasa, xantina oxidasa y óxido nítrico sintasa (NOS) en su estado desacoplado.⁵⁸⁻⁶⁰ El anión superóxido es de vida corta e inestable, de modo que experimenta una rápida reducción a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD).⁶¹ Su carga le hace que sea incapaz de atravesar membranas celulares, excepto a través de canales iónicos.

El **peróxido de hidrógeno (H_2O_2)** tiene una vida más larga que el $\cdot\text{O}_2^-$, siendo relativamente estable y difundiendo fácilmente entre las células. Es un blanco muy interesante de investigación, ya que puede ser convertido en el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) por una reacción en cadena con otras moléculas que inducen efectos tóxicos.

El **radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)** es una molécula altamente oxidante, electrofílica, tóxica y de vida muy corta. De este modo, cuando es producido *in vivo*, reacciona muy cerca de su sitio de 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 y, al ser altamente reactivo, una vez formado reacciona con biomoléculas.⁶²

Otro radical muy importante en la familia de las ERO es el **óxido nítrico celular ($\cdot\text{NO}$ o NO)**, sintetizado por medio de una familia de sintasas del óxido nítrico (NOS) a partir de la oxidación de la L-arginina.⁶³ Existen tres isoformas de la NOS en mamíferos, la NOS I o nNOS (óxido nítrico sintasa neuronal), la NOS II o iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) y la NOS III o eNOS (óxido nítrico sintasa endotelial) (figura 5). La eNOS y nNOS son expresadas constitutivamente como enzimas latentes y requieren una alta concentración de calcio para la actividad de la enzima, a diferencia de la iNOS que es inducible e independiente de calcio.^{64,65} El $\cdot\text{NO}$ es una molécula de vida media muy corta, pero su posterior oxidación da lugar a múltiples ERO. Los productos biológicos mayoritarios que se generan por oxidación del $\cdot\text{NO}$ son el nitrito (NO_2^-) y el nitrato (NO_3^-), así como diversos óxidos. Además el $\cdot\text{NO}$ puede reaccionar con el $\cdot\text{O}_2^-$ para generar peroxinitrito ($\cdot\text{OONO}^-$).⁶⁶

El **anión peroxinitrito ($\cdot\text{OONO}^-$)** es un oxidante muy potente, producto de la reacción entre el $\cdot\text{O}_2^-$ y el $\cdot\text{NO}$ como acabamos de señalar. 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). En condiciones patológicas, los niveles de $\cdot\text{OONO}^-$ están aumentados, favoreciendo así sus acciones deletéreas. Además, este anión puede también reaccionar con residuos de tirosina, para dar lugar a nitrotirosina.⁶⁷

2.2. Mecanismos de defensa antioxidante

El efecto de las ERO en el organismo, como hemos visto anteriormente, está compensado por la acción de los sistemas de defensa antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos.

Los antioxidantes enzimáticos constituyen la llamada primera línea de defensa; se encargan de eliminar las ERO, especialmente el $\cdot\text{O}_2^-$ y el H_2O_2 , ya que a partir de éstos se generan otras especies reactivas de oxígeno ($\cdot\text{OH}$ y $\cdot\text{OONO}$) que, al ser más reactivas, son más nocivas para el organismo. Los principales antioxidantes enzimáticos son la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR). La SOD es la responsable de la regulación de los niveles de $\cdot\text{O}_2^-$, ya que cataliza la dismutación de éste a H_2O_2 . Por otro lado, la CAT y la GPx catalizan la reducción de H_2O_2 a H_2O , utilizando esta última glutatión reducido (GSH) como donador de electrones. Este GSH se oxida para generar glutatión oxidado (GSSG), que es nuevamente reducido a GSH por la enzima GR (figura 5).⁶⁸

Además de las enzimas antioxidantes, existen moléculas con capacidad antioxidante, como el mencionado GSH, la bilirrubina y el ácido úrico, la melatonina, las vitaminas E (α -tocoferol) y C (ácido ascórbico), los carotenoides y los flavonoides.⁶⁸

2.3. Producción de las ERO en el sistema cardiovascular. Relevancia en la fisiopatología del daño cardíaco asociado a la HTA

Las ERO en el sistema cardiovascular juegan un papel fisiológico fundamental en el control de la función endotelial, del tono vascular, y de la función cardíaca. Sin embargo, también desempeñan un papel fisiopatológico en los procesos de inflamación, hipertrofia, proliferación, apoptosis, migración, fibrosis, angiogénesis y rarefacción, procesos que contribuyen a disfunción endotelial y remodelado cardiovascular en la HTA y en otras enfermedades cardiovasculares.^{69,70}

De las ERO generadas en las células cardiovasculares, las más relevantes son el H_2O_2 y el $\cdot\text{O}_2^-$.⁷¹ Ambos compuestos derivan de muchas fuentes enzimáticas y no enzimáticas en diferentes compartimentos celulares. Entre las principales fuentes enzimáticas capaces de generar $\cdot\text{O}_2^-$ en el sistema cardiovascular se encuentran la cadena transportadora de electrones mitocondrial, la eNOS desacoplada, la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa.⁷²⁻⁷⁵

El **desacoplamiento de la eNOS** resulta en un aumento de la producción de $\cdot\text{O}_2^-$ y en una disminución de la producción de $\cdot\text{NO}$. La enzima eNOS, en ausencia de su sustrato (L-arginina) o de su cofactor (BH_4 , tetrahidrobiopterina), fluctúa desde un estado acoplado (generando $\cdot\text{NO}$) hacia un estado desacoplado (generando radical superóxido). Como hemos señalado, el $\cdot\text{NO}$ es una molécula que desempeña un papel muy importante en el sistema vascular, ya que es la principal sustancia vasodilatadora liberada por el endotelio vascular y por consiguiente regula el flujo y la presión sanguínea.⁷⁶ Actúa como regulador de la función cardíaca a través de sus acciones directas sobre los cardiomiocitos, ejerciendo también acciones indirectas como consecuencia de sus efectos vasculares.⁷⁷ Cuando la enzima eNOS está en un estado desacoplado por la acción de las ERO, se favorece la formación de peroxinitritos, con lo que se estimula el estrés nitrosativo y se reduce la biodisponibilidad del $\cdot\text{NO}$.

Otra fuente de $\cdot\text{O}_2^-$ es la xantina oxidasa, que utiliza el oxígeno molecular para catalizar la oxidación de hipoxantina y xantina, dando lugar a la formación de $\cdot\text{O}_2^-$.⁷¹

No obstante, una de las principales fuentes de $\cdot\text{O}_2^-$ en el sistema cardiovascular es la **NADPH oxidasa**.^{78,79} Esta enzima juega un papel crítico en el contexto de las enfermedades cardiovasculares, dado que la sobreactivación de la misma está involucrada en diferentes factores de riesgo cardiovascular, incluidos la obesidad, la resistencia a la insulina, la diabetes, y la HTA.^{59,76,80-85}

La NADPH oxidasa es una enzima que fue descrita inicialmente en células fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos y monocitos/macrófagos), donde desempeña principalmente una función de defensa.⁸⁶ La NADPH oxidasa fagocítica es un sistema enzimático compuesto por un conjunto de subunidades localizadas tanto en el citosol como en la membrana plasmática.^{86,87} Así, en la membrana se localiza el citocromo b_{558} , formado por las subunidades gp91phox (también llamada Nox2) y p22phox, ambas esenciales para que el sistema enzimático sea funcional.⁸⁸ Por su parte, en el citosol se encuentran las subunidades p47phox, p67phox y p40phox. Para que la enzima se active, es necesaria la translocación de las subunidades citosólicas hacia el citocromo b_{558} de membrana y la acción de la proteína G de bajo peso molecular Rac1 o Rac2 (figura 6). Una vez ensamblado el complejo, se genera $\cdot\text{O}_2^-$ por transferencia de un electrón desde el NADPH en el citosol hasta el O_2 . Las células fagocíticas en reposo no presentan actividad oxidasa, sino que ésta se desencadena ante determinados estímulos que inducen la translocación del complejo formado por las subunidades citosólicas hacia la membrana.

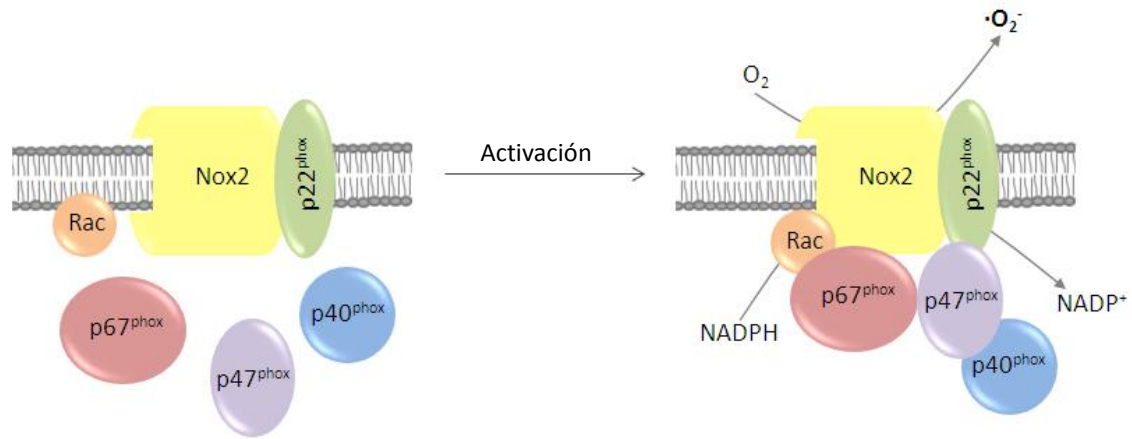


Figura 6. Estructura y activación de la NADPH oxidasa fagocítica.

Más tarde se observó que esta enzima se expresa también en células no fagocíticas; de hecho, se localiza en todas las células del sistema cardiovascular.⁸⁹⁻⁹² En este caso, la NADPH oxidasa es equivalente a la fagocítica, aunque difiere estructural y funcionalmente.

Hasta el momento se han descrito 7 isoformas de la enzima: Nox1, Nox2, Nox3, Nox4 (también conocida como Renox, por su abundancia en el tejido renal), Nox5, Duox1 y Duox2, basadas en la homología de la subunidad catalítica gp91phox.⁹³ Todas son proteínas transmembrana que han conservado sus propiedades estructurales y que transportan electrones a través de las membranas biológicas para reducir el O_2 a $\cdot O_2^-$. Cada una de ellas se expresa en diferentes tipos celulares, así como se localizan en distintos sitios dentro de las células (tabla I).⁹⁴

Las isoformas Nox1, Nox2, Nox4 y Nox5 están altamente expresadas en el sistema vascular,^{95,96} y las isoformas expresadas principalmente en el corazón son la Nox2 y la Nox4.⁹⁶⁻⁹⁸

Como se ha explicado anteriormente, la generación de radicales libres en cantidades fisiológicas es esencial para la vida, ya que éstos intervienen en la regulación de respuestas relacionadas con la expresión génica, progresión del ciclo celular y supervivencia celular.^{56,99,100} Sin embargo, una producción excesiva de ERO, de tal modo que no pueda ser contrarrestada por los sistemas de defensa antioxidantes (pérdida de la homeostasis redox), causa disfunción y daño tisular en el sistema cardiovascular mediante la activación de diferentes rutas de señalización intracelular, produciendo en última instancia disfunción endotelial, remodelado cardiovascular, e incremento de la resistencias vasculares periféricas con la consiguiente elevación de la presión arterial.¹⁰¹⁻¹⁰³

Isoformas Nox	Distribución celular/tejido/órgano	Localización subcelular
Nox1	VSMC, células endoteliales, órganos reproductores y epitelio del colon	Membranas intracelulares cercanas al retículo endoplasmático, endosomas y caveolas
Nox2 (gp91phox)	Células fagocíticas, células endoteliales, VSMC, fibroblastos, células del músculo esquelético, cardiomiocitos y hepatocitos	Membrana celular, fagosomas y región perinuclear
Nox3	Tejido fetal y oído interno	Membrana plasmática
Nox4 (Renox)	Riñón, VSMC, fibroblastos, cardiomiocitos, células endoteliales, osteoclastos, melanocitos, neuronas, pulmón, órganos reproductores, placenta, páncreas, ojo y tejido fetal.	Adhesiones focales, retículo endoplasmático, núcleo y mitocondria
Nox5	VSMC, células endoteliales, tejido fetal, linfocitos, bazo, órganos reproductores, placenta, páncreas, estómago, glándulas mamarias y cerebro.	Membrana plasmática y retículo endoplasmático
Duox1/2	Tiroides, glándulas salivares, colon, recto, bronquios, próstata y páncreas.	Membrana apical

Tabla I. Distribución de la NADPH oxidasa. VSMC: *vascular smooth muscle cells*, células de la musculatura lisa vascular. Adaptado de *Ghouleh y col. (2011). Free Radic. Biol. Med. 51(7):1271-88.*

Se ha demostrado que el estrés oxidativo inducido por las ERO desempeña un papel importante en varias enfermedades cardiovasculares, como arteriosclerosis, HTA, fallo cardiaco, isquemia, cardiomiopatías, hipertrofia ventricular izquierda e insuficiencia cardiaca, y fallo cardiaco congestivo. Hay multitud de evidencias que demuestran que, tanto en humanos como en modelos experimentales de hipertensión, la HTA y el daño cardiovascular se asocian con un incremento del estrés oxidativo mediado por una activación de la enzima NADPH oxidasa.^{68,79,96}

En el contexto de las enfermedades cardiovasculares, se pueden considerar distintos factores humorales, hemodinámicos y genéticos capaces de regular la activación de cualquiera de las isoformas conocidas de la NADPH oxidasa (figura 7). Así, la NADPH oxidasa es estimulada en respuesta a factores humorales tales como la angiotensina II (Ang II), la endotelina-1 (ET-1), algunas citoquinas proinflamatorias, incluido el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleuquina 1 β (IL-1 β) e interleuquina 6 (IL-6), y el factor de crecimiento transformante β tipo I (TGF- β_1).^{49,104-112} Por otra parte, los factores hemodinámicos, como la tensión cíclica y las fuerzas de cizalladura, tanto laminares como oscilatorias, estimulan la NADPH oxidasa de la pared vascular.^{113,114} Finalmente, el componente genético desempeña un papel importante en la activación de la NADPH

oxidasa. Así, varios estudios genéticos han demostrado la existencia de polimorfismos capaces de modular la expresión y la actividad de la NADPH oxidasa.^{115,116} Estos tres factores (humoral, hemodinámico y genético), actuando sinérgicamente o de manera independiente, pueden regular las NADPH oxidasas, favoreciendo la activación inmediata de la enzima existente, lo cual se traduce en la inmediata liberación de $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2 , con la consecuente generación de estrés oxidativo y activación de determinadas vías de señalización intracelulares.

Los mecanismos moleculares por los cuales las ERO influyen en el desarrollo de cardiopatía hipertensiva implican la activación de vías de señalización sensibles a fenómenos redox (figura 7). Las ERO (especialmente $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2) actúan como segundos mensajeros de forma altamente regulada, actúan sobre múltiples moléculas señalizadoras incluidas las MAP kinasas (MAPK), receptores de la tirosina kinasa (EGFR, IGFR y PDGFR), proteínas tirosinas fosfatasas, canales iónicos (Ca^{2+} y K^+), metaloproteinasas de la matriz (MMP), y factores de transcripción sensibles al estado redox, como el factor de activación nuclear κB (NF- κB), la proteína activadora 1 (AP-1), el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) o la enzima lisil oxidasa (LOX-1).¹¹⁷⁻¹²² La activación de todas estas moléculas señalizadoras posibilitan la generación de hipertrofia, remodelado, fibrosis, proliferación, apoptosis e inflamación en la célula cardíaca.^{118,123-126}

Las ERO también actúan sobre los canales iónicos, favoreciendo la liberación de Ca^{2+} hacia el citoplasma y promoviendo la contracción de las células musculares de la vasculatura. De esta forma, aumentan la vasoconstricción y constituyen a la elevación de la presión arterial.¹²⁷

Por otro lado el estrés oxidativo aumenta la expresión de citoquinas proinflamatorias, como la IL-6, la IL-1 β y el TNF α , mediante la estimulación del NF- κB , promoviendo los procesos inflamatorios que se describen con más detalle en el apartado 2.4.¹²⁸

El estrés oxidativo también está implicado en la generación de fibrosis, proceso descrito con detalle en el apartado 3. Este efecto está mediado por factores de transcripción, como HIF-1 y LOX-1, por la vía de las MAPK, y por la activación de MMP, que promueven la expresión génica de componentes de la matriz extracelular (MEC), como colágeno I, colágeno III, fibronectina, así como de citoquinas profibróticas, como TGF- β_1 y el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF).^{96,129,130}

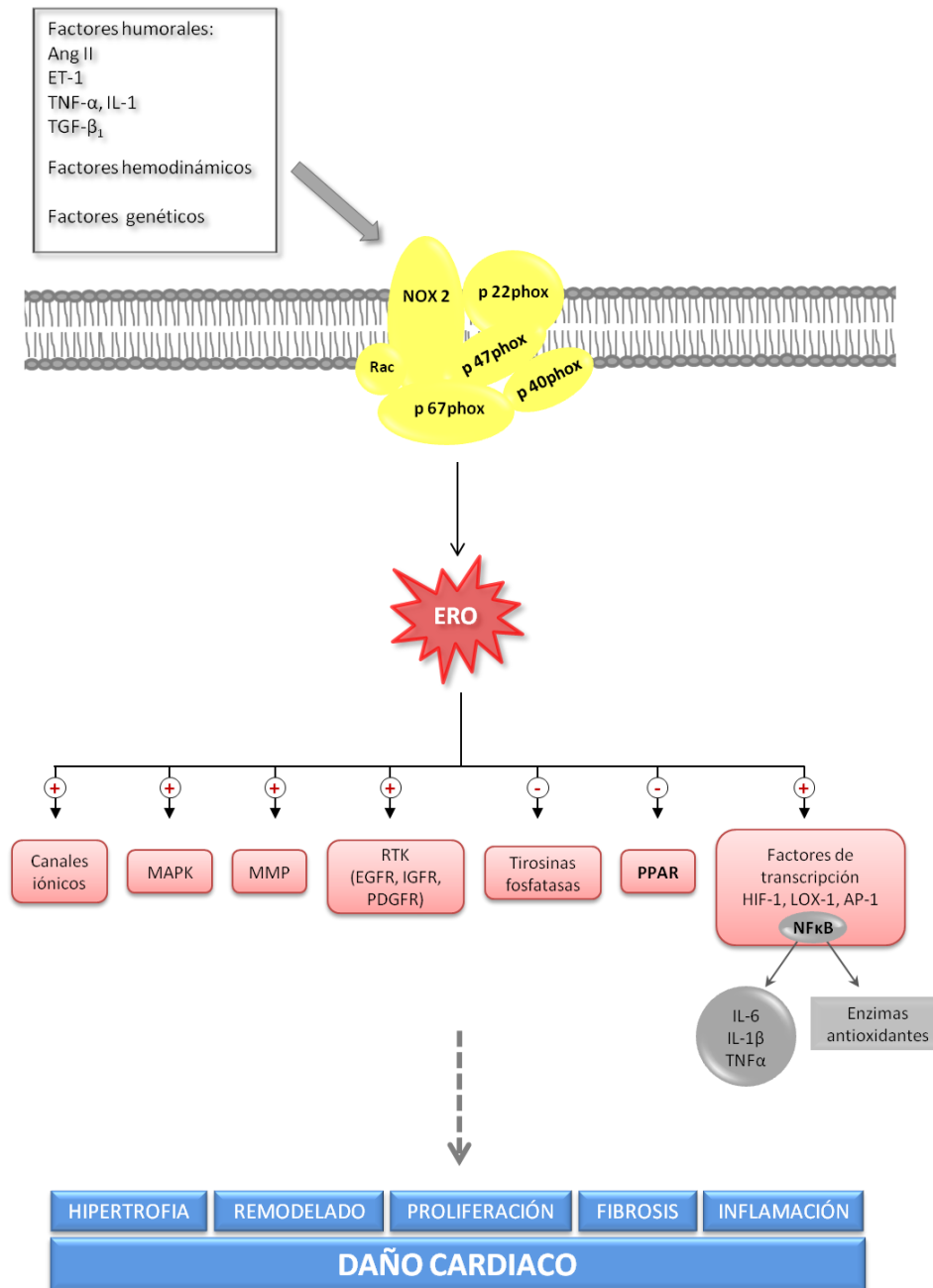


Figura 7. Mecanismos moleculares por los cuales las ERO producen daño cardíaco. AP-1: proteína activadora 1; EGFR: receptor de factor de crecimiento epidérmico; HIF-1: factor inducible por hipoxia 1; IGFR: receptor del factor de crecimiento sensible a insulina; LOX-1: lisil oxidasa; MAPK: proteína quinasa activada por mitógeno; MMP: metaloproteínasa de la matriz; NF- κ B: factor de activación nuclear κ B; PDGFR: receptor del factor derivado de plaquetas; PPAR: receptor activado por el proliferador de peroxisomas.

Las ERO también modulan la acción de la familia de factores de transcripción PPARs (receptores activados por el proliferador de peroxisomas). Así, un aumento del estrés oxidativo da lugar a una disminución de la expresión génica de los PPARs.¹¹⁷ Los PPARs son factores de transcripción pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares, de los cuales existen tres isoformas (PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ).¹³¹ Se ha demostrado que poseen

efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antifibróticos. La activación de PPAR γ inhibe la expresión y la actividad de la NADPH oxidasa y la consecuente producción de ERO. Además, activan la expresión génica de algunas enzimas antioxidantes.¹³²⁻¹³⁵ La mayoría de los efectos antiinflamatorios de PPAR γ se deben a la inhibición de NF- κ B, mitigando así la producción de citoquinas proinflamatorias.^{133,136} También ejercen un efecto antifibrótico, interfiriendo con factores que promueven la generación de la MEC.^{137,138} Por todo esto, la estimulación de la familia PPARs resulta en efectos protectores cardiovasculares, efectos que se ven mermados cuando se produce un aumento excesivo de las ERO.

Por último, las ERO también participan en procesos de proliferación celular a través de las vías de las MAPK, de la acción de los receptores de la tirosina kinasa y del factor de transcripción AP-1.^{56,121}

Por todo ello, el estrés oxidativo juega un papel muy importante en el progreso del daño cardiaco, con un aumento de la presión arterial asociado. De esta forma, la NADPH oxidasa contribuye a la patogénesis del daño cardiovascular participando en procesos como la fibrosis cardiovascular o la cardiomiopatía hipertensiva.

2.4. Inflamación en la fisiopatología del daño cardiaco asociado a la HTA

La inflamación se puede definir como una respuesta no específica ante una gran variedad de lesiones tisulares, caracterizada 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 mediadores de factores quimiotácticos, como interleuquinas y quimioquinas producidas localmente por el tejido dañado.¹³⁹

La inflamación tiene un papel importante en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares, como la aterosclerosis, la insuficiencia cardiaca y la HTA.¹⁴⁰⁻¹⁴³ Estos procesos inflamatorios pueden inducir cambios en la función cardiaca, en la resistencia vascular periférica y en los mecanismos de control renal de los electrolitos y del volumen plasmático. Es más, se ha demostrado que ciertas concentraciones plasmáticas de moléculas inflamatorias y determinadas citoquinas son predictivas de futuros eventos cardiovasculares.¹⁴⁴ Diversos trabajos indican que los mecanismos inmunológicos e inflamatorios también son fundamentales en el desarrollo y la progresión del daño orgánico en el paciente hipertenso.¹⁴⁵

Son muchos los investigadores que ponen de manifiesto que los mediadores inflamatorios son importantes en la HTA que acompaña al daño cardiaco, contribuyendo al remodelado

cardiaco.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ Así, diversos estudios han demostrado niveles elevados de moléculas de adhesión (molécula de adhesión intercelular, ICAM; molécula de adhesión vascular, VCAM), proteína C reactiva (PCR) y citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6 y el TNF- α , en la insuficiencia cardiaca.^{149,150}

Parece ser que la principal ruta de señalización que pone en funcionamiento el proceso inflamatorio es iniciada por las ERO generadas por la NADPH oxidasa, activada por los diferentes factores humorales (Ang II, ET-1, citoquinas) y hemodinámicos. Las ERO, como hemos mencionado en el apartado anterior, activan distintas moléculas señalizadoras, entre las que se encuentra el factor de transcripción NF- κ B,^{128,146,148} mediante la fosforilación de I κ B (molécula a la que se encuentra unida NF- κ B en su forma inactiva en el citoplasma). Esta fosforilación provoca la translocación 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 .¹⁵¹⁻¹⁵⁵ Además, NF- κ B también regula la expresión génica de las distintas enzimas antioxidantes¹⁵⁶⁻¹⁵⁹ (figura 7).

Estas citoquinas no solo promueven la activación y migración de las células del sistema inmune, sino que modulan el modo de actuación de dichas células.¹⁶⁰ De esta forma, NF- κ B también promueve la infiltración de monocitos en los tejidos y la activación de linfocitos T. Parece ser que estas células inflamatorias se acumulan en las regiones perivasculares del corazón. Debido a esto, se ha destacado la importancia del papel de NF- κ B en la inflamación y daño cardiaco asociados a la HTA.¹²⁸

Existen pruebas experimentales que apoyan esta teoría, ya que se ha encontrado que los niveles elevados de citoquinas reproducen el fenotipo de la insuficiencia cardiaca (incluyendo disfunción y remodelado ventricular), cardiomiopatía y pérdida progresiva de cardiomiocitos por apoptosis.¹⁶¹ En humanos, los niveles séricos elevados de TNF- α , IL-6 y PCR se asocian a un riesgo mayor de desarrollar insuficiencia cardiaca.¹⁶² Deswall y col.¹⁶³ han demostrado la relación existente entre los niveles de TNF- α e IL-6 y la mortalidad por problemas cardiacos.

En el proceso inflamatorio participan también algunas citoquinas antiinflamatorias; en especial, se ha destacado el papel de la interleuquina 10 (IL-10), la cual se encuentra disminuida en pacientes con insuficiencia cardiaca. Esta potente citoquina antiinflamatoria puede inhibir la producción de la IL-1 β , IL-6 y TNF α a través de la inhibición del factor de transcripción NF- κ B.¹⁶⁴

3. FIBROSIS

La fibrosis es un proceso de cicatrización patológica que conduce a la destrucción de la arquitectura de un órgano y al deterioro de la función del mismo, jugando un papel importante en la progresión de muchas enfermedades crónicas que afectan al hígado, corazón, riñón y pulmón.¹⁶⁵ Se caracteriza por la deposición excesiva de los componentes de la matriz extracelular (MEC), así como por una disminución de la degradación de los mismos. De esta forma, se produce una alteración de la homeostasis de la MEC en el sitio de la lesión del tejido, dando lugar a una insuficiencia funcional del órgano.¹⁶⁶

3.1. Matriz extracelular

La MEC es una red estructural tridimensional compuesta por moléculas de colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas. Se precisa un balance apropiado en la síntesis y la degradación de la MEC para la morfogénesis normal y el mantenimiento de la arquitectura del tejido.¹⁶⁷

En el corazón, la MEC se encarga de proporcionar la necesaria integridad estructural y funcional.¹⁶⁸ Es crítica en la mediación de la conexión mecánica entre los cardiomiocitos, los fibroblastos y los vasos sanguíneos circundantes.^{169,170}

El componente predominante de la MEC cardiaca es el colágeno. El más abundante es el colágeno fibrilar de tipo I y tipo III, y en menor proporción se encuentra el colágeno no fibrilar (no formador de fibras). Aproximadamente, el 85% del colágeno total del corazón se compone de colágeno tipo I.¹⁶⁷

Los proteoglicanos son un grupo de macromoléculas solubles que tienen funciones estructurales y metabólicas; participan en la estabilización de las redes de colágeno y proporcionan hidratación a la matriz.^{171,172} Por su parte, las glicoproteínas son unas macromoléculas solubles que proporcionan la conexión entre los componentes de la matriz y las células. Entre las glicoproteínas más importantes se encuentran la laminina, la elastina y la fibronectina. Esta última tiene capacidad de organizarse en fibrillas, favoreciendo la unión entre células y la unión de éstas a los componentes de la MEC.¹⁷²

3.2. Fibrosis miocárdica en la HTA

La HTA provoca una serie de cambios en la composición del tejido cardiaco que dan lugar al *remodelado* estructural del miocardio. El remodelado estructural es la consecuencia de un número de procesos patológicos, mediado por factores mecánicos, neurohumorales y

citoquinas que afectan a los compartimentos cardiomiocitario y no cardiomiocitario del corazón. Uno de dichos procesos está relacionado con la alteración del equilibrio entre la síntesis y la degradación de los componentes de la MEC, lo que resulta en una excesiva acumulación de fibras de colágeno en el espacio intersticial y perivascular del miocardio. La relevancia clínica de la fibrosis miocárdica radica en que contribuye al incremento del riesgo cardiaco de los pacientes con cardiopatía hipertensiva.¹⁷³

3.2.1. Modificaciones de los cardiomiocitos

Una de las lesiones histológicas que se produce en la cardiopatía hipertensiva es el aumento del tamaño de los cardiomiocitos, debido al incremento de su contenido en proteínas y ribosomas, dando lugar a la hipertrofia del miocardio.¹⁷⁴ Inicialmente, esta hipertrofia cardíaca constituye una respuesta compensatoria que normaliza transitoriamente el estrés biomecánico y optimiza la función del corazón; sin embargo, la hipertrofia miocárdica prolongada es un factor de riesgo de gran importancia para el desarrollo de insuficiencia cardíaca.¹²⁴ La transición de la hipertrofia compensadora a la disfunción ventricular progresiva está mediada por la disminución del número de cardiomiocitos debida al incremento de su muerte celular programada o apoptosis.¹⁷⁴ Si mueren los cardiomiocitos en exceso se produce una sustitución de miocardio contráctil por material fibroso; por lo tanto, un incremento de la apoptosis cardiomiocitaria puede estar favoreciendo el desarrollo de fibrosis miocárdica y, en consecuencia, contribuyendo al compromiso de la función cardíaca que caracteriza a la cardiopatía hipertensiva. Es decir, la fibrosis miocárdica contribuye a la transición de la hipertrofia ventricular izquierda a la insuficiencia cardíaca en los pacientes hipertensos con cardiopatía hipertensiva.¹⁷³

El estímulo hipertrófico de los cardiomiocitos puede producirse por estrés mecánico (estiramiento), y también por diversos factores humorales, entre los que se encuentran factores de crecimiento como el TGF- β y el FGF (factor de crecimiento fibroblástico); sustancias vasoactivas, como la Ang II y la ET-1; y algunas citoquinas inflamatorias, como la IL-6.¹⁷⁴⁻¹⁷⁷ Diversos estudios indican que estos factores producen hipertrofia del cardiomiocito a través de una vía dependiente de ERO mediante la activación de la enzima NADPH oxidasa, la cual participa en la vía de señalización de crecimiento celular, incluida la respuesta hipertrófica^{124,178} (figura 7).

3.2.2. Modificaciones del intersticio

Junto a los cambios del componente cardiomiocitario vistos en el apartado anterior, en el remodelado del miocardio se producen cambios en el componente no cardiomiocitario del mismo que conducen a su fibrosis.¹⁷⁴ A diferencia de la **fibrosis reparativa** (con la típica morfología de cicatrices microscópicas) que reemplaza los cardiomiocitos desaparecidos por tejido necrótico, la fibrosis del remodelado (con un típico patrón morfológico perivascular-intersticial) es considerada una fibrosis reactiva a diversos estímulos.¹⁷⁹

Esta **fibrosis reactiva** cursa con una acumulación exagerada de tejido fibrótico desarrollada como fibrosis intersticial y fibrosis perivascular. En condiciones patológicas, como situaciones de HTA o de isquemia cardiaca, los fibroblastos cardiacos se estimulan e incrementan la síntesis de componentes de la MEC, principalmente de moléculas de colágeno tipo I y tipo III. Además, para que se produzca la acumulación de fibras de colágeno que caracteriza a la fibrosis, es preciso que exista también una disminución de la degradación de estos componentes por las metaloproteinasas de la matriz (MMP).¹⁷⁹⁻¹⁸² Por ejemplo, la MMP-1 (colagenasa) se encuentra inhibida en animales con hipertensión o isquemia y fibrosis miocárdica.¹⁷⁴

La fibrosis altera la arquitectura del miocardio ventricular izquierdo, facilitando su heterogeneidad anatómica y comprometiendo la unidad sincitial de sus células contráctiles, lo que propicia el desarrollo de disfunción sistólica. La acumulación de fibras de colágeno también incrementa la rigidez de la pared ventricular, lo que puede comprometer su distensibilidad y facilitar la aparición de disfunción diastólica.^{183,184} Además, el acoplamiento de los miofibroblastos (fibroblastos activados) entre los cardiomiocitos puede influir negativamente en el comportamiento eléctrico del miocardio, lo que provoca la aparición de arritmias.¹⁸⁵⁻¹⁸⁸ También puede producirse la atrofia de algunos cardiomiocitos, ya que pueden quedar atrapados por el colágeno fibrilar generado por miofibroblastos adyacentes, contribuyendo a la naturaleza progresiva de la insuficiencia cardiaca.¹⁷⁹

3.2.3. Activación de fibroblastos

La principal fuente de colágeno en la fibrosis son los miofibroblastos.¹⁶⁶ Los fibroblastos, en tejidos sanos, están en reposo y son los principales implicados en el mantenimiento de la homeostasis de la MEC. Sin embargo, en respuesta a determinados estímulos, como lesiones en el miocardio, los fibroblastos se pueden diferenciar en miofibroblastos, los cuales presentan una mayor capacidad sintética para producir colágeno fibrilar de tipo I y

tipo III.^{189,190} Los miofibroblastos no se encuentran en el miocardio sano, solo aparecen después de una lesión cardíaca.¹⁹¹ Éstos se reconocen porque sintetizan marcadores que no son expresados en fibroblastos quiescentes, como la α -actina de músculo liso (α -SMA).^{192,193}

Esta diferenciación a miofibroblastos está regulada por varios mediadores, como algunas citoquinas liberadas en el sitio de la lesión (IL-6, IL-1 β , TNF- α), el PDGF y ciertas hormonas vasoactivas (Ang II y ET-1); sin embargo, es el factor de crecimiento transformante β tipo 1 (TGF- β_1), junto con su cofactor, el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), quienes tienen un papel central en la activación de estas células profibróticas.¹⁹⁴⁻¹⁹⁹ Así, durante la lesión del corazón y en presencia de ciertos factores, se produce la activación y proliferación de los fibroblastos residentes en el tejido cardíaco, dando lugar a la producción de colágeno fibrilar.^{200,201} Además, los miofibroblastos también provienen de otras fuentes, como ocurre con la diferenciación de células epiteliales, mediante el proceso denominado transición epitelial-mesenquimal (EMT);²⁰² la diferenciación de células endoteliales (transición endotelial-mesenquimal (EndMT));^{203,204} la diferenciación de células de la médula ósea (monocitos y fibrocitos), que son reclutadas al sitio de la lesión;²⁰⁵ y la activación y proliferación de pericitos⁽²⁾.²⁰⁶

Por todo esto, la transformación de los fibroblastos a miofibroblastos desplaza el equilibrio de la renovación de la MEC, aumentando la síntesis y acumulación de deposiciones fibróticas y conduciendo a un deterioro general de la función cardíaca.

3.3. Factor de crecimiento transformante β tipo I (TGF- β_1)

El TGF- β es una citoquina multifuncional que está implicada en una amplia variedad de procesos biológicos, como el crecimiento y la diferenciación celular, la proliferación celular y la apoptosis, la producción y deposición de tejido fibroso, y la regulación de la respuesta inmune.^{195,207-209} Se han descrito tres isoformas de esta citoquina (β_1 , β_2 , y β_3), siendo TGF- β_1 la más abundante en mamíferos.^{208,209} El TGF- β_1 está presente en células endoteliales, VSMC, miofibroblastos y células hematopoyéticas.²¹⁰ Se expresa en altos niveles en el corazón, tanto durante el desarrollo embrionario como en la vida adulta. En ratones adultos, TGF- β_1 se localiza tanto en los cardiomiocitos como en la matriz extracelular.²⁰⁹

El TGF- β_1 , una vez activado, se une a sus receptores tipo I y tipo II, desencadenando una cascada de señalización gracias a la fosforilación de las proteínas Smad-2 y Smad-3.^{209,211}

⁽²⁾ Células de origen mesenquimal que están íntimamente implicadas en el desarrollo, maduración, estabilización y remodelación de la vasculatura durante la angiogénesis y la homeostasis.

Estas Smad fosforiladas forman un trímero con Smad-4 y son translocadas al núcleo, donde regulan la expresión de genes relacionados con proteínas de la MEC, proliferación celular y respuesta inmune.²¹² Por otro lado, la unión del TGF- β_1 a sus receptores también produce un aumento en la expresión de Smad-7, que tiene un efecto represor sobre esta vía.^{213,214} Así, se ha mostrado cómo Smad-7, además de tener un efecto regulador en la vía TGF- β /Smad, ejerce una acción antifibrótica y antiinflamatoria²¹⁵ (figura 8).

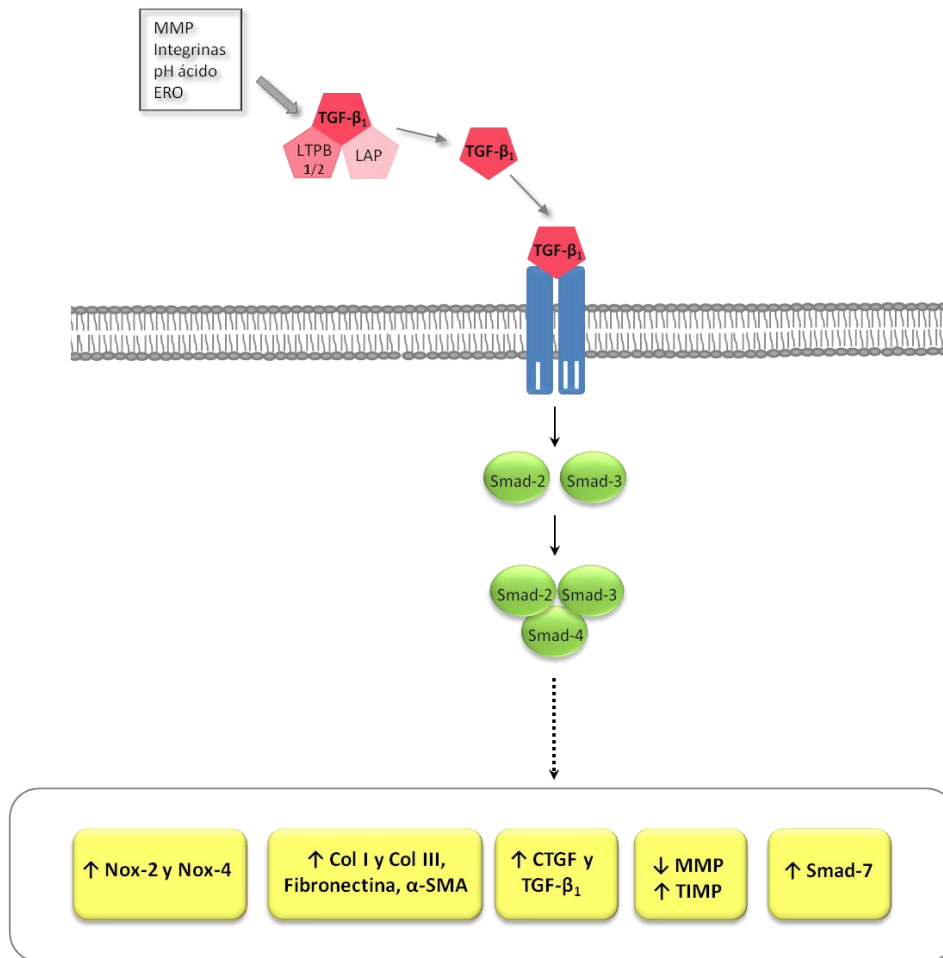


Figura 8. Activación y mecanismo de acción del TGF- β_1 . En la figura se muestran los diferentes estímulos que actúan sobre el pro-TGF- β_1 , permitiendo su liberación y la unión a sus receptores, desencadenando así vías de señalización dependientes de las Smad. El TGF- β_1 participa en la estimulación de la síntesis de la MEC e inhibe la vía encargada de su degradación. α -SMA: alfa-actina de músculo liso; Col: colágeno; CTGF: factor de crecimiento de tejido conectivo; ERO: especies reactivas del oxígeno; LAP: proteína asociada de latencia; LTPB $\frac{1}{2}$: proteína de unión al TGF- β latente; MMP: metaloproteinasas de la matriz; Smad: *small mothers against decapentaplegic*; TIMP: inhibidores tisulares de las metaloproteinasas.

Por lo tanto, el TGF- β_1 es un factor clave que participa en la conducción de la fibrosis miocárdica a través de la activación de la vía de las Smad. Ejerce múltiples acciones profibróticas, incluyendo la conversión fenotípica de fibroblastos a miofibroblastos,^{195,216,217} y la transcripción de varios tipos de genes encargados de la formación de la MEC, como

procolágeno, fibronectina y el CTGF.^{167,179,194,209} Estos efectos potentes y consistentes de TGF- β_1 se han demostrado también en experimentos *in vitro*. Tal es el caso de cultivos de fibroblastos cardíacos de rata y humanos, donde TGF- β_1 aumentó la síntesis de colágeno tipo I y tipo III y disminuyó la expresión de colagenasa (MMP-1), entre otros.²¹⁸⁻²²⁰ Kuwahara y col.,²²¹ en un modelo de ratas hipertensas, observaron que la inhibición de TGF- β_1 resultó en la desaparición de la fibrosis miocárdica y revirtió la disfunción diastólica. En varios modelos roedores de HTA, la fibrosis cardíaca producida fue acompañada por un aumento en los niveles proteicos de TGF- β_1 y CTGF en el ventrículo izquierdo.²²²⁻²²⁴

El TGF- β_1 , a su vez, requiere del mencionado cofactor CTGF para su función profibrótica. El CTGF, también conocido como CCN2, es una proteína multifuncional cuyas actividades biológicas incluyen la regulación y la síntesis de MEC, regulación de la proliferación/apoptosis celular, angiogénesis, migración, adhesión y fibrosis.^{130,195,225-228} El CTGF es estimulado por una gran variedad de factores y moléculas, entre los que se encuentran TGF- β_1 , Ang II, ET-1, altas concentraciones de glucosa, hipoxia, estrés mecánico y estrés oxidativo.^{222,224,229-232} Se ha descrito que CTGF y TGF- β_1 actúan de manera sinérgica para promover la fibrosis crónica. El CTGF se une directamente al TGF- β_1 incrementando la afinidad de éste por sus receptores, por lo que sus respuestas son más intensas y prolongadas.²³³ Además, la producción endógena de CTGF por el TGF- β_1 lleva a una supresión transcripcional de Smad-7, perpetuándose de este modo la activación de la señalización del TGF- β_1 .²²⁵ Se sabe que CTGF, por sí solo, es capaz de activar a los fibroblastos e incrementar la expresión de colágeno en el corazón, aunque necesita al TGF- β_1 para provocar el desarrollo de fibrosis.^{130,195} Los niveles de CTGF se correlacionan con el grado de severidad de la fibrosis.

De esta forma, y como se ha explicado anteriormente, el TGF- β_1 juega un papel principal en la patogénesis de la fibrosis, y las ERO median muchos de los efectos de dicha citoquina. De este modo, aparte de las propiedades del TGF- β_1 relacionadas directamente con la deposición de las proteínas de la MEC, su acción también se ha relacionado con un aumento de las ERO, mediante la acción de esta citoquina sobre la expresión génica de las subunidades de la NADPH oxidasa (figura 8). Existen estudios que muestran que el TGF- β_1 activa la expresión génica de Nox4^{78,234} y Nox2.^{96,235,236} Así, un estudio realizado por Cucoranu I y col.,²³⁷ muestra un papel fundamental de Nox4 en la fibrogénesis y en la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos; y Grieve y col.²³⁸ observan cómo Nox2 contribuye al desarrollo de disfunción contráctil cardíaca y fibrosis intersticial en respuesta a una situación de sobrecarga de presión. Por tanto, podemos concluir que TGF- β_1 está

altamente relacionado con la fisiopatología de la HTA, no solo por su participación en el desarrollo de la fibrosis cardiaca, sino también por su efecto sobre la generación de ERO.

4. L-CARNITINA

La L-carnitina (LC) (L-3-hidroxi-4-N,N,N-trimetilamoniobutirato) es un derivado aminoacídico presente en la mayoría de los organismos eucarióticos.²³⁹ Es un compuesto altamente polar y soluble en agua (figura 9).

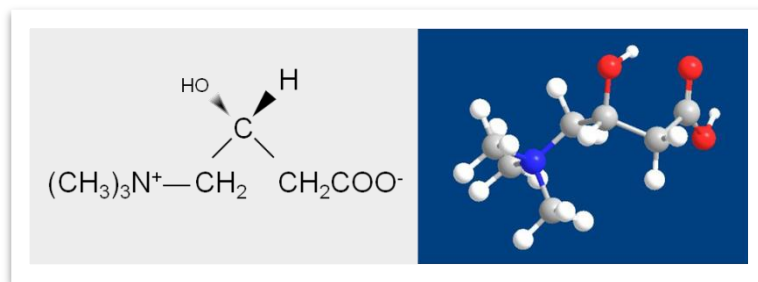


Figura 9. Estructura química de la L-carnitina

4.1. Biosíntesis y metabolismo

La LC se sintetiza biológicamente a partir de los aminoácidos lisina y metionina, siendo la vitamina B₆, la vitamina C y el hierro esenciales para su síntesis.^{103,240} El 25% de la LC que nuestro organismo necesita es biosintetizada en el hígado, los riñones y el cerebro, y el 75% restante la obtenemos con la ingesta de alimentos como los huevos, la carne roja, el pescado y los lácteos.

La LC es absorbida en el intestino de forma activa hacia el interior del enterocito a través de los transportadores de membrana *Organic Cation Transporter Novel* (OCTN), y atraviesa después la membrana basolateral de forma pasiva hacia el torrente sanguíneo, donde la concentración de LC en humanos suele ser de 20-50 μM.²⁴¹⁻²⁴³ Tras su absorción, la LC se distribuye a través de los tejidos, de manera que el 98% se localiza en el músculo estriado y el músculo cardiaco, el 1,7% en el hígado y los riñones, y el resto en fluidos extracelulares y otros tejidos. En humanos, los niveles de la LC en plasma están regulados por la adquisición con la dieta, la tasa de biosíntesis, y también por una eficiente reabsorción renal. Así, en condiciones normales, el 98% de la LC filtrada en el glomérulo renal es reabsorbida gracias a la presencia de los transportadores OCTNs, principalmente OCTN2, en el epitelio renal.²⁴³ La reabsorción de LC es más eficiente conforme menor es su ingesta, independientemente de la tasa de filtración glomerular. De manera inversa, la excreción de LC aumenta (ya que su reabsorción disminuye) cuando la carga de LC filtrada aumenta por encima del rango

normal. Se trata, pues, de una respuesta adaptativa para mantener la concentración circulante de LC dentro del estrecho margen fisiológico.^{242,243}

De manera aproximada, el 80% de LC del organismo se encuentra de forma libre, y el resto está esterificada (es decir, como acilcarnitina) con ácidos grasos de cadena larga o corta.²⁴⁴ Dentro de las acilcarnitinas de cadena corta se encuentran la propionil-L-carnitina y la acetil-L-carnitina, siendo esta última capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.

4.2. Funciones fisiológicas

La función principal de la LC 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. Esta función de la LC es de vital importancia en el sistema cardiovascular, donde la oxidación de ácidos grasos de cadena larga es la principal fuente de ATP.²⁴⁵

Por otro lado, la LC es necesaria para evitar la acumulación de triglicéridos en sangre, ya que mantiene elevados los niveles citoplasmáticos de coenzima A libre (CoASH). El aumento de CoASH favorece la acción del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH), y de esta manera se favorece el acoplamiento entre la glucólisis y la oxidación de la glucosa, se mantienen estables los niveles de glucógeno en el hígado, y se reducen la producción de ácido láctico y amonio, compuestos que causan daños en el organismo.²⁴⁶

De manera adicional, la LC, gracias a la formación de sus ésteres de cadena larga, se considera no solo un *transportador* de energía metabólica sino también un *almacén* de dicha energía.²⁴⁷ Por todo lo mencionado anteriormente, la LC es esencial para el buen funcionamiento del organismo, y sus deficiencias tienen graves consecuencias para la salud, como se expone a continuación.

4.3. 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. Hay que señalar que 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.²⁴⁸

Las deficiencias de LC se pueden clasificar en deficiencia primaria y deficiencia secundaria. La **deficiencia primaria** de LC tiene su origen en una mutación recesiva en el gen del

transportador de carnitina, OCTN2. Estos pacientes poseen alteraciones en la reabsorción renal de la LC y en su transporte hacia los tejidos.²⁴⁹⁻²⁵¹ La **deficiencia secundaria** de LC puede tener diversos orígenes. Entre ellos destaca la administración de ciertos fármacos, como ácido piválico (presente en ciertos antibióticos)²⁵² o ácido valpróico (antiepiléptico);²⁵³ pacientes con un daño renal grave que afecte a la reabsorción tubular;²⁵⁴ pacientes sometidos a hemodiálisis;^{245,254} pacientes con cáncer;^{255,256} anorexia,²⁵⁶ y pacientes sometidos a nutrición enteral,²⁵⁷ entre otros.

Algunos de los síntomas asociados a la deficiencia de LC son: acidosis metabólica, hepatomegalia e insuficiencia hepática, hipertrigliceridemia, hiperamonemia (sobre todo en niños), miopatía esquelética, fatiga, cardiomiopatía y arritmias, entre otros.^{249,250}

4.4. Aplicaciones clínicas

La LC 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 LC afectan principalmente al músculo esquelético y al corazón, ya que su principal fuente de energía son los ácidos grasos, como hemos comentado. Por esta razón, el tratamiento con LC está especialmente indicado en enfermedades musculares y cardiovasculares.²³⁹ En concreto, la administración farmacológica de LC está actualmente aprobada en España para el tratamiento de isquemia miocárdica (aguda y crónica), miocardiopatías producidas por adriamicina y antidepresivos tricíclicos, miopatías y cardiomiopatías producidas por carencia de L-carnitina, y pérdidas de L-carnitina durante el tratamiento hemodialítico⁽³⁾.

Además de lo anterior, existe una gran cantidad de estudios que muestran efectos beneficiosos de la suplementación con LC en distintas patologías como el cáncer,²⁵⁸ la enfermedad de Parkinson,²⁵⁹ enfermedades cardiovasculares,²⁶⁰ y diabetes,²⁴² entre otras.

En los últimos años ha aumentado también el número de estudios relacionados sobre el efecto de la LC en pacientes que sufren desordenes neurodegenerativos, como enfermedad de Alzheimer,^{261,262} depresión,²⁶² autismo²⁶³ o enfermedad de Huntington,²⁵³ entre otros. Otras de las aplicaciones clínicas de la LC son las relacionadas con los desórdenes nutricionales (como la anorexia)²⁵⁶ y la fatiga crónica (sobre todo en pacientes con

⁽³⁾ www.vademecum.es

cáncer).²⁵⁸ En estos casos, la LC ha mostrado una acción ergogénica y de aumento de la masa muscular, ya que disminuye la proteólisis muscular y aumenta el apetito.²⁵⁸

A diferencia del consenso generalizado en lo que respecta al beneficio de la LC en pacientes con una deficiencia demostrada de este compuesto, los estudios relativos a su uso en personas con niveles normales de carnitina no son tan concluyentes. Sin embargo, los datos más recientes parecen apoyar la idea de que la suplementación con LC puede ejercer efectos beneficiosos en diferentes patologías en las que no existe carencia de LC.²⁶⁴⁻²⁶⁶ Entre estas acciones beneficiosas de la LC caben destacar sus efectos antioxidante, anti proliferativo, antiinflamatorio, antiapoptótico y antifibrótico.²⁶⁷⁻²⁷¹

Existen numerosos grupos de investigación, entre ellos el nuestro, que llevan años estudiando los efectos beneficiosos de la LC en la HTA y en el daño orgánico subyacente. Aunque los mecanismos por los cuales la LC ejerce su acción antihipertensiva son aún objeto de estudio, es un hecho aceptado que la LC tiene efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antifibróticos que la convierten en una molécula interesante desde el punto de vista terapéutico.

La LC ha mostrado ser capaz de mejorar las cifras de presión arterial en distintos modelos de HTA. Estudios realizados por Gómez-Amores y col.^{272,273} mostraron cómo la LC redujo significativamente las cifras de presión arterial en un modelo de ratas genéticamente hipertensas (*spontaneously hypertensive rats*, SHR). Resultados similares se han encontrado en otros modelos de animales con HTA, como en ratas alimentadas con una dieta con alto contenido en fructosa,²⁷⁴ o en ratas tratadas con L-NAME (NG-nitro-L-arginina metil éster), compuesto inhibidor de la síntesis de óxido nítrico.^{268,269}

Muchas de las propiedades beneficiosas de la LC parecen provenir de su demostrada **capacidad antioxidante** en diversas condiciones adversas que cursan con elevados niveles de estrés oxidativo, como ocurre en algunas situaciones que producen fallo crónico renal.²⁷¹ Nuestro grupo de investigación ha demostrado el efecto antioxidante de la LC en diferentes modelos de ratas hipertensas, observándose una mejora en el estado oxidativo sistémico y cardiaco de estas ratas tras la administración de LC.^{241,268,273,275} La administración de LC a ratas con HTA inducida por administración de fructosa aumenta los niveles plasmáticos de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx, así como de las vitaminas C y E.²⁷⁴ Además, la LC actúa como sustancia depuradora de radicales libres,²⁷⁶ protegiendo a las células de las acciones tóxicas de las ERO.²⁷⁷

Por otra parte, se ha demostrado el efecto protector de la LC en la cardiomiopatía producida por la administración de doxorubicina, un fármaco ampliamente utilizado en la quimioterapia anticancerígena. Parece ser que este efecto es también debido a las propiedades antioxidantes de la LC, ya que ésta es capaz de disminuir los niveles de peroxidación lipídica y aumentar los niveles de GSH en el tejido cardiaco de ratas tratadas con doxorubicina.^{278,279} Efectos similares han sido encontrados en riñón²⁸⁰ y en hígado²⁸¹ de ratas expuestas al tratamiento con el citado antitumoral. Adicionalmente, Sayed-Ahmed y col.²⁸² pusieron de manifiesto que el uso de la LC para prevenir el daño metabólico inducido por la doxorubicina no interfería con la actividad antitumoral del fármaco.

Otra de las características asociadas a la acción de la LC es su **efecto antiinflamatorio**. Este efecto se ha relacionado con una reducción a nivel sistémico de citoquinas proinflamatorias, como IL-6, IL-1 β o TNF- α .²⁸³ Un estudio realizado en pacientes urémicos tratados con 20 mg/kg de LC al finalizar su sesión de diálisis durante un periodo de 6 meses, resultó en un decremento notable en los niveles de la citoquina proinflamatoria PCR. Los autores concluyeron que, en pacientes con trastornos renales, los beneficios clínicos del tratamiento con LC se deben, en gran medida, a su acción antiinflamatoria.²⁸⁴ Nuestro grupo de investigación ha demostrado, en ratas con hipertensión inducida por la administración de L-NAME, que la LC consigue disminuir los niveles de las citoquinas proinflamatorias a nivel cardiaco, proponiéndose una relación del factor de transcripción NF- κ B en el efecto antiinflamatorio de la LC.^{269,285}

Por último, también se han descrito **propiedades antifibróticas** de la LC en diferentes modelos de ratas hipertensas. Así, el tratamiento con LC atenuó el remodelado cardiaco y la acumulación de componentes de la MEC observado en un modelo experimental de hipertensión por administración de deoxicorticosterona y sal (ratas hipertensas DOCA-sal),²⁶⁶ así como en ratas tratadas con L-NAME.²⁶⁷ En este último trabajo, el efecto antifibrótico de la LC fue acompañado por una disminución en las citoquinas profibróticas TGF- β y CTGF. Otro estudio llevado a cabo por Chao y col.,²⁸⁶ muestra cómo el tratamiento con LC atenúa la proliferación de fibroblastos en corazón de ratas tratadas con Ang II.

Hipótesis y Objetivos

1. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO

Ya que el sunitinib no solo es uno de los fármacos más importantes para el tratamiento del carcinoma de células renales y tumores del estroma gastrointestinal resistentes a imatinib, sino que además está siendo evaluado actualmente para una amplia variedad de tumores sólidos -incluyendo cánceres de mama, pulmón y colorrectales-, resulta de gran trascendencia encontrar un medio de impedir o paliar sus efectos adversos, especialmente a nivel cardiovascular. Por ello, y en función de los antecedentes beneficiosos derivados de la suplementación con L-carnitina en diversas patologías que afectan, entre otros, al sistema cardiovascular, nuestra hipótesis de trabajo es que el tratamiento con L-carnitina podría actuar aminorando o evitando la cardiotoxicidad del sunitinib.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Nuestro objetivo general es demostrar que el tratamiento añadido con L-carnitina mejora ciertos efectos adversos generales, las cifras de presión arterial y los parámetros de estrés oxidativo, inflamación y fibrosis, en ratas tratadas con sunitinib.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Estudiar los efectos del sunitinib sobre el peso corporal y sobre el peso/índice cardiacos en ratas sometidas a un tratamiento crónico con este fármaco, y discutir las modificaciones producidas, en su caso, al añadir L-carnitina de manera simultánea al tratamiento con sunitinib.
- 2) Evaluar las modificaciones de las cifras de presión arterial sistólica y diastólica, y de la frecuencia cardiaca, en ratas tratadas con sunitinib, así como los efectos de la inclusión de L-carnitina sobre dichas variables.
- 3) Examinar la capacidad antioxidante a nivel sistémico, determinando diferentes enzimas implicadas en la defensa antioxidante del organismo (GPx, GR y SOD), en ratas tratadas con sunitinib y las modificaciones producidas con el tratamiento combinado de sunitinib más L-carnitina.
- 4) Evaluar el estado oxidativo a nivel cardiaco analizando: i) la actividad de las enzimas mencionadas en el punto anterior, así como su expresión génica y proteica, en corazón; ii) los niveles de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG), así como la relación

GSH/GSSG en corazón; iii) el grado de peroxidación lipídica y la nitrosilación de proteínas, como marcadores de estrés oxidativo en corazón; iv) los niveles de óxido nítrico y la expresión génica y proteica de la eNOS en corazón; v) la expresión génica de la iNOS en corazón; y vi) la expresión génica y proteica de la subunidad Nox2 de la enzima NADPH oxidasa en corazón. En todos los casos, se compararán los resultados obtenidos en ratas tratadas con sunitinib con los procedentes de ratas tratadas con sunitinib más L-carnitina.

5) Evaluar el proceso de inflamación a nivel cardiaco, determinando la expresión génica de diversas moléculas de relevancia en los procesos inflamatorios (IL-1 β , IL-6 e IL-10) en ratas tratadas con sunitinib, y analizar las modificaciones producidas, en su caso, con el tratamiento combinado de sunitinib más L-carnitina.

6) Examinar el grado de fibrosis a nivel cardiaco por medio de: i) estudio histológico del tejido cardiaco, empleando tinciones adecuadas para visualizar las fibras de colágeno y cuantificar el grado de fibrosis; ii) cuantificación de la expresión génica de las fibras de colágeno en los tejidos cardiacos; y iii) cuantificación de la expresión génica de los factores profibróticos TGF- β_1 y CTGF en corazón. Los resultados procedentes de ratas tratadas con sunitinib se procesarán en comparación con los obtenidos en ratas tratadas con sunitinib más L-carnitina.

7) Estudiar la posible implicación de la endotelina-1 (ET-1) y de los factores de transcripción NF- κ B y PPAR- γ en los mecanismos de acción de la L-carnitina frente a la cardiotoxicidad inducida por sunitinib.

Materiales y Métodos

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y TRATAMIENTOS

Para la realización de este proyecto se ha llevado a cabo un estudio de tipo experimental en ratas macho de la cepa Wistar, procedentes del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla y con un peso aproximado de 280-350 gramos. Las ratas fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes grupos (10 animales por grupo):

- 1.- Grupo control (que representaremos como WISTAR).
- 2.- Tratadas con LC a dosis de 400 mg/Kg de peso corporal/día, disuelta en el agua de bebida (grupo WLC).
- 3.- Tratadas con sunitinib a dosis de 25 mg/Kg de peso corporal/día, disuelto en el agua de bebida (grupo WSU).
- 4.- Tratadas con sunitinib + LC a las mismas dosis y vía de administración referidas para los grupos 2 y 3 (grupo WSULC).

La LC se ha administrado durante 10 semanas, mientras que el sunitinib se ha administrado en las últimas 8 semanas (es decir, su administración comenzó 2 semanas más tarde que la de la LC).

Los animales de experimentación se han mantenido en el estabulario de la Facultad de Farmacia, en condiciones estandarizadas de temperatura y luminosidad ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 12 h luz/12 h oscuridad), con libre acceso al agua de bebida (en la cual iba disuelto el tratamiento, en su caso) y alimentadas con pienso estándar. Además, 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 poder ajustar los correspondientes tratamientos a las dosis indicadas. Todos los procedimientos llevados a cabo cumplen con la normativa vigente (internacional, nacional y autonómica) relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos⁽⁴⁾.

⁽⁴⁾ Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 (DOUE núm. L 276 de 20 de octubre). Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero de 2013 (BOE núm. 34 de 8 de febrero). Decreto 80/2011 de 12 de abril (BOJA núm. 82 de 28 de abril).

2. PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS

- ❖ β -Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato, forma reducida (NADPH), *Sigma-Aldrich*, EE.UU. Art. N-6505
- ❖ 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP), *Sigma-Aldrich*, EE.UU. Art. T-1642
- ❖ 1-Butanol, *Panreac*, España. Art. 141082
- ❖ Ácido 2-tiobarbitúrico, *Sigma-Aldrich*, EE.UU. Art. T-5500
- ❖ Ácido acético glacial, *Panreac*, España. Art. 141008
- ❖ Ácido bórico, *Merck*, Alemania. Art. 1.00165.0500
- ❖ Ácido clorhídrico, *Panreac*, España. Art. 141019
- ❖ Ácido etilendiaminotetraacético disódico (EDTA·Na₂), *Sigma-Aldrich*, EE.UU. Art. E-1644
- ❖ Ácido ortofosfórico 85%, *Merk*, Alemania. Art. 1005731000
- ❖ Ácido polioxietilenosorbitano monolaurato (Tween[®] 20), *Sigma-Aldrich*, EEUU. Art. P1379
- ❖ Adhesivo para preparaciones histológicas (Neo-Mount[®]), *Merk*, Alemania. Art. 1.09016.0500
- ❖ Agua-DEPC, *Invitrogen*, EE.UU. Art. AM9906
- ❖ Albúmina de suero bovino (BSA), *Sigma-Aldrich*, EE.UU. Art. A-6793
- ❖ Anticuerpo anti-eNOS (pS1177), *BD Transduction Laboratories*, EE.UU. Art. 612392
- ❖ Anticuerpo anti-eNOS, *BD Transduction Laboratories*, EE.UU. Art. 610296
- ❖ Anticuerpo anti-GAPDH, *Sigma-Aldrich*, EEUU. Art.G8795
- ❖ Anticuerpo anti-GPx, *Santa Cruz Biotechnology*, EE.UU. Art. sc-30147
- ❖ Anticuerpo anti-GR, *Santa Cruz Biotechnology*, EE.UU. Art. sc-32886
- ❖ Anticuerpo anti-mouse IgG-HRP, *Santa Cruz Biotechnology*, EE.UU. Art. sc-2031
- ❖ Anticuerpo anti-Nox2, *BD Transduction Laboratories*, EE.UU. Art. 611414
- ❖ Anticuerpo anti-NT, *Upstate-Biotechnology-Millipore*, EE.UU. Art. 05-233
- ❖ Anticuerpo anti-rabbit IgG-HRP, *Santa Cruz Biotechnology*, EE.UU. Art. sc-2030

- ❖ Anticuerpo anti-SOD, *Santa Cruz Biotechnology*, EE.UU. Art. sc-11407.
- ❖ *Aspergillus* nitrato reductasa, *Roche*, Alemania. Art. 10981249001
- ❖ Azul de bromofenol, *Sigma-Aldrich*, EE.UU. Art. B-8026
- ❖ *Bio-Rad Protein Assay*, *Bio-Rad Laboratories*, Alemania. Art. 500-0006
- ❖ Butilhidroxitolueno (BHT), *Sigma-Aldrich*, EE.UU. Art. B-1378
- ❖ Cloroformo, *Sigma-Aldrich*, EE.UU. Art. C-2432
- ❖ Cloruro sódico, *Sigma-Aldrich*, EE.UU. Art. S-9888
- ❖ Coctel inhibidor de proteasas, *Roche*, Alemania. Art. 11697498001
- ❖ Dodecil sulfato sódico (SDS), *Sigma-Aldrich*, EE.UU. Art. L-4509
- ❖ DPBS, *Invitrogen*, España. Art. 14190-250
- ❖ *ECL Prime™ Western Blotting Detection Reagent*, *GE Healthcare Life Sciences*, Reino Unido. RPN 2232.
- ❖ Etanol absoluto, *Merck*, Alemania. Art. 1.00983.1000
- ❖ *FastStart SYBR Green Master*, *Roche*, Alemania. Art. 04673514001
- ❖ Formaldehído, *Panreac*, España. Art. 131328.1211
- ❖ Fosfato potásico dibásico, *Panreac*, España. Art. 121512
- ❖ Fosfato potásico monobásico, *Panreac*, España. Art. 141509
- ❖ Gammaglobulina bovina, *Bio-Rad Laboratories*, Alemania. Art. 500-0005
- ❖ Glicerol, *Sigma-Aldrich*, EE.UU. Art. G-5516
- ❖ Glicina, *Sigma-Aldrich*, EE.UU. Art. G-8898
- ❖ Glucosa 6-fosfato (G6P), *Roche*, Alemania. Art. 127647
- ❖ Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), *Sigma-Aldrich*, EE.UU. Art. G-5760
- ❖ Glutación peroxidasa (kit comercial), *Randox Laboratories*, Reino Unido. Art. RS 505
- ❖ Glutación reducido/Glutación oxidado (GSH/GSSG) (kit comercial), *Oxis Research™*, Foster City, EE.UU. Art. 21040
- ❖ Glutación reductasa (kit comercial), *Cayman Chemical Company*, EE.UU. Art. 703202
- ❖ Hemoglobina, *Sigma-Aldrich*, EE.UU. Art. H-3883

- ❖ Hidróxido sódico, *Panreac*, España. Art. 141687
- ❖ *High-Capacity cDNA Archive kit*, *Applied Biosystems*, España. Art. 4322171
- ❖ Isopropanol, *Sigma-Aldrich*, EE.UU. Art. I-9516
- ❖ Kit Tricrómico de Masson, *Merk*, Alemania. Art. 1.00485
- ❖ L-carnitina, *Roig Farma*, España. Art. 32183-25
- ❖ Leche desnatada en polvo, *Bio-Rad Laboratories*, EEUU. Art. 210001991
- ❖ Marcador de peso molecular, *Bio-Rad laboratories*, EE.UU. Art. 161-0373
- ❖ Metanol, *Panreac Química*, España. Art. 131091
- ❖ *Mini-PROTEAN[®] TGX[™]*, *Bio-Rad laboratories*, EE.UU. Art. 456-1093
- ❖ Nitrito sódico, *Merck*, Alemania. Art. 6549
- ❖ Parafina, *Paraplast Plus*, España. Art. 400.10
- ❖ *Ponceau S*, *Sigma-Aldrich*, EE.UU. Art. P-3504
- ❖ Reactivo de Drabkin para determinación de hemoglobina, *Spinreact*, España. Art. 1001230
- ❖ Reactivo de Griess-Ilosvays, *Merck*, Alemania. Art 1090230500
- ❖ Rojo Sirio (Direct Red 80), *Sigma-Aldrich*, EEUU. Art.365548
- ❖ Sunitinib Malato, *LC Laboratories*, EE.UU. Cat. No. S-8803
- ❖ Superóxido dismutasa (kit comercial), *Randox Laboratories*, Reino Unido. Art. SD 125
- ❖ Tampón de muestra, *Laemmli 2x concentrate*, *Sigma-Aldrich*, EE.UU. Art. S-3401.
- ❖ Tolueno, *Prolabo*, España. Art. 286775.294
- ❖ Tris-hidroximetil-aminometano (TRIZMA[®], Tris), *Sigma-Aldrich*, EE.UU. Art. T-1378
- ❖ TRizol[®], *Invitrogen*, EE.UU. Art. 15596018
- ❖ Xilol, *Panreac*, España. Art. 131769

3. CONTROL DE LA PRESIÓN ARTERIAL

Durante todo el periodo experimental se ha realizado un seguimiento semanal de las cifras de presión arterial sistólica y diastólica y de la frecuencia cardiaca de los animales. Esta medida se ha llevado a cabo mediante el método indirecto de oclusión en la cola. Para ello, se utiliza un medidor de presión NIPREM 645 (CIBERTEC, España) acoplado a un sistema de recogida de datos con soporte informático.

El procedimiento a seguir es el siguiente: los animales son inmovilizados 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 10). 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.

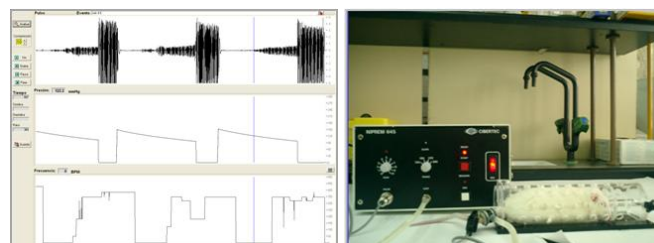


Figura 10. Instrumental utilizado para la medición de la presión sanguínea en los cuatro grupos experimentales de ratas. En la figura de la izquierda se aprecia la pantalla de análisis de registros; la imagen de la derecha ilustra el montaje para la adquisición de datos mediante el método indirecto de la oclusión de la cola, utilizando el registrador NIPREM 645.

4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE ESTUDIO

Una vez finalizado el periodo de tratamiento, se procede al sacrificio de los animales para la obtención de sangre y posterior extracción del corazón (órgano objeto de nuestro estudio). Los animales, previo ayuno de 12-15 horas, se anestesian con pentobarbital sódico (50 mg/kg, vía intraperitoneal). A continuación, antes de proceder a la extirpación del corazón, se recogen 4 mL de sangre, obtenidos mediante punción cardiaca directa con agujas de calibre 0,26x25 mm (23G), sobre tubos heparinizados. Esta sangre se usa para determinar la concentración de hemoglobina y la actividad de las enzimas antioxidantes en eritrocitos. Las muestras se congelan en varias alícuotas por inmersión en nitrógeno líquido, y se mantienen a -80°C hasta el momento de su uso.

Una vez extraída la sangre, se procede a la extirpación del corazón. Éste se disecciona de manera longitudinal, de tal forma que una parte del corazón se utiliza para la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes y para los estudios de expresión génica y proteica, y la otra parte del corazón se destina para estudios histológicos. Para el primer fin, se aísla 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 congela por inmersión en nitrógeno líquido, conservándose a -80°C hasta su uso. En el segundo caso, el órgano se somete a un proceso de inmersión en parafina que se describe detalladamente en el apartado 7.1.

5. ANÁLISIS EN ERITROCITOS

5.1. Determinación de hemoglobina

La determinación de hemoglobina se ha realizado por una técnica espectrofotométrica basada en el método descrito por Drabkin (1965).²⁸⁷ 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.

Reactivos

- Reactivo 1 (Reactivo de Drabkin 50X):

Ferricianuro potásico	0,6 mM
Cianuro potásico	0,9 mM
Dihidrógeno fosfato potásico	2 mM

- Solución estándar de Hemoglobina:

Hemoglobina.....	15 g/dL
------------------	---------

Protocolo experimental

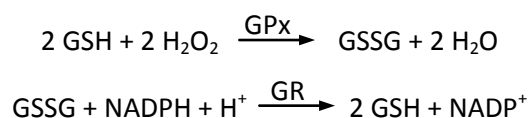
Se diluye el reactivo de Drabkin concentrado añadiendo 245 mL de agua bidestilada a 5 mL del reactivo 1⁽⁵⁾. A continuación, sobre cubetas macro de 4 mL de capacidad se añaden 2,5 mL del reactivo de Drabkin diluido y 10 µL de sangre heparinizada (o de la solución estándar de hemoglobina, en su caso), 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 de las absorbancias (A) a 540 nm.

El cálculo de la concentración (C) de hemoglobina en las muestras se realiza de la siguiente forma:

$$C_{\text{hemoglobina}} \text{ (g/dL)} = [A_{\text{muestra}}/A_{\text{estándar}}] \times C_{\text{estándar}} \text{ (15 g/dL)}$$

5.2. Determinación de la actividad glutatión peroxidasa (GPx)

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).²⁸⁸ Este método se basa en que esta enzima cataliza la oxidación de glutatión (GSH) por cumeno hidroperóxido. En presencia de glutatión reductasa (GR) y de nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH), el glutatión 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:



⁽⁵⁾ La estabilidad de esta solución resultante es de 2 semanas a 2-8°C y protegida de la luz.

Reactivos

- Reactivo 1a (líoofilizado):

GSH.....	4mM
GR.....	0,5 U/L
NADPH.....	0,34 mM

- Solución tampón fosfato (reactivo 1b):

KH ₂ PO ₄ /KOH (pH = 7,2)	50 mM
EDTA	4,3mM

- Solución cumeno hidroperóxido (reactivo 2):

Cumeno hidroperóxido	0,18 mM
----------------------------	---------

- Reactivo diluyente (reactivo 3)

Protocolo experimental

Se reconstituye un vial del reactivo 1a con 10 mL del reactivo 1b⁽⁶⁾. A continuación, se diluyen 10 µL del reactivo 2 con 10 mL de suero salino⁽⁷⁾. Por último, se reconstituye el reactivo 3 con 200 mL de agua bidestilada⁽⁸⁾. Una vez preparados los reactivos, se procede al ensayo de la siguiente forma:

Se utiliza una placa de 96 pocillos. En los pocillos se mezclan 4,7 µL de muestra (previa dilución 1/40 con reactivo 3), 236 µL de reactivo 1 y 9,4 µL de reactivo 2, y se agita con ayuda de un agitador de placas.

El blanco se procesa de manera análoga, pero sustituyendo los 4,7 µL de muestra por 4,7 µL de H₂O bidestilada. Inmediatamente, se mide la absorbancia inicial a 340 nm en un lector de placas, poniendo en marcha el cronómetro de forma simultánea. Después de 1, 2 y 3 minutos se repite la medida, cuidando siempre de restar a cada lectura el valor del blanco (en nuestro caso, el *software* del lector de placas se puede configurar para hacer esta operación de forma automática).

El cálculo de la actividad de la enzima GPx se realiza restando la absorbancia en T1 a la absorbancia en T2, y de la misma forma restamos T2 menos T3, para así obtener el

⁽⁶⁾ Esta mezcla (reactivo 1) es estable durante dos días a 2-8°C.

⁽⁷⁾ Estable hasta la fecha de caducidad indicada en el frasco comercial.

⁽⁸⁾ Estable durante 30 días a 2-8°C.

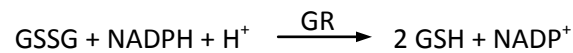
decremento de la absorbancia en un minuto ($\Delta A_{340}/\text{min}$). Se calcula la media entre los dos valores para cada muestra, y se estima la concentración de glutatión peroxidasa en unidades/L (U/L) a partir de la siguiente fórmula:

$$U/L = 8412 \times \Delta A_{340}/\text{min} \times \text{factor de dilución (40)}$$

Por último, para obtener las U/g de hemoglobina, se divide el resultado de la fórmula anterior entre la concentración de hemoglobina, determinada según se indica en el apartado 5.1.

5.3. Determinación de la actividad glutatión reductasa (GR)

Para la determinación de la actividad de la enzima GR se ha utilizado el kit comercial *Glutathione Reductase Assay Kit (Cayman Chemical Company, MI)*, basado en el método descrito por Calberg y Mannervik (1975).²⁸⁹ 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:



Preparación de la muestra

Se centrifugan 0,5 mL de sangre heparinizada a 900 g durante 5 minutos a 4°C, para separar y eliminar el plasma. A continuación, se lavan cinco veces los eritrocitos con 1,5 mL de solución de NaCl al 0,9%, centrifugando durante 5 minutos a 900 g después de cada lavado. El precipitado lavado de eritrocitos se lleva a 1 mL con agua bidestilada fría para forzar la hemólisis, dejando reposar 10 minutos a 4°C para posteriormente volver a centrifugar el lisado durante 15 minutos a 10.000 g y a 4°C.

Reactivos

- Reactivo 1 (tampón fosfato):

KH_2PO_4 (pH = 7,5) 50 mM

EDTA..... 1 mM

- Reactivo GSSG:

GSSG..... 9,5 mM

- Reactivo NADPH:

NADPH..... 0,17 mM

- Reactivo Glutati3n Reductasa (GR, control)

Protocolo experimental

Para preparar el blanco de muestra, se a~adan 120 μL de reactivo 1 y 20 μL de GSSG en tres pocillos. Tambi3n se prepara un control positivo, a~adiendo 100 μL de reactivo 1, 20 μL de GSSG y 20 μL de reactivo GR en otros 3 pocillos. En el caso de las muestras, se a~aden 100 μL de reactivo 1, 20 μL de GSSG y 20 μL de muestra, tambi3n por triplicado. Para obtener resultados reproducibles, la cantidad de GR a~adida a las muestras debera provocan un descenso en la absorbancia de entre 0,008 y 0,1 unidades por minuto.

La reacci3n se inicia a~adiendo 50 μL de NADPH en todos los pocillos. Se agita la placa durante unos segundos, y por 3ltimo se lee la absorbancia en cada minuto a 340 nm, de modo que se obtengan al final 5 medidas.

Para el c3lculo de la actividad de la enzima GR:

- Se calcula el cambio de absorbancia por minuto. Para ello, se seleccionan dos puntos de la porci3n lineal de la curva, y se determina el cambio de absorbancia durante ese tiempo a partir de la siguiente ecuaci3n:

$$\Delta A_{340}/\text{min} = [A_{340}(\text{tiempo 2}) - A_{340}(\text{tiempo 1})] / [\text{Tiempo 2 (min)} - \text{Tiempo 1 (min)}]$$

- Se determina el cambio de absorbancia por minuto para el blanco, y se resta al valor obtenido para las muestras.

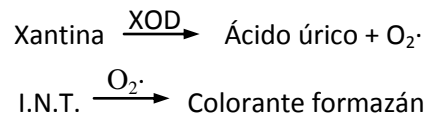
- Se usa la siguiente f3rmula para calcular la actividad GR, en la que el valor 0,00373 μM^{-1} corresponde a al coeficiente de extinci3n de NADPH:

Actividad GR = $[(\Delta A_{340}/\text{min}) / (0,00373 \mu\text{M}^{-1})] \times [0,19 \text{ mL} \times 0,02 \text{ mL}] \times \text{factor de dilución (2)} = \text{nmol}/\text{min}/\text{mL}$

- Posteriormente, se expresa el resultado de la actividad de la enzima en función de la cantidad de hemoglobina (U/g Hb), como se indica en el apartado anterior.

5.4. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD)

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.²⁹⁰ 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.

Preparación de las muestras

Se centrifugan 0,5 mL de sangre heparinizada durante 5 minutos a 900 g, 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 900 g después de cada lavado. El precipitado lavado de eritrocitos se completa con 2 mL de H₂O bidestilada fría y se deja reposar durante 15 minutos a 4°C.

Reactivos

- Solución diluyente Ransod:

$\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KOH}$ (pH = 7) 10 mM

- Sustrato mixto:

Xantina 0,05 mM

I.N.T. 0,025 mM

- Solución tampón:

CAPS⁽⁹⁾ (pH = 10,2)..... 40 mM

EDTA 0,94 mM

- Solución Xantina oxidasa:

Xantina oxidasa 80 U/L

- Solución patrón:

Patrón..... 3,88 U/mL

Protocolo experimental

Los eritrocitos lavados se diluyen (1/100) con la solución diluyente Ransod, de forma que el porcentaje de inhibición resultante oscile entre 30 y 60%. Por otro lado, se prepara una curva patrón con las siguientes concentraciones: 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 mezclan 0,015 mL de patrón o de la muestra de eritrocitos, según corresponda, con 0,5 mL de sustrato mixto, y se mezcla bien. Se añaden 0,075 mL de xantina oxidasa, se mezcla de nuevo y se leen las absorbancias a 505 nm. Las medidas se realizan a los 30 segundos (A₁), y de nuevo 3 minutos después (A₂).

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).

⁽⁹⁾ Ácido *N*-cyclohexyl-3-aminopropanosulfónico.

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, al igual que en el apartado anterior, se expresan en U/g de hemoglobina, teniendo en cuenta el factor de dilución de la muestra.

6. ANÁLISIS EN HOMOGENEIZADOS DE CORAZÓN Y ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA

6.1. Homogeneización del corazón

Reactivos

- Tampón de Homogeneización:

Tampón fosfato 50 mM ⁽¹⁰⁾	9 mL
Inhibidor de proteasas 10x (<i>Roche</i>)	1 mL

Protocolo experimental

El corazón, que permanecía conservado según se indica en el apartado 4, se homogeneiza (20% p/v) en tampón de homogeneización. Para esto, una vez pesado el tejido sin descongelar, se sumerge inmediatamente en el mencionado tampón, y se homogeneiza utilizando un homogeneizador con émbolo de teflón acoplado a un motor con una velocidad de giro de 2.500 r.p.m. Posteriormente, el homogeneizado se centrifuga a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C, para eliminar restos de orgánulos, y el sobrenadante se utiliza para la determinación de la concentración de proteínas, las enzimas antioxidantes, la peroxidación lipídica, la cantidad de óxido nítrico presente y para los estudios de expresión proteica mediante *Western blotting*.

⁽¹⁰⁾ K₂HPO₄ 30 mM, KH₂PO₄ 20 mM, EDTA 0,01 mM (pH = 7)

6.2. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas en homogeneizados de corazón se ha determinado siguiendo el método descrito por Bradford (1976),²⁹¹ utilizando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* (que contiene ácido fosfórico y metanol) y un estándar de gamma-globulina 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 1/50 con agua bidestilada), o de los estándares en su caso, con 250 μ L del reactivo de *Bio-Rad* (previamente diluido 1/5 con agua bidestilada y filtrado a través de un papel Whatman n^o 1) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se leen las absorbancias en el lector de placas (Asys UVM340) a 595 nm. La coloración es estable en un plazo de 50 minutos.

Las soluciones estándares se han preparado a partir de una solución madre de gamma-globulina bovina de concentración igual a 1,56 mg/mL. A partir de dicha solución madre se preparan seis soluciones patrón (P) cuyas concentraciones, expresadas en mg/mL, son: $P_1 = 0,0975$; $P_2 = 0,195$; $P_3 = 0,39$; $P_4 = 0,78$; $P_5 = 1,56$. 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, teniéndose también en cuenta el factor de dilución de las muestras.

6.3. Determinación de la actividad GPx

La actividad de esta enzima se ha determinado según el método descrito en el apartado 5.2, utilizando el kit de laboratorios *Randox* para la determinación de GPx. Seguimos el mismo protocolo descrito en dicho apartado, pero añadiendo en este caso 4,7 μ L de los homogeneizados de corazón, diluidos convenientemente de manera que equivalgan aproximadamente a 70 μ g de proteínas.

6.4. Determinación de la actividad GR

Para la determinación de la actividad de la enzima GR hemos seguido el kit comercial de laboratorios *Cayman* (ver apartado 5.3). Seguimos el mismo protocolo experimental descrito en dicho apartado, tomando en este caso 20 μ L de los homogeneizados de corazón, correspondientes aproximadamente a 600 μ g de proteínas.

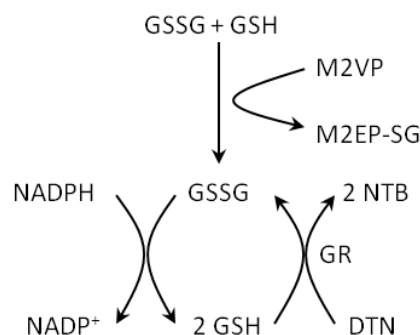
6.5. Determinación de la actividad SOD

Para la determinación de la actividad de esta enzima se ha utilizado el kit comercial de laboratorios *Randox* (ver apartado 5.4). Se sigue el mismo protocolo experimental, utilizando en este caso 15 μL de los homogeneizados de corazón, diluidos de forma que correspondan aproximadamente a 6 μg de proteínas.

6.6. Determinación de la relación GSH/GSSG

El GSH es un tripéptido (γ -glutamilcisteinilglicina) con un grupo tiol libre, siendo uno de los mayores antioxidantes existente en los tejidos de vertebrados. 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 5.2).

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),²⁹² basado en la determinación cuantitativa de la cantidad de glutatión total ($\text{GSH}_t = \text{GSH} + \text{GSSG}$). 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. Por su parte, el GSSG puede ser estimado a partir su 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:



Preparación de las muestras

El ventrículo izquierdo se homogeneiza en este caso con el siguiente tampón:

KH₂PO₄..... 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 6.1, pero con una dilución al 50% (p/v) en este tampón fosfato. Una vez homogeneizado el tejido, se centrifuga a 900 g durante 20 minutos a 4°C, para eliminar restos de orgánulos. La disolución centrifugada se separa en 2 microtubos eppendorf de 1,5 mL (uno para la determinación de GSH_t y otro para la de GSSG). Al tubo destinado a la determinación de GSSG se le añaden 10 µL de *scavenger* (M2VP) por cada 100 µL de homogeneizado de corazón, para evitar la oxidación de la muestra.

Reactivos

- Tampón de ensayo
- Tampón GSSG
- GR
- NADPH
- *Scavenger* (1-metil-2-vinilpiridinatri fluorometanosulfonato: M2VP)
- Cromógeno (ácido 5,5'-ditiomis-2-nitrobenzoico: DTNB)
- Estándares: en tampón KPO₄ con EDTA (hay que tener en cuenta que cada molécula de GSSG es equivalente a 2 moléculas de GSH):

Estándares	GSSG (µM)	GSH (µM)
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) 5%

Protocolo experimental

Las muestras se procesan de distinta manera para la determinación del GSH total (GSH_t) y del GSSG. Así, para la medida de GSSG se utilizan microtubos eppendorf de 1,5 mL con 110 μ L de muestra (100 μ L de homogeneizado de corazón + 10 μ L de M2VP). Se añaden 290 μ L de MPA al 5%, en frío. Se agita con un agitador de tubos tipo *vortex* durante 15-20 segundos. Se centrifuga a 1000 g (10 minutos a 4°C) y se toman 50 μ L del sobrenadante, los cuales son mezclados con 700 μ L de tampón GSSG, y se mantiene en hielo hasta el momento de la medida.

Para la medida de GSH_t se procede de la siguiente forma: en tubos eppendorf de 1,5 mL se añaden, a 50 μ L de homogeneizados de corazón, 350 μ L de MPA al 5%, en frío. Se agita con el *vortex* durante 15-20 segundos. Se centrifuga a 1000 g (10 minutos a 4°C) y se toman 50 μ L 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 μ L del estándar, del blanco (preparado con 50 μ L de MPA al 5% frío + 700 μ L del tampón de GSSG) o de la muestra (ya sea para medir GSH_t o GSSG), y se adicionan 200 μ L de DTNB y 200 μ L de GR. Se mezcla bien y se incuba 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se añaden 200 μ L 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 μ M de GSH o GSSG. La relación GSH/GSSG se obtiene de la siguiente fórmula:

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

6.7. Determinación de la peroxidación lipídica

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, como el 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, ni el MDA se produce exclusivamente como resultado de la peroxidación lipídica.²⁹³ 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 absoluta de la peroxidación lipídica.

Para la determinación del MDA hemos seguido el método descrito por Jentzsch y col.,²⁹⁴ 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.

Reactivos

- 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 0,1 M)

Protocolo experimental

En el interior de microtubos eppendorf de 2 mL, se adicionan 0,2 mL de homogeneizado de corazón (equivalentes aproximadamente a 6 mg de proteína) junto con 25 μ L de una solución de 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) y 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 10.000 g 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 TMP, el cual, al igual que el MDA, reacciona con el ATB bajo las mismas condiciones. Así, a partir de una solución madre 50 µM de TMP (estable durante dos semanas a 4°C), se preparan los distintos estándares: 0,5; 1; 2,5; 5; 10 y 25 µM. Se añaden 0,2 mL de cada uno de los estándares en microtubos eppendorf de 2 mL, y se procede de forma semejante a la determinación de 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).

6.8. Determinación de la cantidad de NO

El óxido nítrico (NO) es un radical libre inorgánico gaseoso que se origina por la acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) sobre el aminoácido esencial L-arginina (apartado 2.1 de la sección Introducción). Uno de los métodos utilizados para calcular la formación de NO es la medida del ión nitrito (NO₂⁻), 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 1879,²⁹⁵ basado en una reacción química que usa sulfanilamida y N-1-naftiletilediamida dihidrocloro (NEDDC) bajo condiciones ácidas (ácido fosfórico). Este sistema detecta NO₂⁻ en una enorme variedad fluidos y tejidos biológicos.

Previamente al ensayo, los tejidos se someten a una incubación con nitrato reductasa, para conseguir que los nitratos (NO₃⁻) se transformen en NO₂⁻, y de esa forma determinar el contenido de NO como la suma de nitritos y nitratos (NOx).

Reactivos

- Reactivo de Griess⁽¹¹⁾
- Tampón Tris/HCl (pH = 7,5)..... 1 M
- NADPH..... 0,02 mM
- Glucosa 6-fosfato (G6P) 5 mM
- Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).....10 U/mL
- *Aspergillus* Nitrato Reductasa 1 U/mL
- Solución patrón de nitrito sódico..... 320 µM

⁽¹¹⁾ Composición reactivo de Griess: ácido acético (286 g/L), ácido sulfanílico (1,55 g/L) y naftilamina (0,33 g/L).

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 0,2 mM, 23 μ L de la mezcla G6P-G6PDH (mezcla resultante de mezclar 2200 μ L de G6P con 330 μ L de G6PDH) y 10 μ L de nitrato reductasa. Se mezcla bien, y sobre estos tubos se añaden 50 μ L de muestra (homogeneizados de corazón), 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 recogen 75 μ L de la mezcla reactiva sobre pocillos de una microplaca 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. Pasado este tiempo, se lee la absorbancia a 550 nm mediante un lector de microplacas. Los resultados se expresan en μ mol/L de NO.

6.9. Estudios de expresión génica

6.9.1. Extracción de ARN total

El método se basa en la diferente solubilidad de las biomoléculas (ARN, ADN proteínas y lípidos) en disolventes orgánicos (fenol y cloroformo). Durante todo el proceso, se debe procurar trabajar con material estéril y tomar las debidas precauciones para evitar la degradación del ARN por parte de las ARNasas.

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-DEPC, y se procede a su cuantificación y a la verificación de su integridad.

Reactivos

- TRIzol[®]: solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina.
- Cloroformo.
- Isopropanol.
- Etanol absoluto: diluido al 75% con agua bidestilada autoclavada.
- Agua-DEPC (*Invitrogen*) (agua estéril y libre de ARNasas)
- Solución de Tris-Borato-EDTA (TBE 10X):

Tris.....	44,5 mM
Ácido bórico	44,5 mM
EDTA·Na ₂ /NaOH (pH = 8)	1 mM
- Tampón mixto (10X):

Azul de bromofenol	3,6 mM
Tris/HCl (pH = 8).....	50 mM
Glicerol	6% (v/v)

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 80-100 mg de muestra (ventrículo izquierdo) y se añade 1 mL de la solución comercial TRIzol[®] (*Invitrogen*). A continuación, se somete a la acción de un homogeneizador (*Heidolph DIAX 900*) en posición de velocidad máxima durante 15 segundos, y se deja reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo, se añaden 200 µL 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 µL 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 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 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 varias perforaciones pequeñas 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 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 de ARN obtenido, se diluye 1/100 el ARN en agua-DEPC, y se deposita en una cubeta de cuarzo para medir su absorbancia en el espectrofotómetro (*Eppendorf Biophotometer*) a 260 nm y 280 nm. Los ácidos nucleicos absorben luz de manera predominante a 260 nm, por lo que midiendo a esta longitud de onda obtenemos la concentración del ARN (1 unidad de absorbancia = 40 µg de ARN/mL). También se calcula la relación A_{260}/A_{280} para conocer el grado de pureza del ARN (se debe obtener un valor entre 1,5 y 2 para considerar el ARN como “puro”).

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%. 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. Para confirmar que el ARN no está degradado, deben observarse dos bandas correspondientes a los ARN ribosómicos, 18S y 28S.

6.9.2. Retrotranscripción

El proceso de retrotranscripción consiste en la síntesis de ADNc a partir de ARN gracias a la reacción catalizada por la retrotranscriptasa reversa. Para ello, hemos utilizado un kit suministrado por *Applied Biosystems (High-Capacity cDNA Archive kit)*.

Reactivos

- ARN: 4 µg de ARN total para cada reacción de retrotranscripción.
- Agua-DEPC.
- Mezcla de reactivos:
 - Tampón RT 10X 10 µL
 - Random primers 10X..... 10 µL
 - Desoxinucleótidos-mix 25X..... 4 µL
 - Multiscribe™ RT (50 U/ µL)..... 5 µL
 - Agua-DEPC hasta 50 µL

Protocolo experimental

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°C, utilizando un termociclador (*Biometra® T Gradient*). Transcurrido este tiempo, se colocan los tubos inmediatamente a 4°C para evitar la renaturalización del ARN. Se aprovecha este tiempo para preparar la mezcla de reactivos comunes, según se indica anteriormente. Finalmente, a los 50 µL de cada tubo de ARN se añaden 50 µL de dicha mezcla. Los 100 µL resultantes se llevan al termociclador (previamente programado para operar 10 minutos a 25°C, seguido de 2 horas a 37°C)

6.9.3. PCR a tiempo real

La principal característica de la PCR a tiempo real es que el análisis de los productos se realiza durante el proceso de amplificación, mediante la cuantificación de fluorescencia. Para ello, se utilizan termocicladores que son capaces de amplificar y detectar fluorescencia simultáneamente. En este trabajo se ha utilizado el termociclador a tiempo real *Light Cycler® 480 Detection System (Roche Diagnostics)*, que contiene un bloque de 96 pocillos con un fluorímetro acoplado. La señal de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de producto de PCR amplificado, puede generarse con colorantes fluorescentes que pueden ser específicos de 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 a 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. Para resolver este problema al final de la amplificación, se realiza una curva de disociación (*melting curve*) (figura 11B), que nos permite confirmar si efectivamente hay un solo producto de amplificación.

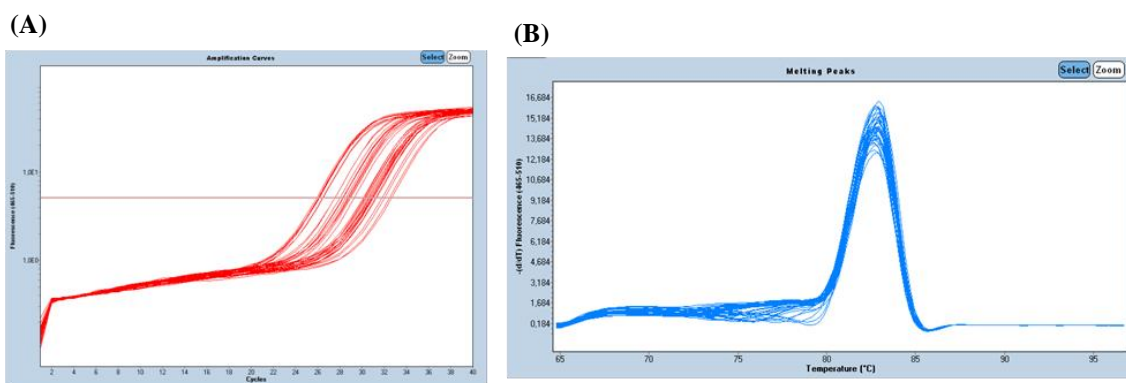


Figura 11. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real. (A) La imagen muestra las curvas de amplificación de la enzima SOD, a modo de ejemplo. **(B)** La imagen muestra la curva de disociación para los cebadores específicos de SOD.

Condiciones de reacción para la realización de una PCR a tiempo real

En la siguiente tabla se reflejan los reactivos necesarios para la realización de la PCR a tiempo real (mezcla de reacción):

Componentes de la reacción	Concentración	Volumen (μ L)
FastStart SYBR [®] Green Master	2x	10
Cebadores específicos (sentido y antisentido)	300 nM	0,6 (sentido) + 0,6 (antisentido)
ADNc		1
Agua-DEPC		7,8

Tabla II. Reactivos necesarios para la realización de la PCR a tiempo real.

En la siguiente tabla se muestran los cebadores utilizados para la amplificación de secuencias específicas de ADNc, en función del gen analizado:

	Cebador sentido (5'-3')	Cebador antisentido (5'-3')
GAPDH	GCCAAAAGGGTCATCATCTCCGC	GGATGACCTTGCCACAGCCTTG
GPx	GGAGAATGGCAAGAATGAAGA	CCGCAGGAAGGTAAAGAG
GR	GGAAACTCGCCCATAGACTT	CCAACCACCTTCTCCTCTTT
SOD	CGTCATTCACCTTCGAGCAGAAGG	GTCTGAGACTCAGACCACATA
eNOS	GGGCCAGGGTGATGAGCTCTG	CCCTCCTGGCTTCCAGTGCC
iNOS	ACCTGGGCAACACCTGGGGATTTT	TGGGTCTTCGGGCTTCAGTTATT
Nox2	CCCTTTGGTACAGCCAGTGAAGAT	CAATCCAGCTCCCACTAACATCA
IL-1 β	GAGGCTGACAGACCCAAAAGAT	GCACGAGGCATTTTTGTTGTCA
IL-6	GAAATACAAAGAAATGATGGATGCT	TTCAAGATGAGTTGGATGGTCT
IL-10	AGGCCATTCCATCCGGGGTGA	AGGCAGCCCTCAGCTCTCGG
TGF- β_1	GCCCTGGATACCAACTACTGCT	AGGCTCAAATGTAGGGGCAGG
CTGF	TAGCAAGAGCTGGGTGTGTG	TTCATTGCCACAAGCTGTC
Col I	TCAGGGGCGAAGGCAACAGT	TTGGGATGGAGGGAGTTTACACGA
ET-1	AGGGAACAGATGCCAGTGTGCT	TGCATGGTACTTTGGGTCCGGA
NF- κ B	CCTAGCTTTCTGAACTGCAAA	GGGTCAGAGGCCAATAGAGA
PPAR- γ	CTTGCCATATTTATAGCTGTCATTATT	AGCAGGTTGTCTGGATGTCCT

Tabla III. Secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados.

Se ha realizado un experimento de eficiencia para optimizar la cantidad de ADNc necesaria para garantizar la amplificación máxima de cada fragmento. Así, al cargar la reacción para la PCR a tiempo real, se añade 1 μ L de ADNc: i) diluido 1/50 en agua bidestilada autoclavada cuando se han utilizado los cebadores de GPx, GR, SOD y Col I; ii) diluido 1/5 para IL-1 β y IL-10; y iii) sin diluir, para eNOS, Nox2, IL-6, TGF- β_1 , CTGF, NF- κ B y PPAR- γ .

Una vez preparada la mezcla de reacción según se indica la tabla II, se introduce la placa de 96 pocillos en el termociclador, programado de la siguiente forma:

Proceso	Condiciones	Ciclos
Activación SYBR [®] Green Master	50°C, 2 min	
Desnaturalización inicial	95°C, 10 min	
Desnaturalización	95°C, 15 s	40
Hibridación/Elongación	60°C, 1 min	

Tabla IV. Programa utilizado en el *Light Cycler[®] 480 Detection System* para la realización de la PCR a tiempo real.

Una vez realizado el experimento, el análisis de los resultados se realiza con el programa *Light Cycler 480 sw 1.5*. El programa recoge los resultados y los representa gráficamente como curvas de amplificación en las que se relaciona la intensidad de la señal fluorescente con el tiempo, expresado como número de ciclos de la amplificación (Figura 11A). Para el análisis cuantitativo de los productos de la PCR, se ha empleado un método de cuantificación relativo, expresando el marcador en función de un gen constitutivo, que es un gen expresado en un nivel idéntico en todas las muestras analizadas. El gen empleado a tal efecto ha sido el correspondiente a la enzima gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GADPH). La cuantificación se realiza mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *Ct* se define como el ciclo en el cual la curva de amplificación se distingue del ruido de fondo y es dependiente de la cantidad inicial de ADNc.

6.10. Estudios de expresión proteica

6.10.1. Fundamento del *Western blotting*

Para la cuantificación relativa de proteínas se ha utilizado la técnica de *Western blotting* (transferencia electroforética de proteínas), que 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 (GPx, GR, SOD, nitrotirosina (NT), eNOS, eNOS (pS1177) y Nox2, en nuestro caso) son identificadas gracias al empleo de anticuerpos específicos. Para la realización de este experimento se ha utilizado un equipo de *Bio-Rad Laboratories*, que incluye los componentes *Miniprotean III Cell* y *Mini Trans-Blot Cell* (figura 12).



Figura 12. Equipo necesario para la realización de la técnica de *Western blotting*.

6.10.2. Preparación de las muestras

El corazón se homogeneiza como se describe en el apartado 6.1. A continuación, se mezclan volúmenes iguales de homogeneizado de corazón (equivalentes a 80 μg de proteína para la determinación de GPx, NT, Nox2 y eNOS; 70 μg de proteína en el caso de la eNOS (pS1177); 20 μg de proteína en el caso de la GR, y 10 μg de proteína en el caso de la SOD) y de tampón de muestra 2X. Esta mezcla se calienta 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 colocan inmediatamente en hielo para su conservación hasta que se realice la electroforesis.

6.10.3. 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 geles de poliacrilamida, cuyo grado de polimerización permite obtener diferentes tamaños de poro por el cual migran las proteínas, lo que permite la caracterización de las proteínas en estudio. Estos geles constan de un gel concentrador (que concentra todas las proteínas en un determinado lugar) y un gel separador (cuya función es la de separar las proteínas según su peso molecular), en nuestro caso hemos utilizado geles preparados en gradiente de concentración (4-20%) (*Mini-PROTEAN[®] TGX[™], Bio-Rad laboratories*).

Reactivos

- Tampón de electroforesis 10X:

Tris	250 mM
Glicina	1,92 M
SDS	1%

Protocolo experimental

Se coloca el gel en una cubeta de electroforesis y se cargan las muestras en los pocillos, añadiendo además en uno de ellos un marcador de peso molecular (el cual permitirá identificar los distintos pesos moleculares de las correspondientes proteínas al final del proceso). Finalmente, se llena la cubeta *Miniprotean III Cell* con tampón de electroforesis, se cierra el circuito, y se aplica un voltaje constante de 150 V durante aproximadamente 60 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.

6.10.4. 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 (*Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad*).

Composición de los medios

- Tampón de transferencia:

Tris	20 mM
Glicina	150 mM
Metanol	20% v/v

- *Ponceau S* al 0,5%:

Colorante <i>Ponceau S</i>	0,5 g
Ácido acético glacial	1 mL
Agua bidestilada	99 mL

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 casete para realizar

la transferencia. Para ello, en una bandeja con tampón de transferencia se prepara un sándwich en el interior del casete 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 esponja. Se cierra bien el casete y se coloca dentro de la cubeta de transferencia, 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.

6.10.5. Inmunodetección

Se basa en la detección de cada una de las proteínas que buscamos en la membrana de nitrocelulosa, mediante el empleo de anticuerpos específicos.

Reactivos

- Solución de lavado (TBST):
 - Tris/HCl (pH = 7,5)..... 10 mM
 - NaCl..... 100 mM
 - Tween® 20.....0,1% v/v
- Solución de bloqueo (TBST-M)⁽¹²⁾:
 - Leche desnatada en polvo 3% en TBST
- Anticuerpos para el análisis de *Western blotting* (tabla V)
- Kit de quimioluminiscencia: *ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare Life Sciences)

⁽¹²⁾ En el caso de la proteína eNOS (pS1177), la solución de bloqueo es albúmina al 5% en TBST

Proteína	Anticuerpo 1º			Anticuerpo 2º	
	Ac 1º	Origen	Dilución en TBST-M	Ac 2º	Dilución en TBST-M
GPx	Anti-GPx	conejo	1 : 2000	Goat anti-rabbit IgG-HRP	1 : 4000
GR	Anti-GR	conejo	1 : 5000	Goat anti-rabbit IgG-HRP	1 : 10000
SOD	Anti-SOD	conejo	1 : 10000	Goat anti-rabbit IgG-HRP	1 : 50000
NT	Anti-NT	ratón	1 : 1000	Goat anti-mouse IgG-HRP	1 : 3000
eNOS	Anti-eNOS	ratón	1 : 2000	Goat anti-mouse IgG-HRP	1 : 4000
eNOS (pS1177)	Anti-eNOS (pS1177)	ratón	1 : 2000	Goat anti-mouse IgG-HRP	1 : 5000
Nox2	Anti-Nox2	conejo	1 : 5000	Goat anti-rabbit IgG-HRP	1 : 10000
GAPDH	Anti-GAPDH	ratón	1 : 30000	Goat anti-mouse IgG-HRP	1 : 50000

Tabla V. Condiciones para la Inmunodetección de cada anticuerpo. En esta tabla observamos las condiciones de inmunodetección para las proteínas GPx, GR, SOD, nitrotirosina (NT), eNOS, eNOS (pS1177), Nox2 y GAPDH.

Protocolo Experimental

Se incubaba la membrana de nitrocelulosa en 25-30 mL de solución de bloqueo durante 2 horas a temperatura ambiente, para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo a la superficie de la membrana. Transcurrido este tiempo, se incubaba la membrana con el anticuerpo primario específico, dejándolo toda la noche a 4°C. Finalizada la incubación, se hacen 8 lavados de 3 minutos cada uno, para eliminar el exceso de anticuerpo no fijado a la membrana. Después se incubaba 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.

El revelado para visualizar las proteínas se ha realizado mediante quimioluminiscencia, utilizando el kit *ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent* y un equipo para la adquisición de imágenes por quimioluminiscencia (*Sistema Fujifilm LAS3000 mini*). 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 GAPDH en las mismas membranas.

7. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Para llevar a cabo este tipo de estudios es necesario manipular previamente las muestras mediante lo que se conoce como “Técnica Histológica”, que es el conjunto de procesos al que se somete un tejido con el fin de hacer posible su estudio mediante microscopía.

Las técnicas histológicas y la microscopía nos ayudan a comprender la estructura fina tanto del tejido como de las células que lo comprenden. Además, nos permiten correlacionar la

estructura de un tejido con su función. Este tipo de análisis son esenciales a nivel clínico para el diagnóstico de enfermedades.

7.1. Procesado de los tejidos

Cuando tenemos intención de utilizar un tejido para realizar estudios de microscopía, es importante que intentemos mantener, en la medida de lo posible, la estructura original de dicho tejido desde el momento de la obtención del órgano. Con este fin, la pieza a estudiar se somete a una serie de procesos de preservación, inclusión en parafina y tinción que describiremos detalladamente en este apartado.

7.1.1. Fijación

El primer paso en el proceso consiste en la preservación de la muestra mediante la fijación del tejido, con objeto de mantener los detalles estructurales microscópicos de tejidos y células. Los aldehídos (en concreto el formaldehído) son los fijadores más utilizados.

Para llevar a cabo el proceso de fijación, la mitad del corazón (tras haber realizado un corte longitudinal, como mencionamos en el apartado 4) se sumerge en formol salino (formaldehído al 4% en PBS) durante 24 horas en una noria rotativa de agitación (GP70, *Selecta*). Transcurrido este tiempo, se introduce la sección del corazón dentro de un casete (figura 13), donde el órgano se mantendrá durante el resto del procesado.

7.1.2. Deshidratación

El siguiente paso es la deshidratación del tejido, proceso en el que vamos a sustituir el agua del mismo por parafina. Para ello, sumergimos los casetes secuencialmente en distintos coplins que contienen diluciones de etanol en concentraciones crecientes. En primer lugar, el órgano se sumerge en etanol al 70% durante 12 horas, y tras esto se sumerge secuencialmente en soluciones con concentraciones crecientes de etanol (80%, 85%, 90%, 95% y 100%, durante 1 hora cada uno (figura 13)).

7.1.3. Inclusión en parafina y formación de bloques

Una vez que el tejido está deshidratado, se procede a la inclusión de parafina de forma gradual. Previamente, se trata con etanol:tolueno (1:1) durante 2 horas y, a continuación, con tolueno puro durante 3 horas. El tolueno es un disolvente orgánico que permite que la parafina caliente difunda hacia el interior de los tejidos de forma homogénea. A

continuación, se sumerge el órgano en una mezcla de tolueno:parafina (1:1), a 60°C durante 2 horas. Por último, el órgano se mantiene toda la noche en parafina pura a 60°C. Al día siguiente se utiliza parafina limpia para formar los bloques con la ayuda de los casetes y utilizando un molde metálico (figura 13). Los bloques se enfrían a 4°C durante 1-2 horas para solidificar la parafina, y, tras desmontarlos de los casetes, se mantienen a 4°C hasta el día de su corte para que estén lo más sólidos posible.

Una vez que los bloques están desmontados, ya están listos para obtener secciones con el micrótopo (MR-2258, *Histo-line laboratories*). El grosor de las secciones va a depender del tipo de técnica al que vayan destinadas esas muestras. En nuestro caso, las muestras destinadas a tinción con Rojo Sirio tienen un grosor de 5 μm , grosor que se considera el óptimo para su posterior análisis de imagen mediante densitometría. En el caso de la tinción de Masson-Goldner, se realizan cortes de 3 μm de espesor. Las tiras de secciones obtenidas con el micrótopo se depositan sobre agua a 37°C en un baño donde, aprovechando la hidrofobicidad de la parafina, el calor las hace extenderse sin llegar a su punto de fusión. Desde ahí son recogidas con la ayuda de un portaobjetos. De manera rutinaria, se recolectan tres secciones de tejido por cada portaobjetos. Las muestras son entonces almacenadas en una caja contenedora de portaobjetos y conservadas a -20°C hasta su posterior procesado.

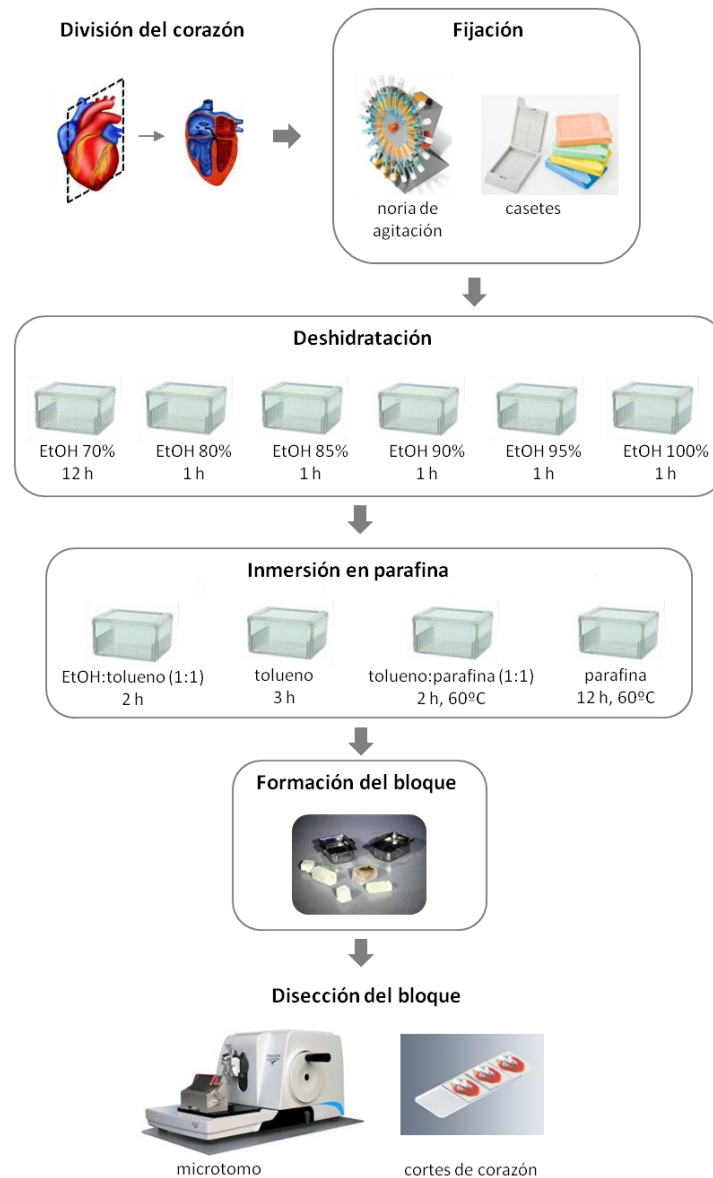


Figura 13. Esquema representativo del procesado de los tejidos

7.2. Tinción de Masson-Goldner (Tricrómico de Masson)

En Histología existen diferentes métodos para la visualización del tejido conectivo. Muchos de esos métodos pertenecen al grupo de los tricrómicos, denominados así porque se utilizan tres colorantes diferentes. Las coloraciones tricrómicas tiñen diferencialmente las diversas estructuras histológicas según su basofilia/acidofilia, o por su apetencia por un colorante específico. Los colorantes utilizados en la técnica elegida en este estudio son todos ácidos y, por lo tanto, van a interactuar con estructuras básicas; por ello, es necesario realizar una contratinción con un colorante básico (como la hematoxilina) si tenemos intención de visualizar los núcleos.

Esta técnica concreta se conoce como *tricrómico de Masson-Goldner*, y ofrece la ventaja de que puede realizarse en material fijado con formol. Para realizar este ensayo hemos utilizado el kit comercial de tinción Masson-Goldner de la casa comercial *Merk*.

Protocolo experimental

- Desparafinado estándar: antes de comenzar con la tinción, hay que eliminar la parafina que rodea e impregna el tejido y reponer en su lugar el agua extraída durante el procesado. Para ello, se somete al tejido a un proceso de desparafinado y rehidratación de los portaobjetos, según el esquema siguiente:
 - Desparafinar 1 hora en estufa a 60°C
 - Xilol 3 x 5 min
 - Etanol:xilol (1:1) 5 min
 - Etanol 100% 5 min
 - Etanol 90% 5 min
 - Etanol 80% 5 min
 - Etanol 70% 5 min
 - Agua corriente 5 min
- Hematoxilina de Weigert 5 min
- Lavado en agua corriente..... 5 min
- Enjuagar en ácido acético 1%.....30 s
- Solución de azofloxina 10 min
- Enjuagar en ácido acético 1%.....30 s
- Solución de ácido fosfolvrámico-anaranjado G 1 min
- Enjuagar en ácido acético 1%.....30 s
- Verde luz SF 2 min
- Enjuagar en ácido acético 1%.....30 s
- Deshidratación y montaje: tras realizar la tinción, hay que deshidratar y montar la preparación para su posterior conservación. El proceso estándar consiste en someter la preparación a concentraciones crecientes de etanol hasta llegar a etanol absoluto. A continuación, se aclaran las muestras con xilol.

- Etanol 70%, 90% y 100% 5 min cada uno
- Xilol 3 x 5 min

Por último, se procede al montaje de la preparación con un cubreobjetos y adhesivo de montaje (*Neo-Mount*[®]), con la ayuda de una pinza plana para microscopía. Las preparaciones se colocan en posición horizontal sobre una bandeja con un pequeño peso de plomo sobre el cubreobjetos, para evitar la formación de burbujas.

Resultados

Las estructuras basófilas (como la cromatina) se aprecian de un color pardo-marrón a negro; las estructuras débilmente acidófilas (citoplasmas o músculo), de rojo a naranja; y las fuertemente acidófilas (como las fibras de colágeno), de azul a verde. Los eritrocitos se observan de color naranja.

7.3. Cuantificación de colágeno. Tinción de Rojo Sirio

La cantidad de colágeno nos da idea de la abundancia de tejido conjuntivo presente y, en situaciones patológicas, del grado de fibrosis de un órgano o tejido. En este estudio hemos cuantificado la cantidad de colágeno mediante morfometría cuantitativa en muestras previamente teñidas con Rojo Sirio. Con esta técnica, las fibras del tejido conectivo (excepto las elásticas) se tiñen de un rojo intenso, y el resto del tejido de un tono amarillo claro, no apreciándose los núcleos celulares (circunstancia ésta que es esencial para los propósitos de cuantificación de la fibrosis mediante análisis de imagen). Es una técnica muy sencilla y fácilmente reproducible sin variación entre tinciones, lo que la hace ideal para los análisis morfométricos de imagen.

Protocolo experimental

- Desparafinado estándar (descrito en el apartado 7.2)
- Etanol 70% 5 días
- Solución de Rojo Sirio saturada con ácido pícrico⁽¹³⁾ 30 min
- Deshidratación estándar y montaje (descritos en el apartado 7.2)

Para analizar el área ocupada por las fibras de colágeno, se analizaron aleatoriamente un total de 25 regiones intersticiales de cada una de las preparaciones de los corazones a

⁽¹³⁾ La solución de Rojo Sirio consiste en una solución acuosa saturada con ácido pícrico y 0,1% de Rojo Sirio.

estudiar. Para ello, se captaron imágenes de las muestras utilizando una videocámara de alta resolución (*Sony, DF.W.X710*) conectada a un microscopio óptico (*Nikon Eclipse 50i*), utilizando un objetivo de 20x y un filtro óptico verde (IF 550). El área ocupada por colágeno fue determinada usando un sistema de análisis computarizado (*Fibrosis HR^R, Master Diagnostic*). Los valores obtenidos para el tejido fibroso se expresan en μm^2 .

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

De manera general, los resultados están expresados como media \pm error estándar (S.E.M.). La comparación entre las diferentes condiciones experimentales se ha realizado utilizando el test ANOVA, y en aquellos casos que han mostrado significación estadística, se ha aplicado el test de *Tukey*, considerándose diferencias estadísticamente significativas para valores de $P < 0,05$.

Resultados

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ANIMALES

1.1. Peso corporal y peso/índice cardiacos

Durante las 10 semanas de tratamiento, se ha realizado un control semanal del peso corporal de los animales. Como es natural, el peso inicial es similar en los cuatro grupos experimentales antes del tratamiento. Sin embargo, el peso corporal de los animales tratados con sunitinib desciende significativamente al final del periodo de experimentación, alteración que desaparece en el grupo sometido a tratamiento simultáneo con LC (tabla VI). De manera adicional, cabe señalar que no se observan diferencias entre el grupo de ratas controles y el de ratas tratadas con LC, siendo ésta una característica que se repetirá en todos los parámetros analizados en este estudio.

	Wistar	WLC	WSU	WSULC
Peso corporal inicial (g)	310 ± 6	311 ± 5	330 ± 8	330 ± 5
Peso corporal final (g)	336 ± 3	336 ± 5 [#]	311 ± 7 [*]	324 ± 5
Peso corazón (g)	1,08 ± 0,02	1,02 ± 0,03 ^{###}	1,27 ± 0,03 ^{***}	1,04 ± 0,01 ^{###}
Índice cardiaco (g%)	0,30 ± 0,006	0,30 ± 0,009 ^{###}	0,37 ± 0,009 ^{***}	0,31 ± 0,009 ^{###}

Tabla VI. Peso corporal inicial y final de los animales, y peso del corazón e índice cardiaco, en ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media ± error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: * P < 0,05, *** P < 0,001 comparado con Wistar; # P < 0,05, ### P < 0,001 comparado con WSU.

En la tabla VI también se muestra el peso del corazón y la relación entre el peso del corazón y el peso corporal (índice cardiaco) en los cuatro grupos de ratas experimentales. Tanto el peso del corazón como el índice cardiaco aumentan de forma significativa tras el tratamiento con sunitinib, lo que demuestra la presencia de un corazón hipertrofiado en estas ratas. Esta hipertrofia cardiaca desaparece tras el tratamiento simultáneo con LC.

1.2. Presión sanguínea

En la figura 14 se muestran los resultados de las medidas de las presiones arteriales sistólica (PAS) y diastólica (PAD) y de las frecuencias cardiacas (FC) al final del tratamiento. La PAS y la PAD se incrementaron 31 y 27 mm Hg, respectivamente, al final del tratamiento en el grupo tratado con sunitinib cuando se comparó con los valores recogidos en las ratas controles Wistar. También se observa que el tratamiento simultáneo con LC redujo los valores de presión arterial en 30 y 22 mm Hg para la PAS y PAD, respectivamente (figura

14A y 14B). Por lo tanto, cuando la LC es administrada durante 10 semanas a ratas tratadas con sunitinib se produce una disminución significativa en las cifras de presión arterial al final del tratamiento, llegando a normalizarse las cifras de PAS.

Al analizar la FC al final del tratamiento, se observa que este parámetro aumenta significativamente en las ratas tratadas con sunitinib con respecto al resto de los grupos (figura 14C). La administración simultánea de LC aminora estos valores, aunque sin llegar a normalizarlos por completo.

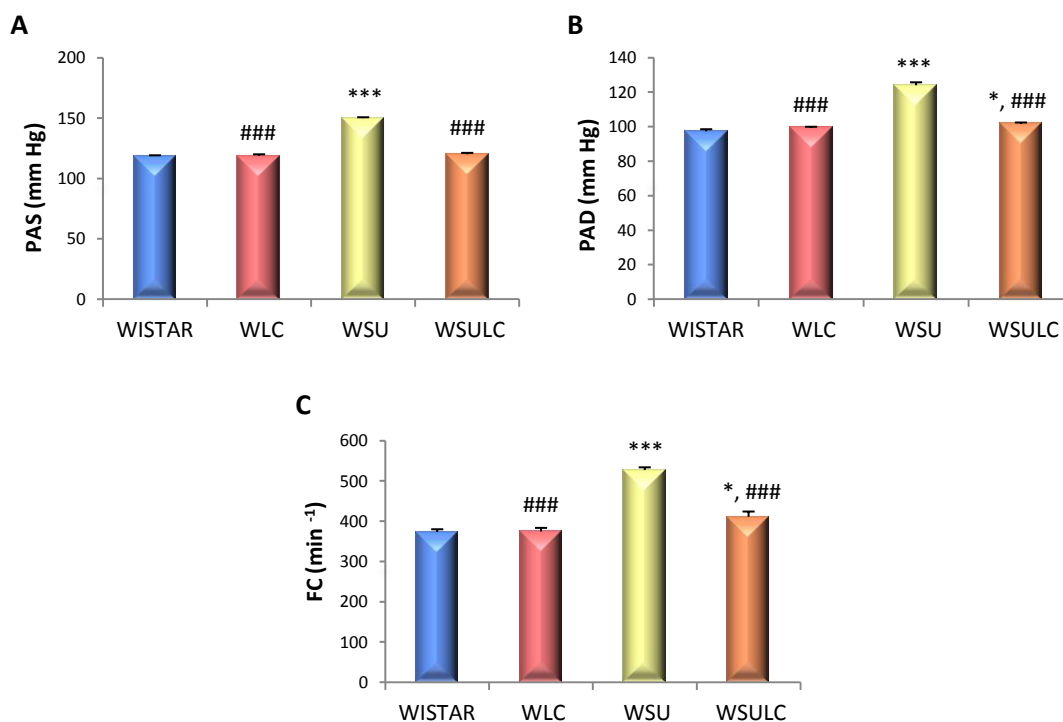


Figura 14. Presión arterial sistólica (A), presión arterial diastólica (B) y frecuencia cardíaca (C), al final del periodo de tratamiento, en ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados se representan como la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ comparado con Wistar; ### $P < 0,001$ comparado con WSU.

2. ESTUDIOS EN SANGRE PERIFÉRICA

2.1. Actividad de enzimas antioxidantes en eritrocitos

La figura 15 muestra la actividad en sangre de las diferentes enzimas antioxidantes, glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD), en los cuatro grupos experimentales de animales. Se observa que en las ratas tratadas con sunitinib se redujo la actividad de estas tres enzimas antioxidantes (62%, 42% y 51%,

respectivamente). El tratamiento simultáneo con LC logró aumentar esta actividad, llegando a normalizarse los valores en el caso de la GPx y de la GR.

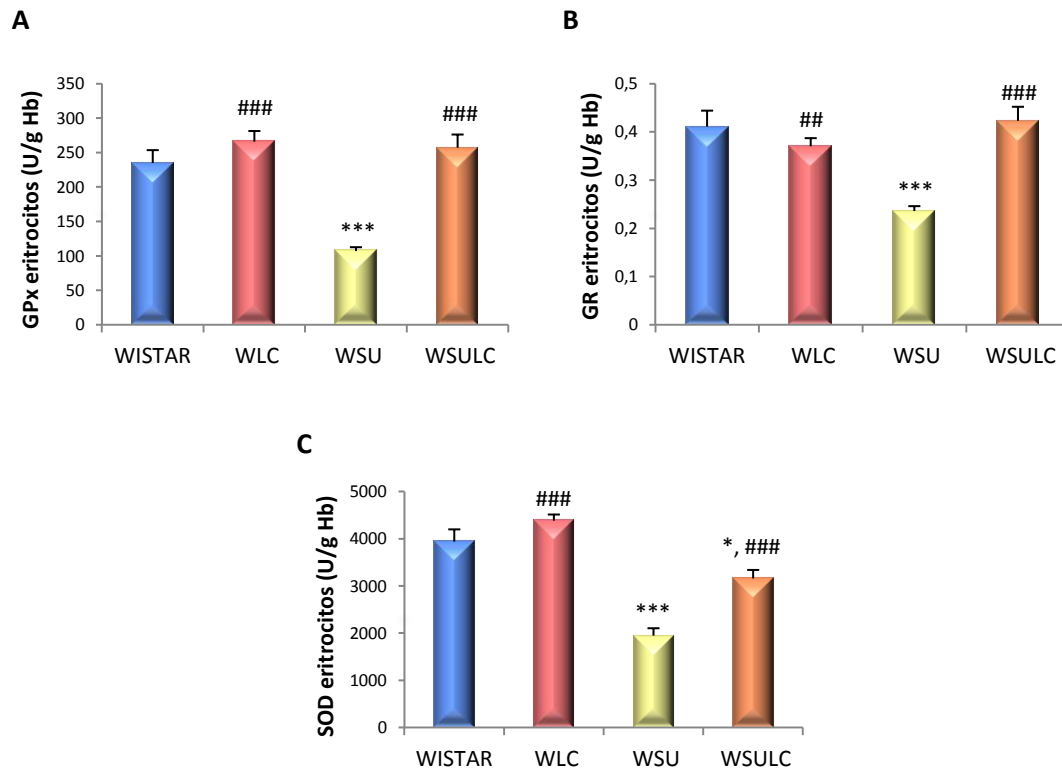


Figura 15. Actividad de las enzimas glutación peroxidasa, GPx (A), glutación reductasa, GR (B) y superóxido dismutasa, SOD (C) en eritrocitos procedentes de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados están expresados en unidades de actividad enzimática (U) por gramo de hemoglobina (Hb), y representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ comparado con Wistar; ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$ comparado con WSU.

3. ESTUDIOS EN CORAZÓN

3.1. Actividad de enzimas antioxidantes

Al analizar la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y SOD en homogeneizados de corazón (figura 16A y 16C), se observa una disminución de un 28% y de un 35% respectivamente, tras el tratamiento con sunitinib, en comparación con el grupo control. Tras la administración simultánea de LC se revierten estas alteraciones, incluso la actividad de la GPx llega a normalizarse. Con respecto a la actividad de la enzima GR, no se observan diferencias significativas en el corazón de los cuatro grupos experimentales de animales (figura 16B).

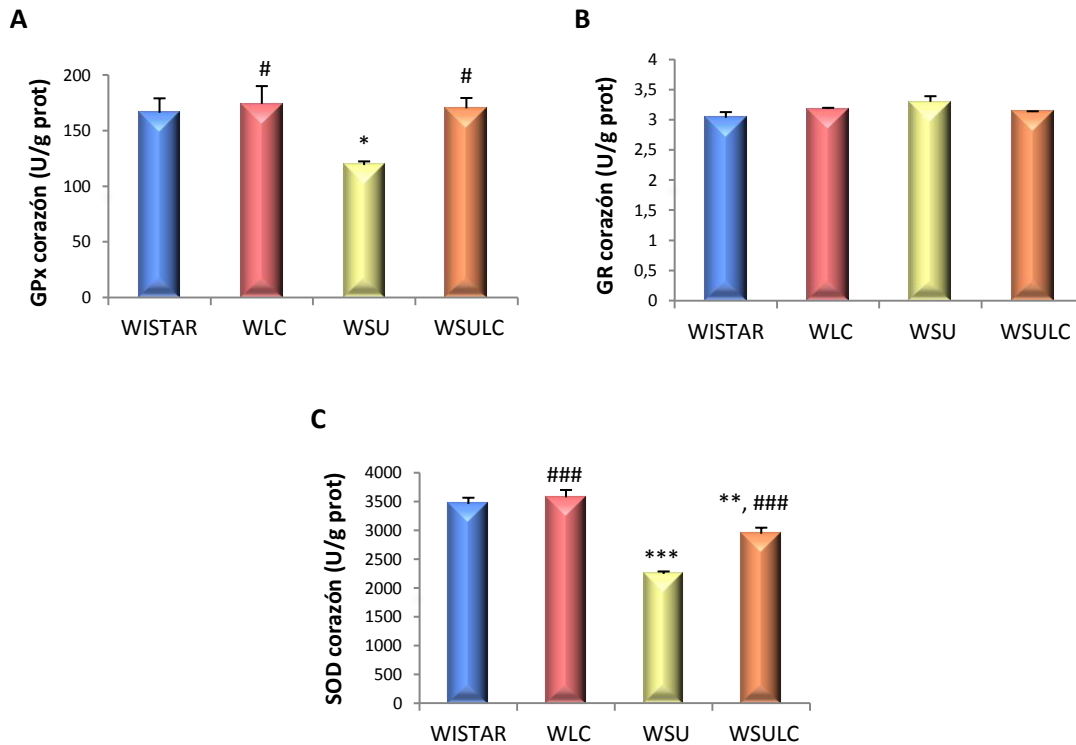


Figura 16. Actividad de las enzimas glutatión peroxidasa, GPx (A), glutatión reductasa, GR (B) y superóxido dismutasa, SOD (C) en homogeneizados de corazón procedentes de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: * $P < 0,05$ comparado con Wistar, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ comparado con Wistar; # $P < 0,05$, ### $P < 0,001$ comparado con WSU.

3.2. Expresión génica y proteica de enzimas antioxidantes

Al analizar la expresión génica y proteica de las diferentes enzimas antioxidantes en corazón, observamos cómo los resultados son bastante similares a los obtenidos en las actividades de estas enzimas en dicho órgano. Así, la expresión génica de la GPx y SOD (figura 17A y 17C) fue significativamente menor en el grupo tratado con sunitinib. En este caso, la administración simultánea de LC es capaz de contrarrestar completamente este descenso, alcanzándose valores similares a los del grupo control para ambas enzimas. Por su parte, la figura 17B pone de manifiesto que no existen diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales al determinar la expresión génica de la enzima antioxidante GR.

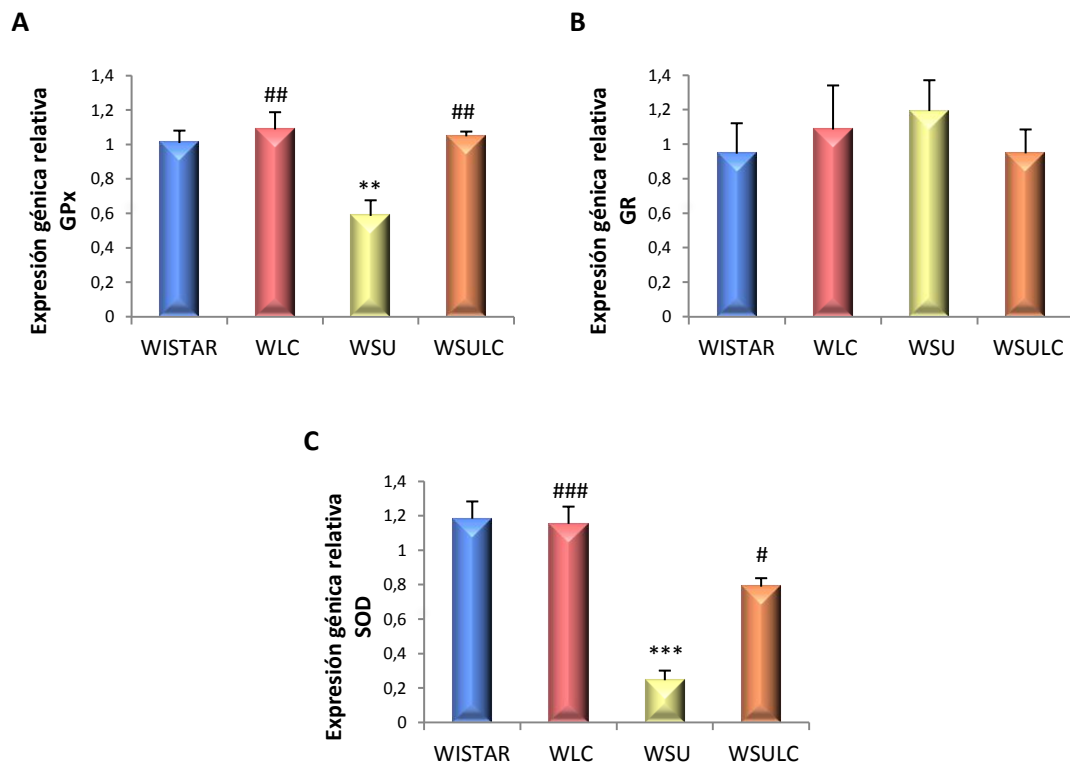


Figura 17. Expresión génica de las enzimas glutatión peroxidasa, GPx (A), glutatión reductasa, GR (B) y superóxido dismutasa, SOD (C) en corazón de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 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, *** P < 0,001 comparado con Wistar; # P < 0,05, ## P < 0,01, ### P < 0,001 comparado con WSU.

De la misma forma, en cuanto a la expresión proteica de las enzimas antioxidantes, se observa que el grupo tratado con sunitinib presenta unos valores significativamente inferiores que los presentados por el grupo control en el caso de la GPx y la SOD (figuras 18A y 18C). Esta alteración se corrige tras el tratamiento simultáneo con LC. Los niveles relativos de la GR tampoco muestran en este caso diferencias significativas entre ninguno de los cuatro grupos experimentales (figura 18B).

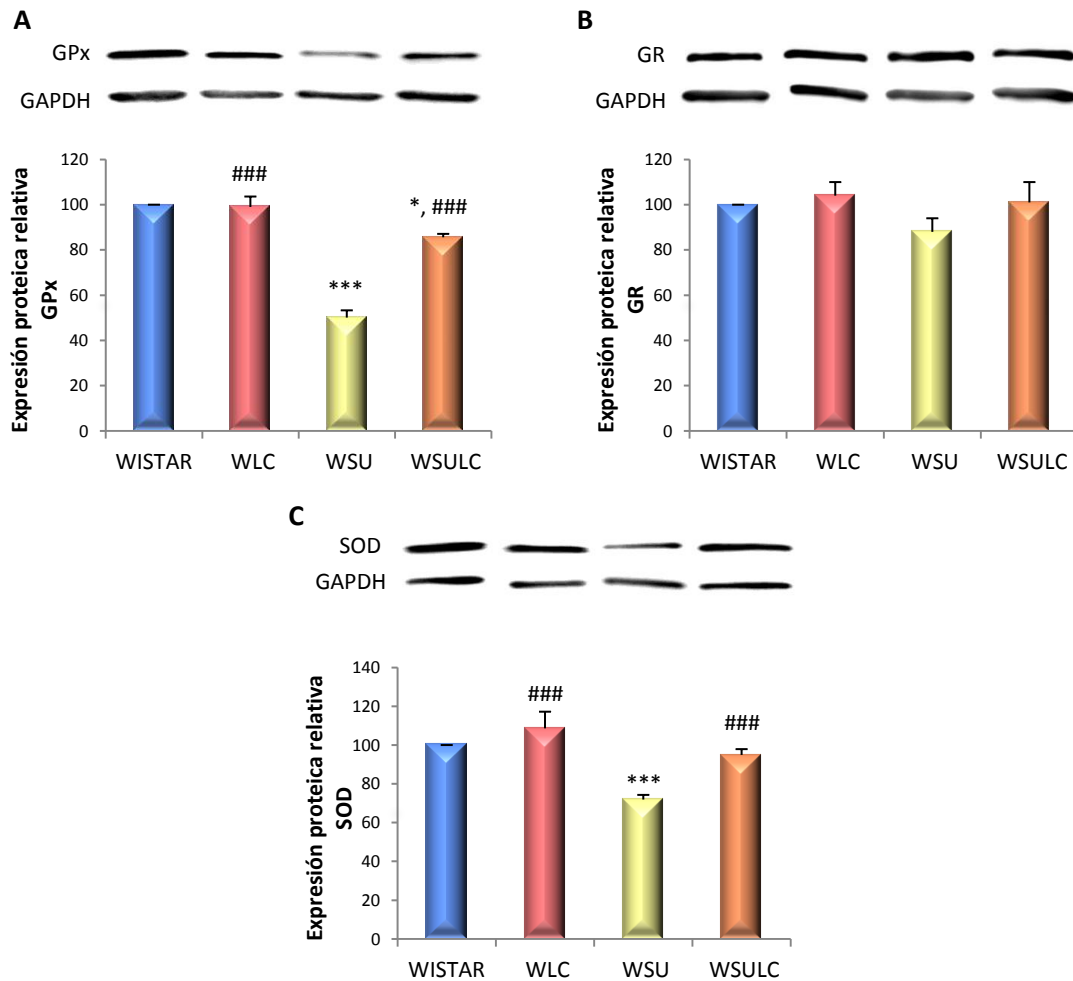


Figura 18. Expresión proteica de las enzimas glutatión peroxidasa, GPx (A), glutatión reductasa, GR (B) y superóxido dismutasa, SOD (C) en homogeneizados de corazón procedentes de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: * $P < 0.05$, *** $P < 0,001$ comparado con Wistar; ### $P < 0,001$ comparado con WSU.

3.3. Relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG)

La figura 19 muestra que no existen diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales de animales en lo que respecta a la relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG) en homogeneizados de corazón.

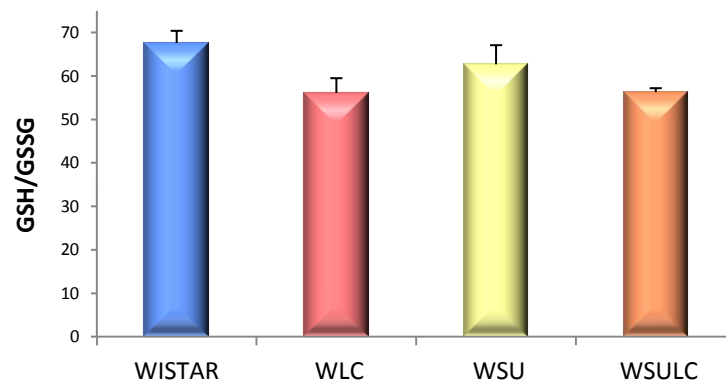


Figura 19. Determinación de la relación GSH/GSSG en homogeneizados de corazón procedentes de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo.

3.4. Grado de peroxidación lipídica

En la figura 20 se pueden observar los niveles de malondialdehído en homogeneizados de corazón, medidos como un índice de la peroxidación lipídica. Los resultados muestran que se produce un incremento del 59% de la peroxidación lipídica en las ratas tratadas con sunitinib, normalizándose los valores en el grupo sometido a tratamiento simultáneo con LC.

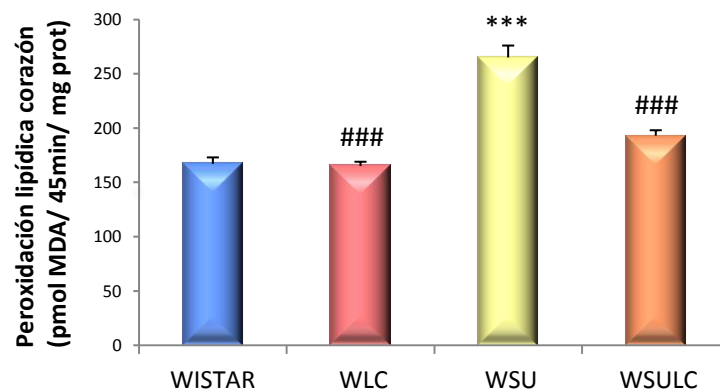


Figura 20. Peroxidación lipídica en homogeneizados de corazón procedente de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $P < 0,001$ comparado con Wistar; ### $P < 0,001$ comparado con WSU.

3.5. Grado de nitrosilación de proteínas

Como se puede comprobar en la figura 21, el mayor nivel de proteínas nitrosiladas en el corazón correspondió al grupo tratado con sunitinib, que mostró un aumento significativo respecto del grupo control. La administración simultánea de LC provocó una disminución

significativa de dichos niveles, llegando a alcanzar los niveles observados en las ratas controles.

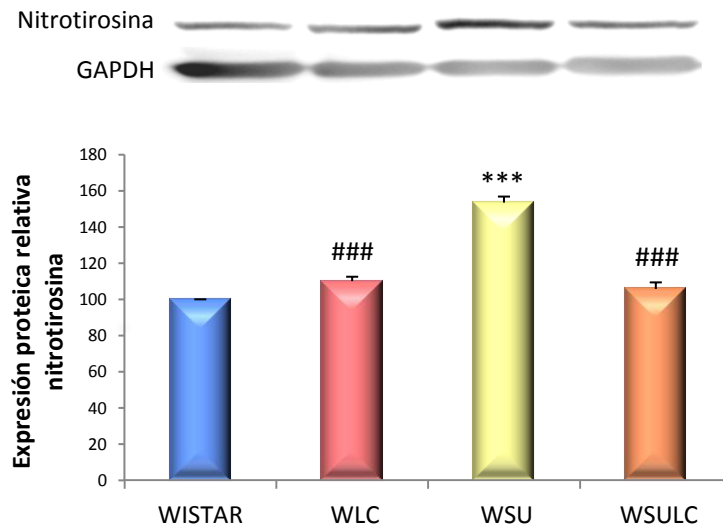


Figura 21. Expresión proteica de nitrotirosina en homogeneizados de corazón procedentes de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $P < 0,001$ comparado con Wistar; ### $P < 0,001$ comparado con WSU.

3.6. Niveles de óxido nítrico

Los niveles de NO, determinados como la suma de nitratos y nitritos presente en las muestras (apartado 6.8 de la sección *Materiales y Métodos*), aumentan 1,6 veces en el corazón de ratas tratadas con sunitinib comparados con los valores observados en las ratas controles. La administración simultánea de LC restauró los valores de NO, llegando a alcanzar los niveles observados en las ratas controles (figura 22).

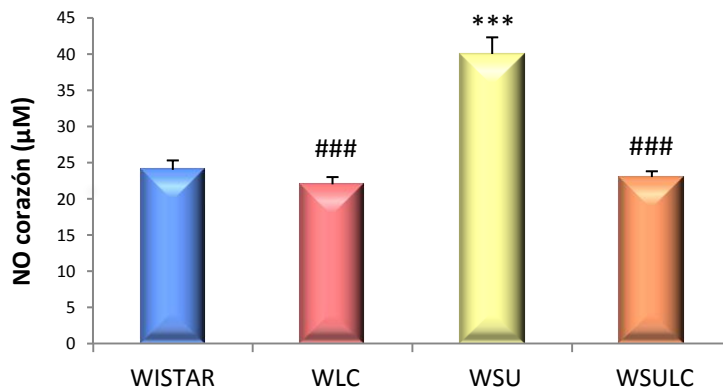


Figura 22. Concentración de NO en homogeneizados de corazón procedente de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $P < 0,001$ comparado con Wistar; ### $P < 0,001$ comparado con WSU.

3.7. Expresión génica y proteica, y grado de fosforilación de eNOS

Cuando se estudió la expresión génica de la enzima eNOS, observamos cómo los animales tratados con sunitinib presentan valores significativamente mayores (5,3 veces) a los presentados por el grupo Wistar. Estos valores se reducen hasta llegar a la normalidad tras el tratamiento simultáneo con LC (figura 23).

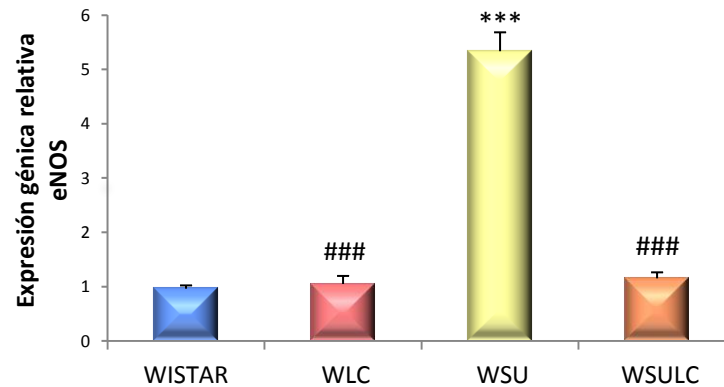


Figura 23. Expresión génica de la enzima eNOS en corazón de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en la expresión de ARNm son determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo correspondiente y calculado usando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Significación estadística: *** $P < 0,001$ comparado con Wistar; ### $P < 0,001$ comparado con WSU.

En la figura 24 se muestra el grado de fosforilación de la enzima eNOS (fosforilación del aminoácido serina en la posición 1177 (pS1177)). La expresión proteica de la eNOS (total) se encuentra aumentada en las ratas tratadas con sunitinib, mientras que la expresión de la proteína fosforilada es significativamente inferior en este grupo de ratas. Por ello, la relación eNOS (pS1177)/eNOS total se encuentra significativamente disminuida en las ratas tratadas con sunitinib. Estos valores se incrementan en el grupo sometido a tratamiento simultáneo con LC, llegando a alcanzar los niveles observados en las ratas controles.

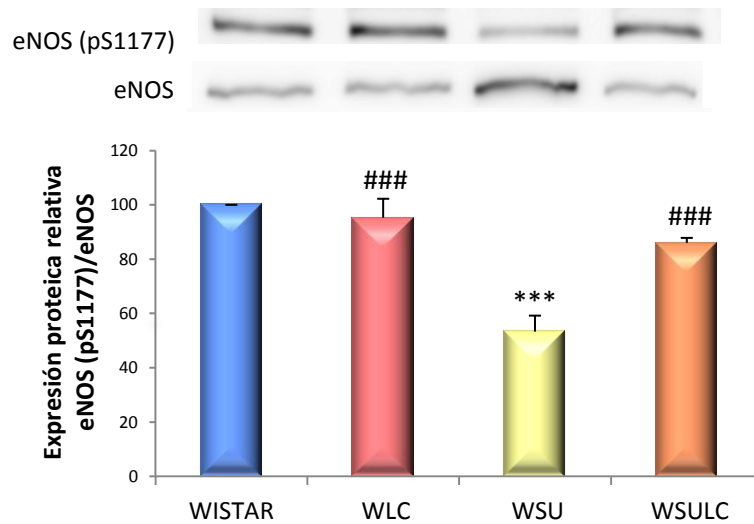


Figura 24. Grado de fosforilación de la enzima eNOS en homogeneizados de corazón procedentes de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $P < 0,001$ comparado con Wistar; ### $P < 0,001$ comparado con WSU.

3.8. Expresión génica de iNOS

Al analizar los resultados correspondientes a la expresión génica de la iNOS (figura 25), se observa un aumento aproximado de 3 veces en el grupo tratado con sunitinib. Tras la administración simultánea de LC se restauran los valores normales, no observándose efectos significativos en el grupo WLC.

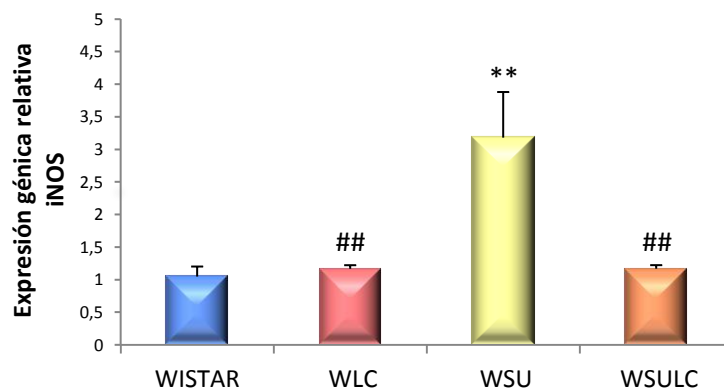


Figura 25. Expresión génica de la enzima iNOS en corazón de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en la expresión 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; ## $P < 0,01$ comparado con WSU.

3.9. Expresión génica y proteica de Nox2

Los resultados obtenidos en la determinación de la expresión génica de Nox2 (subunidad de membrana de la enzima NADPH oxidasa; apartado 2.3 de la sección *Introducción*) fueron superiores (5,8 veces) en el grupo tratado con sunitinib, produciéndose un descenso que llega hasta la normalidad tras la administración simultánea de LC (figura 26).

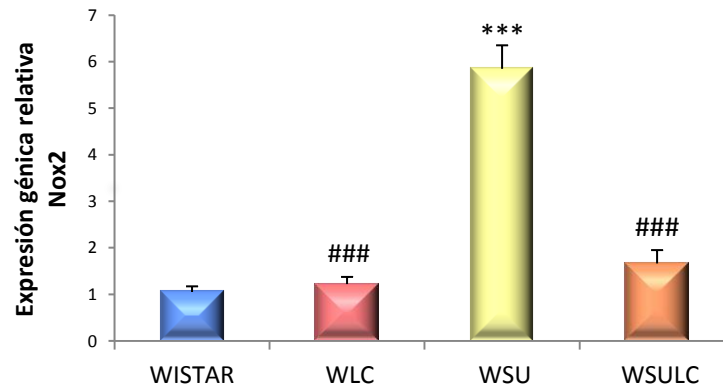


Figura 26. Expresión génica de la subunidad Nox2 de la enzima NADPH oxidasa en corazón de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Los cambios 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; ### $P < 0,001$ comparado con WSU.

Coincidiendo con los resultados de expresión génica, los niveles proteicos relativos de Nox2 en homogeneizados de corazón aumentan en las ratas tratadas con sunitinib. Estos valores fueron menores en el grupo sometido a tratamiento simultáneo con LC, llegando a alcanzar los niveles observados en las ratas controles (figura 27).

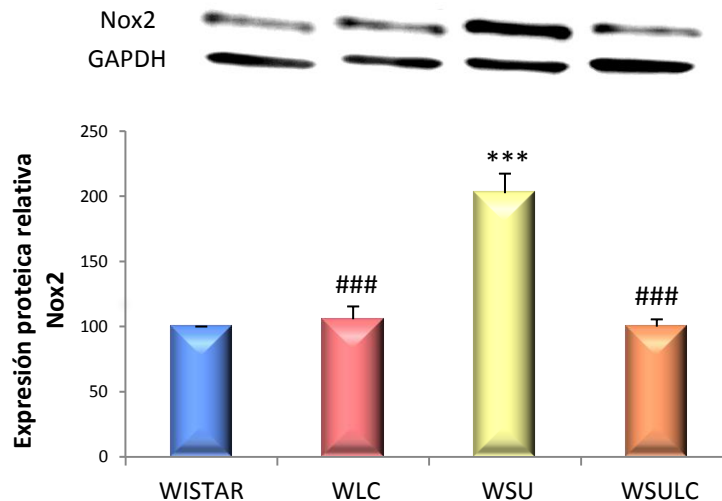


Figura 27. Expresión proteica de la subunidad Nox2 de la enzima NADPH oxidasa en homogeneizados de corazón procedentes de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $P < 0,001$ comparado con Wistar; ### $P < 0,001$ comparado con WSU.

3.10. Expresión génica de citoquinas inflamatorias

Como se observa en la figura 28, las ratas tratadas con sunitinib presentaron una mayor expresión de las interleuquinas proinflamatorias (2,7 y 4,2 veces para IL-1 β e IL-6, respectivamente), junto con una disminución en la expresión de la interleuquina antiinflamatoria IL-10 (3 veces), al compararlos con los valores observados en las ratas Wistar. La administración simultánea de LC consiguió revertir estos valores, aproximándolos a los encontrados en el grupo control.

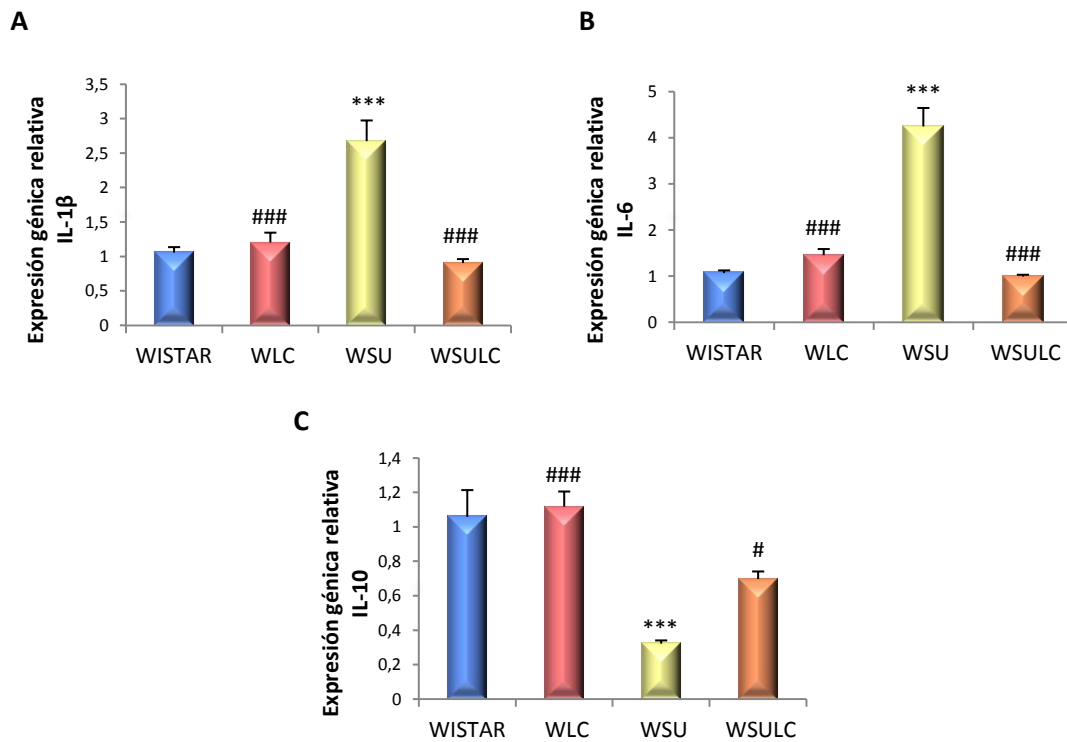


Figura 28. Expresión génica de la citoquina IL-1 β (A), IL-6 (B) e IL-10 (C) en corazón de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Los cambios 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; # P < 0,05, ### P < 0,001 comparado con WSU.

3.11. Estudio morfométrico del grado de fibrosis cardiaca

Como se aprecia en la figura 29, las muestras teñidas con tricrómico de Masson revelaron un incremento del tejido conectivo, a nivel intersticial y perivascular, en ratas tratadas con sunitinib, lo que se traduce en fibrosis cardiaca en las aéreas mencionadas. Sin embargo, las ratas tratadas con LC y sunitinib simultáneamente no presentaron fibrosis, ofreciendo un aspecto similar al observado en los grupos Wistar y WLC.

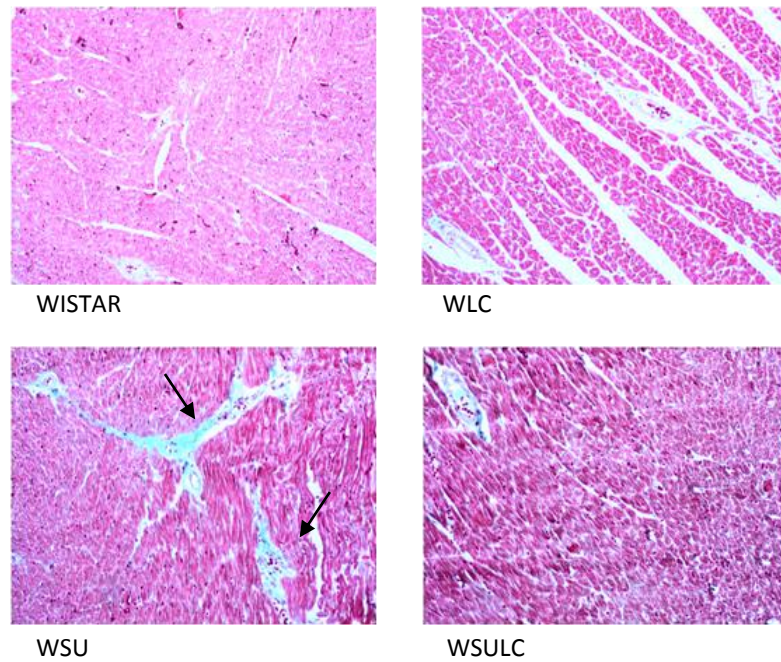


Figura 29. Estudio de la fibrosis en muestras de corazón teñidas con tricrómico de Masson. Micrografías representativas de muestras teñidas con la técnica tricrómico de Masson en corazón de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Aumento 100x.

Con el fin de cuantificar el grado de fibrosis, realizamos un estudio morfométrico en el que analizamos las muestras teñidas con Rojo Sirio mediante un sistema de análisis computerizado. El espacio intersticial ocupado por la matriz extracelular fue significativamente mayor en las ratas tratadas con sunitinib con respecto a las ratas controles (Wistar). Sin embargo, el tratamiento simultáneo con LC disminuyó las áreas de fibrosis intersticial, llegando a revertir el grado de fibrosis cardiaca en estas ratas y asemejándose sus imágenes a las encontradas en las ratas controles (figura 30).

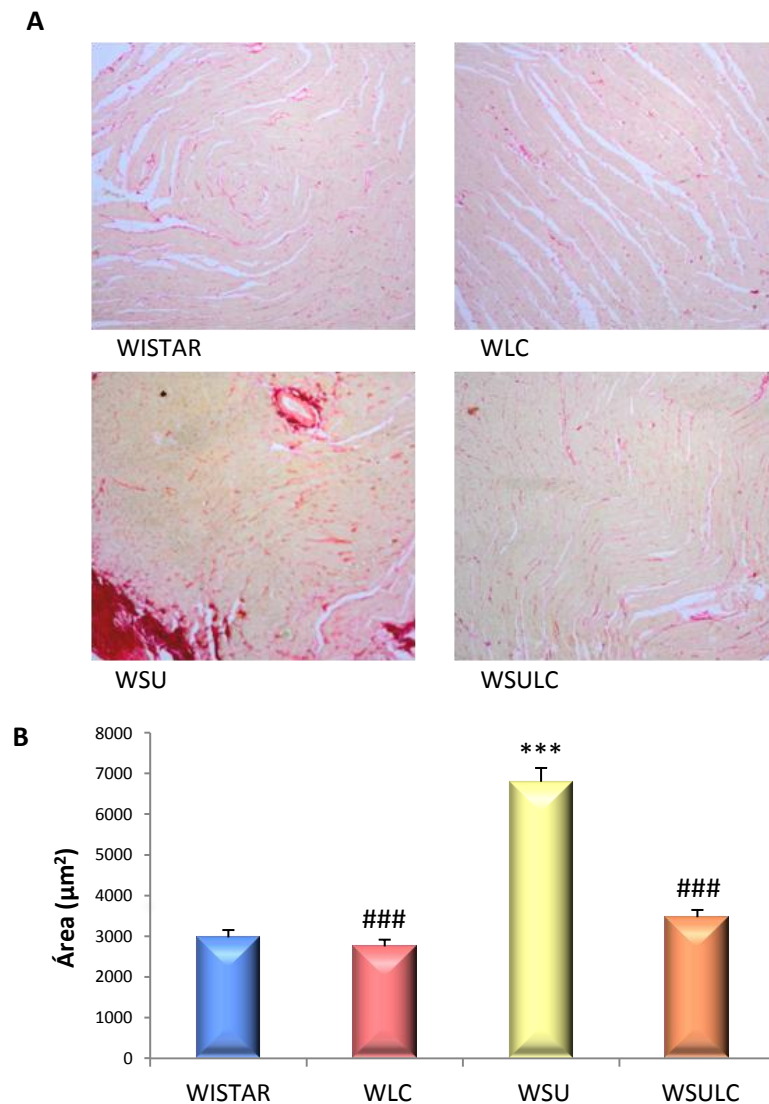


Figura 30. Estudio morfométrico de la fibrosis intersticial cardiaca. (A) Micrografías representativas de muestras de corazón teñidas con Rojo Sirio en ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Aumento 40x. **(B)** Análisis de imagen, muestra la cuantificación de la fibrosis intersticial según el protocolo detallado en el apartado 7.3 de la sección *Materiales y métodos*. Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $P < 0,001$ comparado con Wistar; ### $P < 0,001$ comparado con WSU.

3.12. Expresión génica de colágeno fibrilar tipo I

En la determinación de la expresión génica de colágeno fibrilar tipo I, se aprecia un aumento significativo (5,3 veces) de sus niveles en el grupo tratado con sunitinib, produciéndose un descenso que llega hasta la normalidad tras el tratamiento simultáneo con LC (figura 31).

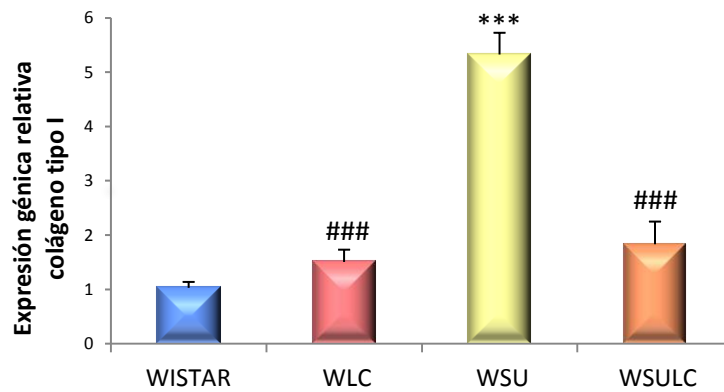


Figura 31. Expresión génica de colágeno tipo I en corazón de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en la expresión 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; ### $P < 0,001$ comparado con WSU.

3.13. Expresión génica de factores profibróticos

Cuando analizamos los resultados de la expresión génica de las citoquinas profibróticas TGF- β_1 y CTGF, se puede observar cómo el grupo tratado con sunitinib presenta unos valores significativamente mayores (4,9 y 5,6 veces, respectivamente) a los observados en el grupo control. Dicha alteración se normaliza tras la administración simultánea de LC (figura 32).

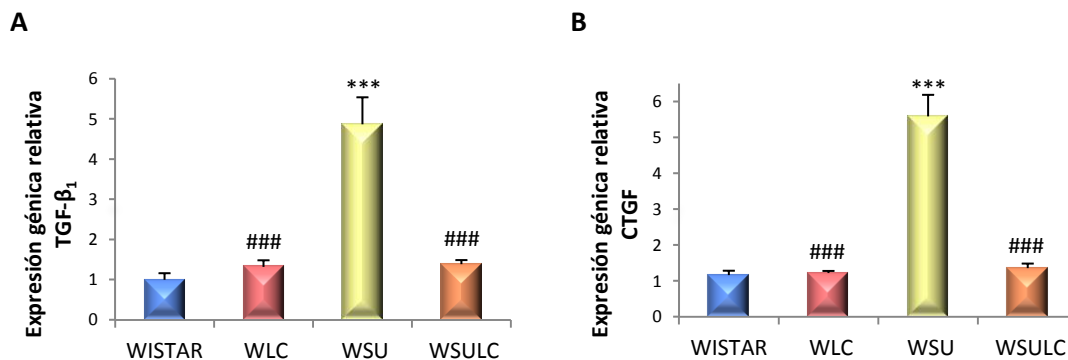


Figura 32. Expresión génica de TGF- β_1 (A) y CTGF (B) en corazón de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en 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; ### $P < 0,001$ comparado con WSU.

3.14. Expresión génica de ET-1

Al analizar los resultados correspondientes a la expresión génica de la ET-1 (figura 33), se observa un notable incremento (27 veces) en el grupo tratado con sunitinib. Tras la administración simultánea de LC se restauran los valores normales, no observándose efectos significativos en el grupo WLC.

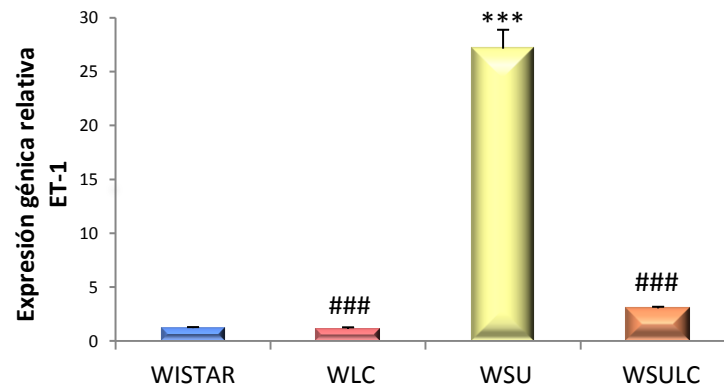


Figura 33. Expresión génica de la ET-1 en corazón de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media \pm error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en la expresión de 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; ### P < 0,001 comparado con WSU.

3.15. Expresión génica de NF- κ B

La expresión génica del factor NF- κ B aumenta de forma significativa (4,5 veces) en las ratas tratadas con sunitinib con respecto al grupo control. Cuando estas ratas fueron tratadas con LC, se consiguió una reversión en la expresión de este factor, llegándose a alcanzar valores similares a los animales controles (figura 34).

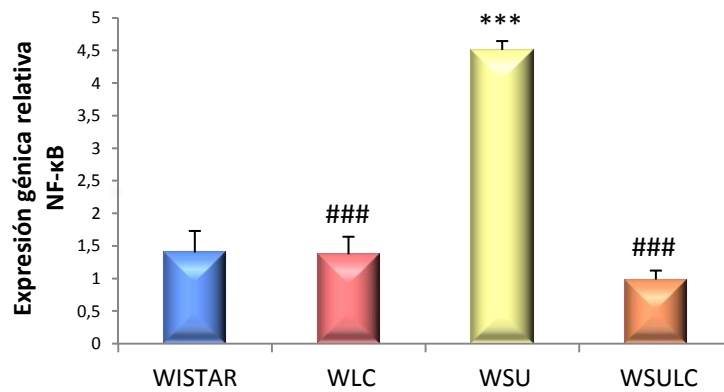


Figura 34. Expresión génica de NF-κB en corazón de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media ± error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en la expresión de ARNm 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; ### P < 0,001 comparado con WSU.

3.16. Expresión génica de PPAR-γ

Como se observa en la figura 35, la expresión génica de PPAR-γ es aproximadamente 6 veces inferior en el grupo tratado con sunitinib con respecto al grupo control. El tratamiento simultáneo con LC logró elevar significativamente estos valores, llegando a normalizarlos.

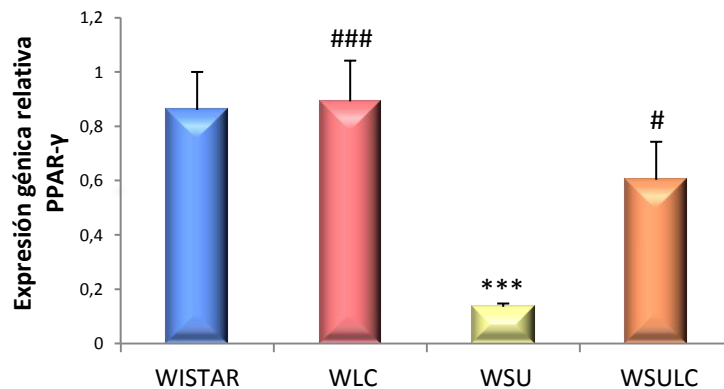


Figura 35. Expresión génica de PPAR-γ en corazón de ratas controles (WISTAR), tratadas con L-carnitina (WLC), con sunitinib (WSU) o con ambos compuestos (WSULC). Los resultados representan la media ± error estándar de al menos 6 animales en cada grupo. Los cambios cuantitativos en la expresión de ARNm 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; # P < 0,05, ### P < 0,001 comparado con WSU.

Discusión

1. ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE SUNITINIB EN RATAS: EFECTOS ADVERSOS ASOCIADOS

El descubrimiento de nuevas terapias dirigidas a inhibir las vías moleculares implicadas en la oncogénesis y en el crecimiento del tumor ha revolucionado el tratamiento de muchos tumores sólidos. En este sentido, el sunitinib, fármaco perteneciente al grupo terapéutico de los inhibidores de tirosinas kinasas, ha sido aprobado para el tratamiento del CCR, GIST y pNET;^{3,4,16} su uso también está siendo evaluado en otro tipo de tumores en los que el sunitinib prolonga la supervivencia de los pacientes.⁵⁻⁹ Como se menciona en el apartado 1.4 de la sección *Introducción*, la cardiotoxicidad y la HTA son efectos frecuentes, y en ocasiones graves, de las terapias antiangiogénicas. Sin embargo, y a pesar de la creciente cantidad de datos clínicos y de la mejora de los métodos de diagnóstico, los mecanismos moleculares responsables de la toxicidad cardiovascular asociada al uso del sunitinib no están claros.

En nuestro estudio se observa, en primer lugar, un descenso significativo en el peso de los animales tratados con sunitinib al final del periodo experimental, como ya ha sido puesto de manifiesto previamente por otros autores.⁴⁶ En cuanto al peso del corazón e índice cardiaco, nuestro trabajo muestra un aumento de ambos parámetros en las ratas tratadas con sunitinib, lo que indica la presencia de un corazón hipertrofiado en estos animales. Estos resultados no coinciden con los observados por Kerkela y col.³³ y Kappers y col.,⁴⁶ llevados a cabo en ratones y ratas tratados con sunitinib, respectivamente, en los cuales no se observaron diferencias significativas en la masa ventricular izquierda entre los animales controles y aquellos sometidos a tratamiento con sunitinib. Aunque la dosis diaria de sunitinib es similar en todos los casos (25 mg/Kg/día), esta discrepancia podría ser atribuida a la mayor duración del tratamiento en nuestro estudio (8 semanas, frente a las 5 semanas de Kerkela y col. y los 8 días de Kappers y col.), que hace que la dosis total acumulada haya sido superior en nuestro caso.

Como era de esperar, basándonos en la literatura previa al respecto,^{46-48,296,297} las cifras de presión arterial sistólica y diastólica y la frecuencia cardiaca aumentan en las ratas tratadas con sunitinib al compararlas con los valores observados en las ratas controles. El mecanismo fisiopatológico responsable de la HTA que subyace en la toxicidad cardiovascular inducida por los ITKs no se conoce con exactitud. Como se indica en el apartado 1.5.1 de la sección *Introducción*, puede estar relacionado con su efecto antagonista sobre las vías de señalización de VEGF, ya que este antagonismo puede resultar

en incremento del estrés oxidativo, disfunción endotelial asociada con una reducción de la producción del NO y *rarefacción vascular*;^{26,44,298} mecanismos todos ellos que llevarían a un aumento de la resistencia vascular periférica, con la consiguiente elevación de la presión arterial.²⁹⁹

Una de las teorías más relevantes apunta al hecho de que el estrés oxidativo podría jugar un papel importante en el desarrollo de la HTA que acompaña a la toxicidad cardiovascular. De hecho, se ha demostrado que el VEGF ejerce un papel protector contra el daño endotelial ejercido por las ERO.⁴² Además, Bridges y col.⁴¹ demostraron que tras administrar una infusión crónica de sFlt-1 (*soluble fms-like tyrosine kinase 1*, un antagonista de VEGF) en ratas preñadas, se producía un aumento de la presión arterial y los niveles de $\cdot\text{O}_2^-$ en la vasculatura, sugiriendo una relación entre la HTA y el aumento de estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es una consecuencia tanto de la síntesis excesiva de ERO como de la disminución de su degradación por el sistema antioxidante (apartado 2 de la sección *Introducción*). Nuestros resultados muestran que, en efecto, existe una alteración en las actividades de aquellas enzimas implicadas en la defensa antioxidante del organismo tras el tratamiento con sunitinib. Así se observa una disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes GPx, GR y SOD en eritrocitos procedentes de ratas tratadas con el fármaco. Como las enzimas GPx y SOD son responsables de eliminar el H_2O_2 y el $\cdot\text{O}_2^-$, respectivamente, la disminución de su actividad sugiere un incremento en la producción sistémica de ERO en las ratas tratadas con este fármaco. Junto con estos cambios observados en el estado oxidativo sistémico de los animales tratados con sunitinib, el estudio del ventrículo izquierdo de estos animales nos muestra una menor actividad de las enzimas GPx y SOD, aunque la actividad cardiaca de la GR no se modifica. Ya que la GPx cataliza la reducción de H_2O_2 a expensas del GSH, la disminución de la actividad cardiaca de esta enzima podría deberse a una reducción en la concentración de GSH y a una disminución en la relación cardiaca de GSH/GSSG como previamente se ha demostrado en el hígado y corazón de ratas hipertensas.^{272,273} Sin embargo, al analizar la relación cardiaca GSH/GSSG, no encontramos diferencias significativas entre los niveles de las ratas controles y las ratas tratadas con sunitinib. Para explicar los cambios observados en las actividades de las diferentes enzimas antioxidantes, realizamos estudios de expresión génica y proteica, y los resultados presentaron patrones similares, indicando que los cambios funcionales observados en las actividades enzimáticas son debidos a alteraciones en la cantidad de ARNm y en la abundancia relativa de las correspondientes proteínas. Además, se demuestra que existe un aumento en los niveles de peroxidación lipídica y en el grado de

nitrosilación de proteínas en el ventrículo izquierdo de los animales tratados con sunitinib, indicándonos la presencia de estrés oxidativo a nivel cardiaco. De la misma manera, se observa un incremento en la expresión génica y proteica de la subunidad Nox2 de la enzima NADPH oxidasa en los corazones de las ratas tratadas con sunitinib. Esta enzima, como se describe en el apartado 2.3 de la sección *Introducción*, es la principal fuente de radicales libres en el sistema cardiovascular. Aunque habría que indicar que el aumento en la expresión de la enzima NADPH oxidasa no implica necesariamente un aumento en su actividad, nuestros resultados en su conjunto apuntan a un aumento en el estrés oxidativo y en la producción de la principal ERO, el $\cdot\text{O}_2^-$, en las ratas tratadas con sunitinib.

Existe un gran número de trabajos, utilizando tanto animales de experimentación como humanos, que muestran una clara relación entre la presencia de estrés oxidativo y la HTA. De esta forma, se ha demostrado una disminución en la actividad y expresión de enzimas antioxidantes y un mayor grado de peroxidación lipídica en el corazón y riñón de diversos modelos de ratas hipertensas,^{241,275,300} así como en pacientes con hipertensión esencial.³⁰¹ En cuanto a la enzima NADPH oxidasa, se conoce que está altamente relacionada con la fisiopatología de la HTA, y su actividad se ha mostrado elevada tanto en células de la musculatura lisa vascular de pacientes hipertensos como en modelos experimentales de HTA.^{68,79}

Podemos concluir, pues, que la administración de sunitinib en ratas produce un aumento en el estrés oxidativo sistémico y cardiaco que podría contribuir a la fisiopatología de la toxicidad cardiovascular desarrollada tras el tratamiento con este fármaco; esta observación coincide con una de las teorías barajadas en la actualidad para explicar los efectos adversos del fármaco sobre el sistema cardiovascular.

Como se ha comentado anteriormente, otra teoría que se postula en referencia a la HTA y toxicidad cardiovascular inducida por los ITKs es la relacionada con la inhibición, o falta de estimulación, de la vía del NO. En este sentido, varios trabajos demuestran que el VEGF aumenta la transcripción y traducción de la eNOS, incrementando así la producción de NO,^{35,36,40} por lo tanto, la inhibición de la vía de señalización del VEGF reduce la biodisponibilidad del NO, resultando en vasoconstricción y consiguiente elevación de la presión arterial.^{38,39} Así, en un estudio realizado en ratones a los que se les administró DC101 (anticuerpo que bloquea el VEGFR) se observó una disminución en la expresión génica de la eNOS en el riñón, con la consiguiente elevación de la presión arterial en esos animales.³⁰² Otro estudio llevado a cabo por Mayer y col.,³⁷ mostró cómo el tratamiento de

cultivos de células endoteliales con vadetanib, otro ITK, disminuía la actividad de la eNOS y la cantidad de NO extracelular en ese tipo de células. Además, Kappers y col.⁴⁸ encontraron una disminución en los niveles de NO en orina de ratas tratadas con sunitinib. Estos estudios difieren de los resultados obtenidos en este trabajo, en el que encontramos un aumento de 1,6 veces en los niveles de NO en el corazón de ratas tratadas con sunitinib. Al analizar la expresión génica y proteica de la eNOS, observamos también cómo se produce un aumento de ambos parámetros tras la administración de sunitinib. Sin embargo, al estudiar el grado de fosforilación de la eNOS en el residuo de serina en posición 1177 (pS1177), advertimos cómo esta fosforilación disminuye de forma significativa en el grupo de ratas tratadas con sunitinib, lo que indica que la enzima eNOS se encontraría menos activa en dicho grupo³⁰³ y sería incapaz de generar NO en cantidades óptimas.

Para intentar explicar esta aparente discrepancia, decidimos analizar la expresión génica de la isoforma inducible de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS), observando que en las ratas tratadas con sunitinib existe una mayor expresión de esta enzima. La iNOS es una enzima indetectable bajo condiciones fisiológicas, pero en procesos celulares anormales, como la insuficiencia cardíaca, es inducida por citoquinas y agentes inflamatorios, lo que resulta en un alto flujo de NO.³⁰⁴ La sobreactividad de la iNOS en situaciones de estrés oxidativo puede desembocar en formación de peroxinitritos (por reacción del NO con $\cdot\text{O}_2^-$), induciendo de este modo un estrés nitrosativo. Por lo tanto, el incremento de la expresión y actividad de la iNOS puede tener consecuencias perjudiciales para el sistema cardiovascular y contribuir a la generación de HTA.³⁰⁵ Aunque no hemos encontrado en la bibliografía estudios adicionales que determinen los niveles de NO/iNOS en el corazón de animales tratados con ITKs, cabe sugerir, en función de nuestros resultados, que los altos niveles de NO observados en el corazón de ratas tratadas con sunitinib podrían provenir principalmente de la enzima iNOS y contribuir a la generación de peroxinitritos; estos, a su vez, podrían reaccionar con residuos de tirosina, lo que explicaría los altos valores de nitrosilación de proteínas observados en este grupo de animales. Asimismo, la reacción del NO con $\cdot\text{O}_2^-$ podría reducir la biodisponibilidad efectiva del primero, contribuyendo de este modo a la vasoconstricción y elevación de la presión arterial secundaria al tratamiento con sunitinib.

Como se menciona en el apartado 2.4 de la sección *Introducción*, además del estrés oxidativo, la inflamación juega un papel importante en la fisiopatología de la HTA.¹⁴⁵ Es por ello que, tras confirmar la presencia de estrés oxidativo en nuestro grupo de ratas tratadas con sunitinib, también tenía interés para nuestro estudio investigar el efecto del fármaco sobre los mediadores de la inflamación. Así, las ratas tratadas con sunitinib muestran altos

niveles de expresión génica para las interleuquinas proinflamatorias IL-6 e IL-1 β a nivel cardiaco, así como una disminución en la expresión génica de la citoquina antiinflamatoria IL-10. En concordancia con nuestros resultados, Henderson y col.³⁰⁶ observaron un incremento de la citoquina proinflamatoria TNF α en corazones aislados de ratas perfundidos con sunitinib y otros ITKs.

Por otro lado, la HTA es un factor de riesgo para el desarrollo de fibrosis cardiaca, produciéndose alteraciones estructurales y funcionales a nivel cardiaco (apartado 3.2 de la sección *Introducción*). En nuestro estudio, las ratas tratadas con sunitinib presentan un incremento en el área de fibrosis cardiaca a nivel intersticial y perivascular. Estos cambios estructurales se acompañaron de alteraciones en la expresión génica de colágeno I y de los factores profibróticos TGF- β_1 y CTGF. La asociación entre el grado de fibrosis y el aumento en la expresión génica de los factores profibróticos es un hecho aceptado;^{167,179,194,209} de forma más concreta, el TGF- β_1 se ha relacionado con la fibrogénesis cardiaca ligada a la HTA.²²¹⁻²²⁴ En consonancia con nuestros resultados, Kojonazarov y col.²⁹⁶ mostraron un aumento en el área de fibrosis cardiaca a nivel intersticial y perivascular en ratas tratadas con sunitinib. Además, Chintalgattu y col.³⁰⁷ observaron la presencia de fibrosis miocárdica en corazones de ratones con delección del PDGFR- β (diana del sunitinib) y sometidos a situaciones de estrés inducidas por una sobrecarga de presión. Por otra parte, diversos trabajos experimentales han demostrado que el imatinib, otro ITK, puede aminorar la fibrogénesis en el corazón y en el hígado en diferentes modelos animales.^{308,309} A pesar de que ambos fármacos, el sunitinib y el imatinib, pertenecen al mismo grupo terapéutico de los ITKs, no poseen las mismas dianas farmacológicas, lo que podría explicar esta aparente controversia con respecto a sus efectos pro o antifibróticos.

En cualquier caso, las alteraciones encontradas en nuestro estudio sugieren que los procesos inflamatorios y fibróticos podrían también estar implicados en la fisiopatología de la toxicidad cardiovascular inducida por sunitinib.

Por último, hallazgos recientes indican que el sistema de la endotelina juega un papel importante en el desarrollo de la HTA inducida por sunitinib. Así, en dos experimentos realizados por el mismo grupo se observa cómo aumentan los niveles de ET-1 en el plasma de humanos y ratas tratados con sunitinib, proponiendo que el aumento de la presión arterial inducida por éste guarda relación con este incremento de los niveles circulantes de ET-1.^{46,48} Además, estos mismos investigadores han demostrado, en cerdos tratados con sunitinib, una normalización de la resistencia vascular sistémica y de la presión arterial tras

la administración de un antagonista de los receptores de la ET-1, sugiriendo que la vasoconstricción es el mecanismo más importante implicado en el aumento de la presión arterial durante la terapia antiangiogénica.⁴⁷ En línea con estos resultados, en el presente estudio encontramos un aumento en la expresión génica de ET-1 en el corazón de las ratas tratadas con sunitinib, en comparación con el grupo de ratas controles. La ET-1 es un péptido vasoconstrictor de 21 aminoácidos que está implicado en la fisiopatología de varias enfermedades cardiovasculares, como HTA, aterosclerosis e hipercolesterolemia.^{310,311} Existe abundante literatura que demuestra que la ET-1 ejerce parte de su efecto vasoconstrictor a través de la activación de la NADPH oxidasa y la generación de ERO.³¹²⁻³¹⁴ Además, está comprobado experimentalmente que la ET-1 también está implicada en la generación de fibrosis cardíaca,³¹⁵ dando lugar a la proliferación de fibroblastos cardíacos y promoviendo la síntesis de proteínas de la MEC.^{316,317 318}

En resumen, las ratas que recibieron un tratamiento de sunitinib durante 8 semanas, presentaron un incremento en los valores de presión arterial, junto con el desarrollo de estrés oxidativo y nitrosativo, y alteraciones en los mediadores inflamatorios con hipertrofia y fibrosis cardíaca. Ya que tanto el estrés oxidativo como la inflamación y la fibrosis juegan un papel patogénico en el desarrollo y progresión de la HTA, podemos intuir que estos tres procesos contribuyen a la toxicidad cardiovascular observada en el tratamiento con sunitinib. De manera adicional, podemos inferir que la ET-1 podría estar potenciando la acción de la NADPH oxidasa, a través de la cual podrían alterarse los parámetros de estrés oxidativo, inflamación y fibrosis presentes en las ratas tratadas con sunitinib.

2. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE L-CARNITINA EN RATAS TRATADAS CON SUNITINIB

Como refleja nuestra hipótesis de trabajo, debido a la repercusión clínica de las nuevas terapias antiangiogénicas en la curación de distintos tipos de tumores, resulta de gran trascendencia el desarrollo de nuevas estrategias para la prevención y el tratamiento de la HTA e insuficiencia cardíaca resultante de la administración del sunitinib, y la LC podría actuar aminorando o evitando el estrés oxidativo, la inflamación y la fibrosis cardíaca generados por el sunitinib.

En nuestro estudio, en primer lugar observamos que la reducción del peso corporal en los animales tratados con sunitinib se corrige con el tratamiento simultáneo con LC. A su vez, encontramos cómo la administración de LC hace desaparecer la hipertrofia cardíaca

causada por el sunitinib. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio en ratas con hipertensión arterial inducida por L-NAME, en las que la LC consigue restaurar el aumento del índice cardiaco provocado por el inhibidor de la síntesis de NO.²⁶⁷

Cuando las ratas tratadas con sunitinib recibieron un tratamiento crónico simultáneo con LC, observamos una disminución significativa de los valores de la presión arterial, que al final del periodo experimental llegan a alcanzar una reducción de 30 y 22 mm Hg para la PAS y PAD respectivamente, con respecto al grupo de sunitinib. Aunque los valores netos de PAD deben siempre ser manejados con precaución cuando se utiliza el método de oclusión de la arteria caudal (es decir, deben considerarse estimaciones más que cifras exactas), en cualquier caso nuestros resultados indican que la LC previene el incremento de presión arterial inducido por la administración de sunitinib. Este efecto hipotensor de la LC ya ha sido puesto de manifiesto en diferentes modelos experimentales de hipertensión arterial por nuestro grupo de investigación, así como por otros autores.^{241,267,273-275}

Como hemos señalado en el apartado anterior, las ratas tratadas con sunitinib presentan un aumento en su estado oxidativo sistémico y cardiaco. Sin embargo, cuando el tratamiento de sunitinib fue realizado administrando simultáneamente la LC, las actividades de las tres enzimas antioxidantes medidas en los eritrocitos se incrementaron de forma significativa hasta alcanzar los valores normales observados en el grupo control. En cuanto a los efectos del tratamiento simultáneo con LC sobre el estado oxidativo cardiaco, la LC ha sido capaz de revertir las alteraciones inducidas por sunitinib en la actividad y expresión génica y proteica de la GPx y SOD, así como en los valores de peroxidación lipídica y de nitrosilación de proteínas. Por tanto, nuestros resultados indican que la terapia combinada de sunitinib y LC protege al organismo del estrés oxidativo sistémico y cardiaco producido por la administración de sunitinib.

Existe abundante literatura que muestra la capacidad antioxidante de la LC;^{241,265,319,320} sin embargo, el presente estudio muestra por primera vez la capacidad de la LC para combatir el estrés oxidativo causado por el tratamiento con sunitinib. Recientemente, se ha sugerido que la suplementación con LC mejora la actividad antioxidante en sujetos sanos. Concretamente, en un estudio realizado por Cao y col.³²¹ se muestra cómo la administración de 2 gramos diarios de LC a sujetos sanos fue capaz de aumentar la concentración plasmática de la SOD y GPx, mejorando así la capacidad antioxidante en estos individuos. En nuestro trabajo, la LC también consiguió restaurar los valores de la

expresión génica y proteica de la subunidad Nox2 de la enzima NADPH oxidasa, lo que demuestra que, además de su capacidad de actuación sobre los sistemas enzimáticos de defensa, el efecto antioxidante de la LC en corazón está también mediado por su capacidad para regular la expresión de esta subunidad de la NADPH oxidasa. Estos datos están en consonancia con lo observado por nuestro grupo de investigación en el corazón y riñón de ratas hipertensas tras el tratamiento crónico con LC.^{267,268} Además, en un estudio llevado a cabo en pacientes sometidos a cirugía abdominal, el tratamiento con LC redujo los niveles de la subunidad Nox2 a nivel plaquetario, modulando así los niveles circulantes de ERO y mejorando el estado oxidativo de estos pacientes.²⁶⁵

En cuanto a los niveles de NO, el tratamiento simultáneo de sunitinib y LC normaliza los niveles cardíacos de nitratos y nitritos, así como la expresión de la enzima iNOS. Estos resultados están en consonancia por los obtenidos por Koc y col.,³²² quienes demostraron que el tratamiento con LC reduce la cantidad de NO y la expresión génica de la iNOS en macrófagos de ratón estimulados con LPS (lipopolisacárido). Por el contrario, la LC aumenta los niveles de nitratos y nitritos en el corazón y riñón de ratas con HTA generada por el tratamiento con L-NAME.^{241,268} En ciertas patologías, como la preeclampsia (un tipo de HTA durante el embarazo) existe también cierta controversia entre la síntesis y acción del NO en la vasculatura feto-placentaria.³²³ En todo caso, en nuestro estudio, el tratamiento simultáneo con sunitinib y LC restaura los parámetros fisiológicos observados en el grupo control.

Con respecto a las alteraciones producidas en los parámetros inflamatorios en el tratamiento con sunitinib, la administración simultánea de este fármaco y LC mostró una disminución de la expresión génica de IL-6 e IL-1 β , así como un aumento en la expresión génica de IL-10, revirtiendo los valores de estas citoquinas a la normalidad y sugiriendo un efecto antiinflamatorio de la LC a nivel cardíaco. Estos hallazgos concuerdan con los observados en anteriores investigaciones, donde se muestra el efecto antiinflamatorio de la LC a nivel sistémico y cardíaco tanto en pacientes con hipertensión esencial como en varios modelos de ratas hipertensas.^{269,285,324} En un estudio realizado en ratas con cáncer, el tratamiento con 250 mg de LC/kg/día trajo consigo una mejora en el estado de caquexia observado en estos animales, y los autores asociaron este efecto beneficioso de la LC a la reducción observada en los niveles plasmáticos de citoquinas, así como a la mejora del estado inflamatorio.³²⁵

Si bien es cierto que existe una gran cantidad de resultados que muestran los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de la suplementación con LC, los mecanismos de acción al respecto siguen sin estar definidos. Es bien sabido que un aumento de las ERO desencadena multitud de vías sensibles a redox; tal es el caso del factor de transcripción NF- κ B. Como mencionamos en el apartado 2.4 de la sección *Introducción*, la activación de NF- κ B promueve la expresión génica de enzimas proinflamatorias, y la elevación de ERO provoca un aumento en la expresión génica de NF- κ B,^{160,326,327} estableciéndose de este modo una interacción entre mecanismos oxidantes e inflamatorios. Estos hallazgos están en consonancia con nuestros resultados obtenidos en el corazón de ratas tratadas con sunitinib, en las que se aprecia una elevación importante en la expresión génica de NF- κ B. El tratamiento con la LC revirtió este parámetro a cifras normales, lo que sugiere un efecto mediador del NF- κ B en los efectos beneficiosos de la LC. Existen varios trabajos que apoyan esta teoría. Así, en un estudio realizado por nuestro grupo de investigación, se muestra que el tratamiento con la LC restaura los valores de la expresión génica de NF- κ B en ratas con hipertensión espontánea (SHR).²⁴¹ Además, en un estudio reciente realizado por Koc y col.,³²² se muestra cómo el tratamiento con LC reduce la actividad de NF- κ B en macrófagos de ratón estimulados con LPS.

Además del aumento en el estrés oxidativo y la inflamación, las ratas tratadas con sunitinib presentaron un grado notable de fibrosis cardiaca. Tras la terapia combinada de sunitinib y LC, se observó una clara reducción en el grado de fibrosis cardiaca, tanto a nivel intersticial como perivascular, además de una reducción en la expresión génica y proteica de los marcadores profibróticos TGF- β_1 y CTGF. De este modo, nuestro estudio pone de manifiesto el papel antifibrótico y cardioprotector de la LC en el corazón de las ratas bajo tratamiento con sunitinib, gracias a una reducción en la síntesis de Col I, a través de la acción de la LC sobre la vía del TGF β_1 . En un reciente estudio, Omori y col.³²⁸ describen el efecto antifibrótico de la LC en ratas con hipertensión e insuficiencia cardiaca. En dicho estudio, el tratamiento con LC fue capaz de restaurar los niveles cardiacos de componentes de la matriz extracelular hasta valores normales. Estos hallazgos concuerdan con lo observado por nuestro grupo de investigación en ratas con HTA generada por el tratamiento con L-NAME, donde el tratamiento con LC redujo los altos depósitos de colágeno observados en estas ratas, así como la expresión génica de TGF- β_1 y CTGF.²⁶⁷

Como indicamos en el apartado 2.3 de la sección *Introducción*, en los últimos años se ha demostrado el papel de la familia de factores de transcripción PPARs en el desarrollo de diferentes enfermedades cardiovasculares, tales como la HTA y la aterosclerosis,^{133,329}

describiéndose sus efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antifibróticos. Lin y col.³³⁰ mostraron que PPAR α inhibía las ERO inducidas por la administración de doxorubicina en células tubulares renales, protegiendo a estas células de la apoptosis inducida por la dicho fármaco. Además, existen datos que apuntan al hecho de que los efectos de la LC podrían estar mediados por miembros de la familia PPARs. Así, en un estudio realizado por Li y col.,³¹⁹ se muestra cómo el efecto antioxidante de la LC en hepatocitos humanos expuestos a H₂O₂ está mediado por la acción de PPAR α . De la misma forma, otros trabajos han puesto de manifiesto la participación de la familia PPARs en los efectos antiapoptótico y cardioprotector de la LC.^{331,332} Además, nuestro grupo de investigación ha demostrado que el efecto antifibrótico de la L-carnitina a nivel renal, en ratas tratadas con L-NAME, está mediado, al menos en parte, por el factor de transcripción PPAR γ ²⁶⁷ Por todo esto, uno de los objetivos de nuestro estudio fue valorar si los efectos cardioprotectores de la LC observados en ratas tratadas con sunitinib podrían estar también mediados por la acción de este factor de transcripción. En efecto, nuestros resultados muestran una disminución significativa en la expresión de PPAR γ en las ratas tratadas con sunitinib, disminución que desaparece tras el tratamiento simultáneo con LC.

Finalmente, y como indicamos en el anterior apartado, las ratas tratadas con sunitinib presentan un aumento en la expresión génica de ET-1, sugiriendo que el sistema de la endotelina juega un papel importante en el desarrollo de la toxicidad cardiovascular inducida por el fármaco. De manera adicional, nuestros resultados muestran que la administración conjunta de sunitinib y LC consiguió restaurar la expresión génica de ET-1, sugiriendo una acción directa de la LC sobre la vía de la endotelina. Este resultado concuerda con un estudio realizado en pacientes en hemodiálisis que recibieron tratamiento con LC, en los que se observa una disminución de los niveles de ET-1 en plasma.³³³ Además, la ET-1 está también relacionada con el factor de transcripción PPAR γ .³³⁴ Así, se ha demostrado que PPAR γ inhibe la producción de ET-1 inducida por trombina en células endoteliales,³³⁵ y que un agonista de PPAR γ es capaz de disminuir la producción de ET-1, efecto que se asoció con un descenso de la presión arterial.³³⁶ Por todo ello, podríamos sugerir que la LC ejerce un efecto sobre la ET-1 a través de la modulación de PPAR γ .

En resumen, la LC actúa protegiendo al corazón del estrés oxidativo, inflamación y fibrosis inducidos por la administración de sunitinib, consiguiendo asimismo recuperar las cifras de normotensión en los animales tratados simultáneamente con ambos compuestos. Las acciones beneficiosas de la LC podrían ejercerse a través de la modulación de los factores

de transcripción NF- κ B y PPAR γ . Nuestro estudio identifica por primera vez a la LC como un agente terapéutico deseable para la prevención del daño cardíaco e HTA inducidos por sunitinib, mediante la atenuación del estrés oxidativo, inflamación y fibrosis. Por tanto, el uso de L-carnitina en combinación con sunitinib podría ayudar a mejorar los efectos adversos derivados de las terapias destinadas a la inhibición de las vías moleculares implicadas en la oncogénesis y el crecimiento del tumor. Creemos que nuestros datos son alentadores y suponen una base racional para emprender nuevos estudios preclínicos que eventualmente allanen el camino a una potencial nueva aplicación clínica de la L-carnitina.

Conclusiones

La realización del presente trabajo nos ha permitido extraer las siguientes conclusiones:

1. La administración de LC en terapia combinada con sunitinib aminora la pérdida de peso corporal y la hipertrofia cardiaca asociadas al tratamiento con el inhibidor de tirosinas kinasas.
2. La terapia combinada de sunitinib y LC restaura los valores de presión arterial y de frecuencia cardiaca, corrigiendo la hipertensión arterial y taquicardia asociadas al tratamiento con sunitinib.
3. La LC mejora el estrés oxidativo inducido por sunitinib, tanto a nivel sistémico como a nivel cardiaco.
4. La adición de LC a la terapia con sunitinib disminuye los procesos inflamatorios a nivel cardiaco asociados al tratamiento con sunitinib.
5. La terapia combinada de sunitinib y LC reduce la fibrosis cardiaca inducida por el primero.
6. Este efecto beneficioso de la LC en el daño cardiovascular inducido por sunitinib podría estar mediado por los factores de transcripción NF- κ B y PPAR γ .
7. El presente estudio identifica por primera vez a la LC como un agente terapéutico deseable para la prevención del daño cardiaco e HTA inducidos por sunitinib, y podría constituir la base de nuevos estudios que justifiquen una posible nueva aplicación clínica de la carnitina.

Bibliografía

1. Speed B, Bu HZ, Pool WF, et al. Pharmacokinetics, distribution, and metabolism of [14C]sunitinib in rats, monkeys, and humans. *Drug Metab Dispos*. 2012;40(3):539-555.
2. Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(1):16-24.
3. Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR, et al. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: A randomised controlled trial. *Lancet*. 2006;368(9544):1329-1338.
4. Raymond E, Dahan L, Raoul JL, et al. Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 2011;364(6):501-513.
5. Novello S, Scagliotti GV, Rosell R, et al. Phase II study of continuous daily sunitinib dosing in patients with previously treated advanced non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2009;101(9):1543-1548.
6. Burstein HJ, Elias AD, Rugo HS, et al. Phase II study of sunitinib malate, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane. *J Clin Oncol*. 2008;26(11):1810-1816.
7. Socinski MA. The current status and evolving role of sunitinib in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2008;3(6 Suppl 2):S119-23.
8. Zurita AJ, Shore ND, Kozloff MF, et al. Distinct patterns of PSA modulation by single-agent sunitinib before combination with docetaxel and prednisone in patients with metastatic castrateresistant prostate cancer (CRPCa). *Proc Am Soc Clin Oncol*. 2007;25:5134.
9. Saltz LB, Rosen LS, Marshall JL, et al. Phase II trial of sunitinib in patients with metastatic colorectal cancer after failure of standard therapy. *J Clin Oncol*. 2007;25(30):4793-4799.
10. Faivre S, Delbaldo C, Vera K, et al. Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(1):25-35.
11. Aparicio-Gallego G, Blanco M, Figueroa A, et al. New insights into molecular mechanisms of sunitinib-associated side effects. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(12):2215-2223.
12. Patyna S, Laird AD, Mendel DB, et al. SU14813: A novel multiple receptor tyrosine kinase inhibitor with potent antiangiogenic and antitumor activity. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(7):1774-1782.
13. Abrams TJ, Lee LB, Murray LJ, Pryer NK, Cherrington JM. SU11248 inhibits KIT and platelet-derived growth factor receptor beta in preclinical models of human small cell lung cancer. *Mol Cancer Ther*. 2003;2(5):471-478.
14. O'Farrell AM, Abrams TJ, Yuen HA, et al. SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood*. 2003;101(9):3597-3605.

15. Mendel DB, Laird AD, Xin X, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: Determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res.* 2003;9(1):327-337.
16. Motzer RJ, Rini BI, Bukowski RM, et al. Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA.* 2006;295(21):2516-2524.
17. Hutson TE, Figlin RA, Kuhn JG, Motzer RJ. Targeted therapies for metastatic renal cell carcinoma: An overview of toxicity and dosing strategies. *Oncologist.* 2008;13(10):1084-1096.
18. Kontovinis LF, Papazisis KT, Touplikioti P, Andreadis C, Mouratidou D, Kortsaris AH. Sunitinib treatment for patients with clear-cell metastatic renal cell carcinoma: Clinical outcomes and plasma angiogenesis markers. *BMC Cancer.* 2009;9:82-2407-9-82.
19. Altena R, Perik PJ, van Veldhuisen DJ, de Vries EG, Gietema JA. Cardiovascular toxicity caused by cancer treatment: Strategies for early detection. *Lancet Oncol.* 2009;10(4):391-399.
20. Schmidinger M, Zielinski CC, Vogl UM, et al. Cardiac toxicity of sunitinib and sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2008;26(32):5204-5212.
21. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2007;356(2):115-124.
22. Chu TF, Rupnick MA, Kerkela R, et al. Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *Lancet.* 2007;370(9604):2011-2019.
23. Khakoo AY, Kassiotis CM, Tannir N, et al. Heart failure associated with sunitinib malate: A multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor. *Cancer.* 2008;112(11):2500-2508.
24. Telli ML, Witteles RM, Fisher GA, Srinivas S. Cardiotoxicity associated with the cancer therapeutic agent sunitinib malate. *Ann Oncol.* 2008;19(9):1613-1618.
25. Rock EP, Goodman V, Jiang JX, et al. Food and drug administration drug approval summary: Sunitinib malate for the treatment of gastrointestinal stromal tumor and advanced renal cell carcinoma. *Oncologist.* 2007;12(1):107-113.
26. Zhu X, Stergiopoulos K, Wu S. Risk of hypertension and renal dysfunction with an angiogenesis inhibitor sunitinib: Systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol.* 2009;48(1):9-17.
27. Rini BI, Cohen DP, Lu DR, et al. Hypertension as a biomarker of efficacy in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(9):763-773.
28. van der Veldt AA, Boven E, Helgason HH, et al. Predictive factors for severe toxicity of sunitinib in unselected patients with advanced renal cell cancer. *Br J Cancer.* 2008;99(2):259-265.

29. Gupta R, Maitland ML. Sunitinib, hypertension, and heart failure: A model for kinase inhibitor-mediated cardiotoxicity. *Curr Hypertens Rep.* 2011;13(6):430-435.
30. Curwen JO, Musgrove HL, Kendrew J, Richmond GH, Ogilvie DJ, Wedge SR. Inhibition of vascular endothelial growth factor- α signaling induces hypertension: Examining the effect of cediranib (recentin; AZD2171) treatment on blood pressure in rat and the use of concomitant antihypertensive therapy. *Clin Cancer Res.* 2008;14(10):3124-3131.
31. Franklin PH, Banfor PN, Tapang P, et al. Effect of the multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor, ABT-869 [N-(4-(3-amino-1H-indazol-4-yl)phenyl)-N'-(2-fluoro-5-methylphenyl)urea], on blood pressure in conscious rats and mice: Reversal with antihypertensive agents and effect on tumor growth inhibition. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;329(3):928-937.
32. Wong MK, Jarkowski A. Response to sorafenib after sunitinib-induced acute heart failure in a patient with metastatic renal cell carcinoma: Case report and review of the literature. *Pharmacotherapy.* 2009;29(4):473-478.
33. Kerkela R, Woulfe KC, Durand JB, et al. Sunitinib-induced cardiotoxicity is mediated by off-target inhibition of AMP-activated protein kinase. *Clin Transl Sci.* 2009;2(1):15-25.
34. Cheng H, Force T. Why do kinase inhibitors cause cardiotoxicity and what can be done about it? *Prog Cardiovasc Dis.* 2010;53(2):114-120.
35. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(5):359-371.
36. Zachary I. VEGF signalling: Integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans.* 2003;31(Pt 6):1171-1177.
37. Mayer EL, Dallabrida SM, Rupnick MA, et al. Contrary effects of the receptor tyrosine kinase inhibitor vandetanib on constitutive and flow-stimulated nitric oxide elaboration in humans. *Hypertension.* 2011;58(1):85-92.
38. Robinson ES, Khankin EV, Choueiri TK, et al. Suppression of the nitric oxide pathway in metastatic renal cell carcinoma patients receiving vascular endothelial growth factor-signaling inhibitors. *Hypertension.* 2010;56(6):1131-1136.
39. Bhargava P. VEGF kinase inhibitors: How do they cause hypertension? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;297(1):R1-5.
40. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol.* 1998;274(3 Pt 2):H1054-8.
41. Bridges JP, Gilbert JS, Colson D, et al. Oxidative stress contributes to soluble fms-like tyrosine kinase-1 induced vascular dysfunction in pregnant rats. *Am J Hypertens.* 2009;22(5):564-568.
42. Gonzalez-Pacheco FR, Deudero JJ, Castellanos MC, et al. Mechanisms of endothelial response to oxidative aggression: Protective role of autologous VEGF and induction of VEGFR2 by H₂O₂. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(3):H1395-401.

43. Abid MR, Schoots IG, Spokes KC, Wu SQ, Mawhinney C, Aird WC. Vascular endothelial growth factor-mediated induction of manganese superoxide dismutase occurs through redox-dependent regulation of forkhead and I κ B/NF- κ B. *J Biol Chem*. 2004;279(42):44030-44038.
44. Gurevich F, Perazella MA. Renal effects of anti-angiogenesis therapy: Update for the internist. *Am J Med*. 2009;122(4):322-328.
45. Steeghs N, Hovens M, Rabelink A. *VEGFR-2 blockade in patients with solid tumors: Mechanism of hypertension and effects on vascular function*. *J Clin Oncol*. 2006;24:130.
46. Kappers MH, van Esch JH, Sluiter W, Sleijfer S, Danser AH, van den Meiracker AH. Hypertension induced by the tyrosine kinase inhibitor sunitinib is associated with increased circulating endothelin-1 levels. *Hypertension*. 2010;56(4):675-681.
47. Kappers MH, de Beer VJ, Zhou Z, et al. Sunitinib-induced systemic vasoconstriction in swine is endothelin mediated and does not involve nitric oxide or oxidative stress. *Hypertension*. 2012;59(1):151-157.
48. Kappers MH, Smedts FM, Horn T, et al. The vascular endothelial growth factor receptor inhibitor sunitinib causes a preeclampsia-like syndrome with activation of the endothelin system. *Hypertension*. 2011;58(2):295-302.
49. Schiffrin EL. Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens*. 2001;14(6 Pt 2):83S-89S.
50. Hsieh PC, MacGillivray C, Gannon J, Cruz FU, Lee RT. Local controlled intramyocardial delivery of platelet-derived growth factor improves postinfarction ventricular function without pulmonary toxicity. *Circulation*. 2006;114(7):637-644.
51. Chintalgattu V, Ai D, Langley RR, et al. Cardiomyocyte PDGFR-beta signaling is an essential component of the mouse cardiac response to load-induced stress. *J Clin Invest*. 2010;120(2):472-484.
52. Cheng H, Force T. Molecular mechanisms of cardiovascular toxicity of targeted cancer therapeutics. *Circ Res*. 2010;106(1):21-34.
53. Will Y, Dykens JA, Nadanaciva S, et al. Effect of the multitargeted tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, sunitinib, and sorafenib on mitochondrial function in isolated rat heart mitochondria and H9c2 cells. *Toxicol Sci*. 2008;106(1):153-161.
54. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(Pt 5):1147-1150.
55. Parodi O, De Maria R, Roubina E. Redox state, oxidative stress and endothelial dysfunction in heart failure: The puzzle of nitrate-thiol interaction. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2007;8(10):765-774.
56. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95.

57. Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: Implications in hypertension. *Histochem Cell Biol.* 2004;122(4):339-352.
58. Ray R, Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond).* 2005;109(3):217-226.
59. Sedeek M, Hebert RL, Kennedy CR, Burns KD, Touyz RM. Molecular mechanisms of hypertension: Role of nox family NADPH oxidases. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2009;18(2):122-127.
60. Touyz RM, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: Implications in human hypertension. *Hypertens Res.* 2011;34(1):5-14.
61. Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 1997;272(30):18515-18517.
62. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: What is the clinical significance? *Hypertension.* 2004;44(3):248-252.
63. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem.* 1993;268(17):12231-12234.
64. Petruson K, Stalfors J, Jacobsson KE, Ny L, Petruson B. Nitric oxide production in the sphenoidal sinus by the inducible and constitutive isozymes of nitric oxide synthase. *Rhinology.* 2005;43(1):18-23.
65. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;284(1):R1-12.
66. Thomson L, Trujillo M, Telleri R, Radi R. Kinetics of cytochrome c²⁺ oxidation by peroxynitrite: Implications for superoxide measurements in nitric oxide-producing biological systems. *Arch Biochem Biophys.* 1995;319(2):491-497.
67. Welch WJ, Tojo A, Wilcox CS. Roles of NO and oxygen radicals in tubuloglomerular feedback in SHR. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;278(5):F769-76.
68. Montezano AC, Touyz RM. Molecular mechanisms of hypertension--reactive oxygen species and antioxidants: A basic science update for the clinician. *Can J Cardiol.* 2012;28(3):288-295.
69. Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease: Causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2008;5(6):338-349.
70. Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: Implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7(9-10):1302-1314.
71. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 2008;31 Suppl 2:S170-80.

72. Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2009;46(5-6):241-281.
73. Nishino T, Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T. Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J.* 2008;275(13):3278-3289.
74. Adlam D, Bendall JK, De Bono JP, et al. Relationships between nitric oxide-mediated endothelial function, eNOS coupling and blood pressure revealed by eNOS-GTP cyclohydrolase 1 double transgenic mice. *Exp Physiol.* 2007;92(1):119-126.
75. Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: Upstream mediators. *Circ Res.* 2002;91(5):406-413.
76. Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, et al. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: Role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2002;105(14):1656-1662.
77. Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Vaquero M, Delpón E. Effects of nitric oxide on cardiac function. 2006;6(Rev Esp Cardiol Sup):3A-20A.
78. Montezano AC, Burger D, Ceravolo GS, Yusuf H, Montero M, Touyz RM. Novel nox homologues in the vasculature: Focusing on Nox4 and Nox5. *Clin Sci (Lond).* 2011;120(4):131-141.
79. Montezano AC, Touyz RM. Oxidative stress, noxs, and hypertension: Experimental evidence and clinical controversies. *Ann Med.* 2012;44 Suppl 1:S2-16.
80. Fortuno A, Bidegain J, Baltanas A, et al. Is leptin involved in phagocytic NADPH oxidase overactivity in obesity? potential clinical implications. *J Hypertens.* 2010;28(9):1944-1950.
81. Fortuno A, Bidegain J, San Jose G, et al. Insulin resistance determines phagocytic nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase overactivation in metabolic syndrome patients. *J Hypertens.* 2009;27(7):1420-1430.
82. Picchi A, Gao X, Belmadani S, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circ Res.* 2006;99(1):69-77.
83. Delbosc S, Paizanis E, Magous R, et al. Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis.* 2005;179(1):43-49.
84. Sonta T, Inoguchi T, Tsubouchi H, et al. Evidence for contribution of vascular NAD(P)H oxidase to increased oxidative stress in animal models of diabetes and obesity. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(1):115-123.
85. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;86(5):494-501.

86. Babior BM, Lambeth JD, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys*. 2002;397(2):342-344.
87. San Jose G, Fortuno A, Beloqui O, Diez J, Zalba G. NADPH oxidase CYBA polymorphisms, oxidative stress and cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114(3):173-182.
88. Parkos CA, Dinauer MC, Jesaitis AJ, Orkin SH, Curnutte JT. Absence of both the 91kD and 22kD subunits of human neutrophil cytochrome b in two genetic forms of chronic granulomatous disease. *Blood*. 1989;73(6):1416-1420.
89. Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, Jones OT. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol*. 1996;271(4 Pt 2):H1626-34.
90. Mohazzab KM, Wolin MS. Sites of superoxide anion production detected by lucigenin in calf pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol*. 1994;267(6 Pt 1):L815-22.
91. Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol*. 1994;266(6 Pt 2):H2568-72.
92. Meier B, Cross AR, Hancock JT, Kaup FJ, Jones OT. Identification of a superoxide-generating NADPH oxidase system in human fibroblasts. *Biochem J*. 1991;275 (Pt 1)(Pt 1):241-245.
93. Touyz RM, Briones AM, Sedeek M, Burger D, Montezano AC. NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. *Mol Interv*. 2011;11(1):27-35.
94. Al Ghoulh I, Khoo NK, Knaus UG, et al. Oxidases and peroxidases in cardiovascular and lung disease: New concepts in reactive oxygen species signaling. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(7):1271-1288.
95. Ago T, Kuroda J, Kamouchi M, Sadoshima J, Kitazono T. Pathophysiological roles of NADPH oxidase/nox family proteins in the vascular system. -review and perspective-. *Circ J*. 2011;75(8):1791-1800.
96. Akki A, Zhang M, Murdoch C, Brewer A, Shah AM. NADPH oxidase signaling and cardiac myocyte function. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;47(1):15-22.
97. Zhang Y, Tocchetti CG, Krieg T, Moens AL. Oxidative and nitrosative stress in the maintenance of myocardial function. *Free Radic Biol Med*. 2012;53(8):1531-1540.
98. Murdoch CE, Zhang M, Cave AC, Shah AM. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc Res*. 2006;71(2):208-215.
99. Lyle AN, Griendling KK. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda)*. 2006;21:269-280.
100. Cakir Y, Ballinger SW. Reactive species-mediated regulation of cell signaling and the cell cycle: The role of MAPK. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(5-6):726-740.

101. Berk BC. Redox signals that regulate the vascular response to injury. *Thromb Haemost.* 1999;82(2):810-817.
102. Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(5-6):691-728.
103. Mate A, Miguel-Carrasco JL, Vazquez CM. The therapeutic prospects of using L-carnitine to manage hypertension-related organ damage. *Drug Discov Today.* 2010;15(11-12):484-492.
104. Jiang F, Zhang Y, Dusting GJ. NADPH oxidase-mediated redox signaling: Roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacol Rev.* 2011;63(1):218-242.
105. Buday A, Orsy P, Godo M, et al. Elevated systemic TGF-beta impairs aortic vasomotor function through activation of NADPH oxidase-driven superoxide production and leads to hypertension, myocardial remodeling, and increased plaque formation in apoE(-/-) mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299(2):H386-95.
106. Zhou MS, Schuman IH, Jaimes EA, Raij L. Renoprotection by statins is linked to a decrease in renal oxidative stress, TGF-beta, and fibronectin with concomitant increase in nitric oxide bioavailability. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;295(1):F53-9.
107. Dammanahalli KJ, Sun Z. Endothelins and NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008;35(1):2-6.
108. Zhang JJ, Bledsoe G, Kato K, Chao L, Chao J. Tissue kallikrein attenuates salt-induced renal fibrosis by inhibition of oxidative stress. *Kidney Int.* 2004;66(2):722-732.
109. Fortuno A, Oliván S, Beloqui O, et al. Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension. *J Hypertens.* 2004;22(11):2169-2175.
110. El Bekay R, Alvarez M, Monteseirin J, et al. Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: Involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF-kappaB. *Blood.* 2003;102(2):662-671.
111. Dusi S, Donini M, Lissandrini D, Mazzi P, Bianca VD, Rossi F. Mechanisms of expression of NADPH oxidase components in human cultured monocytes: Role of cytokines and transcriptional regulators involved. *Eur J Immunol.* 2001;31(3):929-938.
112. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994;74(6):1141-1148.
113. Ungvari Z, Csiszar A, Huang A, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A. High pressure induces superoxide production in isolated arteries via protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase. *Circulation.* 2003;108(10):1253-1258.
114. Virdis A, Neves MF, Amiri F, Viel E, Touyz RM, Schiffrin EL. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress. *Hypertension.* 2002;40(4):504-510.

115. San Jose G, Moreno MU, Olivan S, et al. Functional effect of the p22phox -930A/G polymorphism on p22phox expression and NADPH oxidase activity in hypertension. *Hypertension*. 2004;44(2):163-169.
116. Zalba G, San Jose G, Beaumont FJ, Fortuno MA, Fortuno A, Diez J. Polymorphisms and promoter overactivity of the p22(phox) gene in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 2001;88(2):217-222.
117. Yousefipour Z, Oyekan A, Newaz M. Interaction of oxidative stress, nitric oxide and peroxisome proliferator activated receptor gamma in acute renal failure. *Pharmacol Ther*. 2010;125(3):436-445.
118. Sirker A, Zhang M, Murdoch C, Shah AM. Involvement of NADPH oxidases in cardiac remodelling and heart failure. *Am J Nephrol*. 2007;27(6):649-660.
119. Seddon M, Looi YH, Shah AM. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart*. 2007;93(8):903-907.
120. Dworakowski R, Anilkumar N, Zhang M, Shah AM. Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 5):960-964.
121. Touyz RM. Intracellular mechanisms involved in vascular remodelling of resistance arteries in hypertension: Role of angiotensin II. *Exp Physiol*. 2005;90(4):449-455.
122. Nathan C. Specificity of a third kind: Reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J Clin Invest*. 2003;111(6):769-778.
123. An SJ, Boyd R, Zhu M, Chapman A, Pimentel DR, Wang HD. NADPH oxidase mediates angiotensin II-induced endothelin-1 expression in vascular adventitial fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 2007;75(4):702-709.
124. Carreno JE, Apablaza F, Ocaranza MP, Jalil JE. Cardiac hypertrophy: Molecular and cellular events. *Rev Esp Cardiol*. 2006;59(5):473-486.
125. Iglarz M, Touyz RM, Viel EC, Amiri F, Schiffrin EL. Involvement of oxidative stress in the profibrotic action of aldosterone. interaction with the renin-angiotensin system. *Am J Hypertens*. 2004;17(7):597-603.
126. Virag JI, Murry CE. Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair. *Am J Pathol*. 2003;163(6):2433-2440.
127. Yan Y, Wei CL, Zhang WR, Cheng HP, Liu J. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacol Sin*. 2006;27(7):821-826.
128. Harrison DG, Marvar PJ, Titze JM. Vascular inflammatory cells in hypertension. *Front Physiol*. 2012;3:128.
129. Palm F, Nordquist L. Renal oxidative stress, oxygenation, and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;301(5):R1229-41.

130. Daniels A, van Bilsen M, Goldschmeding R, van der Vusse GJ, van Nieuwenhoven FA. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009;195(3):321-338.
131. Brown JD, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptors as transcriptional nodal points and therapeutic targets. *Circulation*. 2007;115(4):518-533.
132. Han L, Li M, Liu Y, Han C, Ye P. Atorvastatin may delay cardiac aging by upregulating peroxisome proliferator-activated receptors in rats. *Pharmacology*. 2012;89(1-2):74-82.
133. Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM. PPARs: The vasculature, inflammation and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009;18(2):128-133.
134. Nisbet RE, Sutliff RL, Hart CM. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in pulmonary vascular disease. *PPAR Res*. 2007;2007:18797.
135. Inoue I, Goto S, Matsunaga T, et al. The ligands/activators for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and PPARgamma increase Cu²⁺,Zn²⁺-superoxide dismutase and decrease p22phox message expressions in primary endothelial cells. *Metabolism*. 2001;50(1):3-11.
136. Martin A, Perez-Giron JV, Hernanz R, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation reduces cyclooxygenase-2 expression in vascular smooth muscle cells from hypertensive rats by interfering with oxidative stress. *J Hypertens*. 2012;30(2):315-326.
137. Seymour EM, Bennink MR, Watts SW, Bolling SF. Whole grape intake impacts cardiac peroxisome proliferator-activated receptor and nuclear factor kappaB activity and cytokine expression in rats with diastolic dysfunction. *Hypertension*. 2010;55(5):1179-1185.
138. Kawai T, Masaki T, Doi S, et al. PPAR-gamma agonist attenuates renal interstitial fibrosis and inflammation through reduction of TGF-beta. *Lab Invest*. 2009;89(1):47-58.
139. Griffin J, Arif S, Mufti A. Principles of immunity. In: Horton- Szar D, ed. *Immunology and haematology*. Londres: Mosby; 2003:3-32.
140. Montecucco F, Pende A, Quercioli A, Mach F. Inflammation in the pathophysiology of essential hypertension. *J Nephrol*. 2011;24(1):23-34.
141. Heres-Alvarez F, Peix-Gonzalez A. La proteina C reactiva como blanco terapeutico en la prevencion cardiovascular: Ficcion o realidad? . 2011;11(Rev Esp Cardiol.):30.
142. Mark Richards A. Nuevos biomarcadores en la insuficiencia cardiaca: Aplicaciones en el diagnóstico, pronóstico y pautas de tratamiento. *Rev Esp Cardiol*. 2010;63(6):635-639.
143. Diez J. Apoptosis in cardiovascular diseases. *Rev Esp Cardiol*. 2000;53(2):267-274.
144. Valgimigli M, Ceconi C, Malagutti P, et al. Tumor necrosis factor-alpha receptor 1 is a major predictor of mortality and new-onset heart failure in patients with acute myocardial infarction: The cytokine-activation and long-term prognosis in myocardial infarction (C-ALPHA) study. *Circulation*. 2005;111(7):863-870.

145. Morillas P, de Andrade H, Castillo J, et al. Inflammation and apoptosis in hypertension. relevance of the extent of target organ damage. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2012;65(9):819-825.
146. Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29(7):367-374.
147. Miranda HR, Castro GP, Verdejo PH, et al. Oxidative stress and inflammation in heart failure: Mechanisms of damage and therapeutic alternatives. *Rev Med Chil*. 2007;135(8):1056-1063.
148. Savoia C, Schiffrin EL. Inflammation in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006;15(2):152-158.
149. Abrams J. C-reactive protein, inflammation, and coronary risk: An update. *Cardiol Clin*. 2003;21(3):327-331.
150. Paulus WJ. Cytokines and heart failure. *Heart Fail Monit*. 2000;1(2):50-56.
151. Doughan AK, Harrison DG, Dikalov SI. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: Linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ Res*. 2008;102(4):488-496.
152. Hall G, Hasday JD, Rogers TB. Regulating the regulator: NF-kappaB signaling in heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41(4):580-591.
153. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004;18(18):2195-2224.
154. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*. 2002;109 Suppl:S81-96.
155. Ghosh S, Standen NB, Galinanes M. Failure to precondition pathological human myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37(3):711-718.
156. Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J. Role of nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase signaling in exercise-induced antioxidant enzyme adaptation. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007;32(5):930-935.
157. Marczin N, El-Habashi N, Hoare GS, Bundy RE, Yacoub M. Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: Therapeutic potential and basic mechanisms. *Arch Biochem Biophys*. 2003;420(2):222-236.
158. Guo G, Yan-Sanders Y, Lyn-Cook BD, et al. Manganese superoxide dismutase-mediated gene expression in radiation-induced adaptive responses. *Mol Cell Biol*. 2003;23(7):2362-2378.
159. Zhou LZ, Johnson AP, Rando TA. NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(11):1405-1416.

160. Liao TD, Yang XP, Liu YH, et al. Role of inflammation in the development of renal damage and dysfunction in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*. 2008;52(2):256-263.
161. Thaik CM, Calderone A, Takahashi N, Colucci WS. Interleukin-1 beta modulates the growth and phenotype of neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest*. 1995;96(2):1093-1099.
162. Satoh J, Fujiwara F, Ishii M. TNF-alpha gene polymorphism, insulin resistance and type 2 diabetes in humans. *Nihon Rinsho*. 2005;63 Suppl 2:189-192.
163. Deswal A, Mann DL. Can valsartan reduce the occurrence of atrial fibrillation in heart failure patients? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2005;2(10):502-503.
164. Verma SK, Krishnamurthy P, Barefield D, et al. Interleukin-10 treatment attenuates pressure overload-induced hypertrophic remodeling and improves heart function via signal transducers and activators of transcription 3-dependent inhibition of nuclear factor-kappaB. *Circulation*. 2012;126(4):418-429.
165. Zeisberg M, Kalluri R. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;304(3):C216-25.
166. Borthwick LA, Wynn TA, Fisher AJ. Cytokine mediated tissue fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. 2012.
167. Heeneman S, Cleutjens JP, Faber BC, et al. The dynamic extracellular matrix: Intervention strategies during heart failure and atherosclerosis. *J Pathol*. 2003;200(4):516-525.
168. Cleutjens JP, Creemers EE. Integration of concepts: Cardiac extracellular matrix remodeling after myocardial infarction. *J Card Fail*. 2002;8(6 Suppl):S344-8.
169. Graham HK, Horn M, Trafford AW. Extracellular matrix profiles in the progression to heart failure. european young physiologists symposium keynote lecture-bratislava 2007. *Acta Physiol (Oxf)*. 2008;194(1):3-21.
170. Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5(1):15-1536-5-15.
171. Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective tissues: Matrix composition and its relevance to physical therapy. *Phys Ther*. 1999;79(3):308-319.
172. Yoon JH, Halper J. Tendon proteoglycans: Biochemistry and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2005;5(1):22-34.
173. Diez J. Mechanisms of cardiac fibrosis in hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2007;9(7):546-550.

174. Diez J, Lopez B, Gonzalez A, Ardanaz N, Fortuno MA. Genetics and molecular biology in cardiology (IV). myocardial response to biomechanical stress. *Rev Esp Cardiol*. 2001;54(4):507-515.
175. Wollert KC, Drexler H. The role of interleukin-6 in the failing heart. *Heart Fail Rev*. 2001;6(2):95-103.
176. Molkenin JD, Dorn GW, 2nd. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:391-426.
177. Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*. 1999;341(17):1276-1283.
178. Li JM, Gall NP, Grieve DJ, Chen M, Shah AM. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension*. 2002;40(4):477-484.
179. Weber KT, Sun Y, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Gerling IC. Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nat Rev Cardiol*. 2013;10(1):15-26.
180. Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest*. 2007;117(3):568-575.
181. Brown RD, Ambler SK, Mitchell MD, Long CS. The cardiac fibroblast: Therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:657-687.
182. Dhalla NS, Kaura D, Liu X, Beamish RE. Mechanisms of subcellular remodelling in post-infarct heart failure. *EXS*. 1996;76:463-477.
183. Shahbaz AU, Sun Y, Bhattacharya SK, et al. Fibrosis in hypertensive heart disease: Molecular pathways and cardioprotective strategies. *J Hypertens*. 2010;28 Suppl 1:S25-32.
184. Sun Y, Weber KT. Animal models of cardiac fibrosis. *Methods Mol Med*. 2005;117:273-290.
185. Covell JW. Factors influencing diastolic function. possible role of the extracellular matrix. *Circulation*. 1990;81(2 Suppl):III155-8.
186. Rosker C, Salvarani N, Schmutz S, Grand T, Rohr S. Abolishing myofibroblast arrhythmogenicity by pharmacological ablation of alpha-smooth muscle actin containing stress fibers. *Circ Res*. 2011;109(10):1120-1131.
187. Yue L, Xie J, Nattel S. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2011;89(4):744-753.
188. Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: Understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology*. 2006;118(1):10-24.
189. Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension*. 2002;39(2):258-263.

190. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999;79(1):215-262.
191. Baum J, Duffy HS. Fibroblasts and myofibroblasts: What are we talking about? *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011;57(4):376-379.
192. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol.* 2003;200(4):500-503.
193. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(5):349-363.
194. Barnes JL, Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: Role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int.* 2011;79(9):944-956.
195. Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res.* 2010;106(11):1675-1680.
196. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol.* 2007;127(3):526-537.
197. Tamaoki M, Imanaka-Yoshida K, Yokoyama K, et al. Tenascin-C regulates recruitment of myofibroblasts during tissue repair after myocardial injury. *Am J Pathol.* 2005;167(1):71-80.
198. Walker GA, Masters KS, Shah DN, Anseth KS, Leinwand LA. Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: Implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. *Circ Res.* 2004;95(3):253-260.
199. Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab.* 2000;71(1-2):418-435.
200. Burlew BS, Weber KT. Connective tissue and the heart. functional significance and regulatory mechanisms. *Cardiol Clin.* 2000;18(3):435-442.
201. Lucas JA, Zhang Y, Li P, et al. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling induces left ventricular dilation and dysfunction in the pressure-overloaded heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298(2):H424-32.
202. Guarino M, Tosoni A, Nebuloni M. Direct contribution of epithelium to organ fibrosis: Epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol.* 2009;40(10):1365-1376.
203. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: Therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012;18(7):1028-1040.
204. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med.* 2007;13(8):952-961.

205. Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol.* 2010;225(3):631-637.
206. Schrimpf C, Duffield JS. Mechanisms of fibrosis: The role of the pericyte. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2011;20(3):297-305.
207. Jain M, Rivera S, Monclus EA, et al. Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem.* 2013;288(2):770-777.
208. Mehta JL, Attramadal H. The TGFbeta superfamily in cardiovascular biology. *Cardiovasc Res.* 2007;74(2):181-183.
209. Bujak M, Frangogiannis NG. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc Res.* 2007;74(2):184-195.
210. Ruiz-Ortega M, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res.* 2007;74(2):196-206.
211. Pohlers D, Brenmoehl J, Loffler I, et al. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(8):746-756.
212. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 2):217-224.
213. Massague J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 2000;14(6):627-644.
214. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/smad signaling system. *EMBO J.* 2000;19(8):1745-1754.
215. Lan HY. Diverse roles of TGF-beta/smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci.* 2011;7(7):1056-1067.
216. Laviades C, Varo N, Diez J. Transforming growth factor beta in hypertensives with cardiorenal damage. *Hypertension.* 2000;36(4):517-522.
217. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993;122(1):103-111.
218. Chua CC, Chua BH, Zhao ZY, Krebs C, Diglio C, Perrin E. Effect of growth factors on collagen metabolism in cultured human heart fibroblasts. *Connect Tissue Res.* 1991;26(4):271-281.
219. Eghbali M, Tomek R, Sukhatme VP, Woods C, Bhambi B. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors. *Circ Res.* 1991;69(2):483-490.
220. Hermida N, Lopez B, Gonzalez A, et al. A synthetic peptide from transforming growth factor-beta1 type III receptor prevents myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 2009;81(3):601-609.

221. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, et al. Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation*. 2002;106(1):130-135.
222. Guo P, Nishiyama A, Rahman M, et al. Contribution of reactive oxygen species to the pathogenesis of left ventricular failure in dahl salt-sensitive hypertensive rats: Effects of angiotensin II blockade. *J Hypertens*. 2006;24(6):1097-1104.
223. Peng H, Carretero OA, Brigstock DR, Oja-Tebbe N, Rhaleb NE. Ac-SDKP reverses cardiac fibrosis in rats with renovascular hypertension. *Hypertension*. 2003;42(6):1164-1170.
224. Iwanciw D, Rehm M, Porst M, Goppelt-Struebe M. Induction of connective tissue growth factor by angiotensin II: Integration of signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(10):1782-1787.
225. Sanchez-Lopez E, Rodrigues Diez R, Rodriguez Vita J, et al. Connective tissue growth factor (CTGF): A key factor in the onset and progression of kidney damage. *Nefrologia*. 2009;29(5):382-391.
226. Perbal B. CCN proteins: Multifunctional signalling regulators. *Lancet*. 2004;363(9402):62-64.
227. Matsui Y, Sadoshima J. Rapid upregulation of CTGF in cardiac myocytes by hypertrophic stimuli: Implication for cardiac fibrosis and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;37(2):477-481.
228. Lau LF, Lam SC. The CCN family of angiogenic regulators: The integrin connection. *Exp Cell Res*. 1999;248(1):44-57.
229. Rimón E, Chen B, Shanks AL, Nelson DM, Sadovsky Y. Hypoxia in human trophoblasts stimulates the expression and secretion of connective tissue growth factor. *Endocrinology*. 2008;149(6):2952-2958.
230. Liu X, Luo F, Pan K, Wu W, Chen H. High glucose upregulates connective tissue growth factor expression in human vascular smooth muscle cells. *BMC Cell Biol*. 2007;8:1.
231. Wahab NA, Weston BS, Mason RM. Modulation of the TGFbeta/smad signaling pathway in mesangial cells by CTGF/CCN2. *Exp Cell Res*. 2005;307(2):305-314.
232. Park SK, Kim J, Seomun Y, et al. Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;284(4):966-971.
233. Peifley KA, Winkles JA. Angiotensin II and endothelin-1 increase fibroblast growth factor-2 mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;242(1):202-208.
234. Brandes RP, Takac I, Schroder K. No superoxide--no stress?: Nox4, the good NADPH oxidase! *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(6):1255-1257.

235. Miguel-Carrasco JL, Baltanas A, Cebrian C, et al. Blockade of TGF-beta 1 signalling inhibits cardiac NADPH oxidase overactivity in hypertensive rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:726940.
236. Zhao W, Chen SS, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. Kidney fibrosis in hypertensive rats: Role of oxidative stress. *Am J Nephrol*. 2008;28(4):548-554.
237. Cucoranu I, Clempus R, Dikalova A, et al. NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. *Circ Res*. 2005;97(9):900-907.
238. Grieve DJ, Byrne JA, Siva A, et al. Involvement of the nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate oxidase isoform Nox2 in cardiac contractile dysfunction occurring in response to pressure overload. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(4):817-826.
239. Stephens FB, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL. New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J Physiol*. 2007;581(Pt 2):431-444.
240. Ringseis R, Ludi S, Hirche F, Eder K. Treatment with pharmacological peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist clofibrate increases intestinal carnitine absorption in rats. *Pharmacol Res*. 2008;58(1):58-64.
241. Miguel-Carrasco JL, Monserrat MT, Mate A, Vazquez CM. Comparative effects of captopril and l-carnitine on blood pressure and antioxidant enzyme gene expression in the heart of spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol*. 2010;632(1-3):65-72.
242. Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J, Willcox MD, Garrett Q. Role of carnitine in disease. *Nutr Metab (Lond)*. 2010;7:30-7075-7-30.
243. Rebouche CJ. Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1033:30-41.
244. Marzo A, Curti S. L-carnitine moiety assay: An up-to-date reappraisal covering the commonest methods for various applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1997;702(1-2):1-20.
245. Sgambat K, Frank L, Ellini A, Sable C, Moudgil A. Carnitine supplementation improves cardiac strain rate in children on chronic hemodialysis. *Pediatr Nephrol*. 2012;27(8):1381-1387.
246. Mingrone G, Greco AV, Capristo E, et al. L-carnitine improves glucose disposal in type 2 diabetic patients. *J Am Coll Nutr*. 1999;18(1):77-82.
247. Ringseis R, Keller J, Eder K. Role of carnitine in the regulation of glucose homeostasis and insulin sensitivity: Evidence from in vivo and in vitro studies with carnitine supplementation and carnitine deficiency. *Eur J Nutr*. 2012;51(1):1-18.
248. Scaglia F, Wang Y, Singh RH, et al. Defective urinary carnitine transport in heterozygotes for primary carnitine deficiency. *Genet Med*. 1998;1(1):34-39.

249. Magoulas PL, El-Hattab AW. Systemic primary carnitine deficiency: An overview of clinical manifestations, diagnosis, and management. *Orphanet J Rare Dis.* 2012;7:68-1172-7-68.
250. Crill CM, Helms RA. The use of carnitine in pediatric nutrition. *Nutr Clin Pract.* 2007;22(2):204-213.
251. Evans AM, Fornasini G. Pharmacokinetics of L-carnitine. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(11):941-967.
252. Rasmussen J, Nielsen OW, Lund AM, Kober L, Djurhuus H. Primary carnitine deficiency and pivalic acid exposure causing encephalopathy and fatal cardiac events. *J Inherit Metab Dis.* 2013;36(1):35-41.
253. Cuturic M, Abramson RK, Moran RR, Hardin JW. Carnitine and metabolic correlates in hospitalized psychiatric patients: A follow-through report. *J Psychiatr Pract.* 2011;17(1):35-40.
254. Csiky B, Bene J, Wittmann I, Sulyok E, Melegh B. Effect of hemodialysis session on the dynamics of carnitine ester profile changes in L: -Carnitine pretreated end-stage renal disease patients. *Int Urol Nephrol.* 2012.
255. Szefel J, Kruszewski WJ, Ciesielski M, Szajewski M, Kawecki K, Jankun J, Lysiak-Szydłowska W. L-carnitine and cancer cachexia. II. effects of lipid emulsion used in total parenteral nutrition on parameters of hemostasis and inflammatory state in L-carnitine deficiency in myocytes. 2012;28(Oncol Rep):324-239.
256. Fukusako T, Negoro K, Tsuda N, Kato M, Morimatsu M. A case of secondary carnitine deficiency due to anorexia nervosa and severe liver damage. *Rinsho Shinkeigaku.* 1995;35(1):34-37.
257. Ling P, Lee DJ, Yoshida EM, Sirrs S. Carnitine deficiency presenting with encephalopathy and hyperammonemia in a patient receiving chronic enteral tube feeding: A case report. *J Med Case Rep.* 2012;6(1):227-1947-6-227.
258. Busquets S, Serpe R, Toledo M, et al. L-carnitine: An adequate supplement for a multi-targeted anti-wasting therapy in cancer. *Clin Nutr.* 2012;31(6):889-895.
259. Ramsay RR, Zammit VA. Carnitine acyltransferases and their influence on CoA pools in health and disease. *Mol Aspects Med.* 2004;25(5-6):475-493.
260. Omori Y, Ohtani T, Sakata Y, et al. L-carnitine prevents the development of ventricular fibrosis and heart failure with preserved ejection fraction in hypertensive heart disease. *J Hypertens.* 2012;30(9):1834-1844.
261. Owen L, Sunram-Lea SI. Metabolic agents that enhance ATP can improve cognitive functioning: A review of the evidence for glucose, oxygen, pyruvate, creatine, and L-carnitine. *Nutrients.* 2011;3(8):735-755.
262. Malaguarnera M, Vacante M, Motta M, et al. Acetyl-L-carnitine improves cognitive functions in severe hepatic encephalopathy: A randomized and controlled clinical trial. *Metab Brain Dis.* 2011;26(4):281-289.

263. Fahmy AF, El-Hamamsya MH, Zakib OK, Badarya OA. L-carnitine supplementation improves the behavioral symptoms in autistic children. . 2011;7(Research in Autism Spectrum Disorders):159-166.
264. Keller J, Ringseis R, Koc A, Lukas I, Kluge H, Eder K. Supplementation with l-carnitine downregulates genes of the ubiquitin proteasome system in the skeletal muscle and liver of piglets. *Animal*. 2012;6(1):70-78.
265. Pignatelli P, Tellan G, Marandola M, et al. Effect of L-carnitine on oxidative stress and platelet activation after major surgery. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2011;55(8):1022-1028.
266. O'Brien D, Chunduri P, Iyer A, Brown L. L-carnitine attenuates cardiac remodelling rather than vascular remodelling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010;106(4):296-301.
267. Zambrano S, Blanca AJ, Ruiz-Armenta MV, et al. L-carnitine protects against arterial hypertension-related cardiac fibrosis through modulation of PPAR-gamma expression. *Biochem Pharmacol*. 2013;85(7):937-944.
268. Zambrano S, Blanca AJ, Ruiz-Armenta MV, et al. The renoprotective effect of L-carnitine in hypertensive rats is mediated by modulation of oxidative stress-related gene expression. *Eur J Nutr*. 2012.
269. Miguel-Carrasco JL, Mate A, Monserrat MT, Arias JL, Aramburu O, Vazquez CM. The role of inflammatory markers in the cardioprotective effect of L-carnitine in L-NAME-induced hypertension. *Am J Hypertens*. 2008;21(11):1231-1237.
270. Vescovo G, Ravara B, Gobbo V, Dalla Libera L. Inflammation and perturbation of the l-carnitine system in heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2005;7(6):997-1002.
271. Sener G, Paskaloglu K, Satiroglu H, Alican I, Kacmaz A, Sakarcan A. L-carnitine ameliorates oxidative damage due to chronic renal failure in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;43(5):698-705.
272. Gomez-Amores L, Mate A, Revilla E, Santa-Maria C, Vazquez CM. Antioxidant activity of propionyl-L-carnitine in liver and heart of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 2006;78(17):1945-1952.
273. Gomez-Amores L, Mate A, Miguel-Carrasco JL, et al. L-carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats. *J Nutr Biochem*. 2007;18(8):533-540.
274. Rajasekar P, Palanisamy N, Anuradha CV. 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*. 2007;29(8):517-530.
275. Mate A, Miguel-Carrasco JL, Monserrat MT, Vazquez CM. Systemic antioxidant properties of L-carnitine in two different models of arterial hypertension. *J Physiol Biochem*. 2010;66(2):127-136.
276. Sitta A, Barschak AG, Deon M, et al. L-carnitine blood levels and oxidative stress in treated phenylketonuric patients. *Cell Mol Neurobiol*. 2009;29(2):211-218.

277. Mister M, Noris M, Szymczuk J, et al. Propionyl-L-carnitine prevents renal function deterioration due to ischemia/reperfusion. *Kidney Int.* 2002;61(3):1064-1078.
278. Sayed-Ahmed MM, Khattab MM, Gad MZ, Mostafa N. L-carnitine prevents the progression of atherosclerotic lesions in hypercholesterolaemic rabbits. *Pharmacol Res.* 2001;44(3):235-242.
279. Luo X, Reichetzer B, Trines J, Benson LN, Lehotay DC. L-carnitine attenuates doxorubicin-induced lipid peroxidation in rats. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9-10):1158-1165.
280. Boonsanit D, Kanchanapangka S, Buranakarl C. L-carnitine ameliorates doxorubicin-induced nephrotic syndrome in rats. *Nephrology (Carlton).* 2006;11(4):313-320.
281. Zeidan Q, Strauss M, Porras N, Anselmi G. Differential long-term subcellular responses in heart and liver to adriamycin stress. exogenous L-carnitine cardiac and hepatic protection. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2002;34(3):315-321.
282. Sayed-Ahmed MM, Shaarawy S, Shouman SA, Osman AM. Reversal of doxorubicin-induced cardiac metabolic damage by L-carnitine. *Pharmacol Res.* 1999;39(4):289-295.
283. Famularo G, De Simone C, Trinchieri V, Mosca L. Carnitines and its congeners: A metabolic pathway to the regulation of immune response and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1033:132-138.
284. Savica V, Calvani M, Benatti P, et al. Carnitine system in uremic patients: Molecular and clinical aspects. *Semin Nephrol.* 2004;24(5):464-468.
285. Miguel-Carrasco JL, Zambrano S, Blanca AJ, Mate A, Vazquez CM. Captopril reduces cardiac inflammatory markers in spontaneously hypertensive rats by inactivation of NF- κ B. *J Inflamm (Lond).* 2010;7:21-9255-7-21.
286. Chao HH, Chen CH, Liu JC, Lin JW, Wong KL, Cheng TH. L-carnitine attenuates angiotensin II-induced proliferation of cardiac fibroblasts: Role of NADPH oxidase inhibition and decreased sphingosine-1-phosphate generation. *J Nutr Biochem.* 2010;21(7):580-588.
287. Drabkin DL. The molecular weight of haemoglobin, its iron and nitrogen content and optical properties--their relevance in the problem of a reference standard for haemoglobin measurement. *Bibl Haematol.* 1965;21:33-42.
288. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967;70(1):158-169.
289. Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem.* 1975;250(14):5475-5480.
290. Arthur JR, Boyne R. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. *Life Sci.* 1985;36(16):1569-1575.

291. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
292. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem.* 1969;27(3):502-522.
293. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990;9(6):515-540.
294. Jentsch AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med.* 1996;20(2):251-256.
295. Griess P. Bemerkungen zu der abhandlung der HH. weselsky und benedikt "Ueber einige azoverbindungen". *Chem. Ber.* 1879;12:426-428.
296. Kojonazarov B, Sydykov A, Pullamsetti SS, et al. Effects of multikinase inhibitors on pressure overload-induced right ventricular remodeling. *Int J Cardiol.* 2013;167(6):2630-2637.
297. Blasi E, Heyen J, Patyna S, et al. Sunitinib, a receptor tyrosine kinase inhibitor, increases blood pressure in rats without associated changes in cardiac structure and function. *Cardiovasc Ther.* 2012;30(5):287-294.
298. Sica DA. Angiogenesis inhibitors and hypertension: An emerging issue. *J Clin Oncol.* 2006;24(9):1329-1331.
299. Aparicio-Gallego G, Afonso-Afonso FJ, Leon-Mateos L, et al. Molecular basis of hypertension side effects induced by sunitinib. *Anticancer Drugs.* 2011;22(1):1-8.
300. Cardoso AM, Martins CC, Fiorin Fda S, et al. Physical training prevents oxidative stress in L-NAME-induced hypertension rats. *Cell Biochem Funct.* 2013;31(2):136-151.
301. Rodrigo R, Prat H, Passalacqua W, Araya J, Bachler JP. Decrease in oxidative stress through supplementation of vitamins C and E is associated with a reduction in blood pressure in patients with essential hypertension. *Clin Sci (Lond).* 2008;114(10):625-634.
302. Facemire CS, Nixon AB, Griffiths R, Hurwitz H, Coffman TM. Vascular endothelial growth factor receptor 2 controls blood pressure by regulating nitric oxide synthase expression. *Hypertension.* 2009;54(3):652-658.
303. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 1999;399(6736):601-605.
304. Ferreiro CR, Chagas AC, Carvalho MH, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase is increased in patients with heart failure due to ischemic disease. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(9):1313-1320.

305. Oliveira-Paula GH, Lacchini R, Tanus-Santos JE. Inducible nitric oxide synthase as a possible target in hypertension. *Curr Drug Targets*. 2013.
306. Henderson KA, Borders RB, Ross JB, et al. Effects of tyrosine kinase inhibitors on rat isolated heart function and protein biomarkers indicative of toxicity. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2013;68(1):150-159.
307. Chintalgattu V, Ai D, Langley RR, et al. Cardiomyocyte PDGFR-beta signaling is an essential component of the mouse cardiac response to load-induced stress. *J Clin Invest*. 2010;120(2):472-484.
308. Ma LK, Li Q, He LF, et al. Imatinib attenuates myocardial fibrosis in association with inhibition of the PDGFRalpha activity. *Arq Bras Cardiol*. 2012;99(6):1082-1091.
309. Kuo WL, Yu MC, Lee JF, Tsai CN, Chen TC, Chen MF. Imatinib mesylate improves liver regeneration and attenuates liver fibrogenesis in CCL4-treated mice. *J Gastrointest Surg*. 2012;16(2):361-369.
310. Schiffrin EL. Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens*. 2001;14(6 Pt 2):83S-89S.
311. Rautureau Y, Schiffrin EL. Endothelin in hypertension: An update. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012;21(2):128-136.
312. Dammanahalli KJ, Sun Z. Endothelins and NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35(1):2-6.
313. An SJ, Boyd R, Zhu M, Chapman A, Pimentel DR, Wang HD. NADPH oxidase mediates angiotensin II-induced endothelin-1 expression in vascular adventitial fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 2007;75(4):702-709.
314. Ruef J, Moser M, Kubler W, Bode C. Induction of endothelin-1 expression by oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Pathol*. 2001;10(6):311-315.
315. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci*. 2013.
316. Guarda E, Katwa LC, Myers PR, Tyagi SC, Weber KT. Effects of endothelins on collagen turnover in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 1993;27(12):2130-2134.
317. Piacentini L, Gray M, Honbo NY, Chentoufi J, Bergman M, Karliner JS. Endothelin-1 stimulates cardiac fibroblast proliferation through activation of protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32(4):565-576.
318. Ammarguella F, Larouche I, Schiffrin EL. Myocardial fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: Effect of endothelin ET(A) receptor antagonism. *Circulation*. 2001;103(2):319-324.
319. Li JL, Wang QY, Luan HY, Kang ZC, Wang CB. Effects of L-carnitine against oxidative stress in human hepatocytes: Involvement of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biomed Sci*. 2012;19:32-0127-19-32.

320. Siktar E, Ekinçi D, Siktar E, Beydemir S, Gulcin I, Gunay M. Protective role of L-carnitine supplementation against exhaustive exercise induced oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol*. 2011;668(3):407-413.
321. Cao Y, Qu HJ, Li P, Wang CB, Wang LX, Han ZW. Single dose administration of L-carnitine improves antioxidant activities in healthy subjects. *Tohoku J Exp Med*. 2011;224(3):209-213.
322. Koc A, Ozkan T, Karabay AZ, Sunguroglu A, Aktan F. Effect of L-carnitine on the synthesis of nitric oxide in RAW 264.7 murine macrophage cell line. *Cell Biochem Funct*. 2011;29(8):679-685.
323. Mate A, Vazquez CM, Leiva A, Sobrevia L. New therapeutic approaches to treating hypertension in pregnancy. *Drug Discov Today*. 2012;17(23-24):1307-1315.
324. Calo LA, Davis PA, Pagnin E, et al. Carnitine-mediated improved response to erythropoietin involves induction of haem oxygenase-1: Studies in humans and in an animal model. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(3):890-895.
325. Laviano A, Molino A, Seelaender M, et al. Carnitine administration reduces cytokine levels, improves food intake, and ameliorates body composition in tumor-bearing rats. *Cancer Invest*. 2011;29(10):696-700.
326. Pechanova O, Simko F. Chronic antioxidant therapy fails to ameliorate hypertension: Potential mechanisms behind. *J Hypertens Suppl*. 2009;27(6):S32-6.
327. Touyz RM. Recent advances in intracellular signalling in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003;12(2):165-174.
328. Omori Y, Ohtani T, Sakata Y, et al. L-carnitine prevents the development of ventricular fibrosis and heart failure with preserved ejection fraction in hypertensive heart disease. *J Hypertens*. 2012;30(9):1834-1844.
329. Duan SZ, Ivashchenko CY, Usher MG, Mortensen RM. PPAR-gamma in the cardiovascular system. *PPAR Res*. 2008;2008:745804.
330. Lin H, Hou CC, Cheng CF, et al. Peroxisomal proliferator-activated receptor-alpha protects renal tubular cells from doxorubicin-induced apoptosis. *Mol Pharmacol*. 2007;72(5):1238-1245.
331. Chen HH, Sue YM, Chen CH, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha plays a crucial role in L-carnitine anti-apoptosis effect in renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(10):3042-3049.
332. Jing L, Zhou LJ, Li WM, et al. Carnitine regulates myocardial metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) in alcoholic cardiomyopathy. *Med Sci Monit*. 2011;17(1):BR1-9.
333. Signorelli SS, Fatuzzo P, Rapisarda F, et al. Propionyl-L-carnitine therapy: Effects on endothelin-1 and homocysteine levels in patients with peripheral arterial disease and end-stage renal disease. *Kidney Blood Press Res*. 2006;29(2):100-107.

334. Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. Relationships among ET-1, PPARgamma, oxidative stress and endothelial dysfunction in diabetic animals. *J Smooth Muscle Res.* 2008;44(2):41-55.
335. Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res.* 1999;85(5):394-402.
336. Iglarz M, Touyz RM, Amiri F, Lavoie MF, Diep QN, Schiffrin EL. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and -gamma activators on vascular remodeling in endothelin-dependent hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(1):45-51.