



**PAPEL DE LA NADPH OXIDASA EN EL
EFECTO MODULADOR DE LA L-CARNITINA
EN LA NEFROPATÍA HIPERTENSIVA**

Tesis Doctoral

ANTONIO JESÚS BLANCA LOBATO

Directores

CARMEN MARÍA VÁZQUEZ CUETO

ALFONSO MATE BARRERO

ELISA REVILLA TORRES

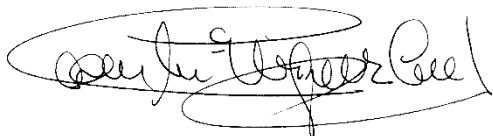
Sevilla, 2014

CARMEN MARÍA VÁZQUEZ CUETO, Catedrática del Departamento de Fisiología de la Universidad de Sevilla; ALFONSO MATE BARRERO, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Sevilla; y ELISA REVILLA TORRES Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Sevilla,

INFORMAN

Que la Tesis titulada **PAPEL DE LA NADPH OXIDASA EN EL EFECTO MODULADOR DE LA L-CARNITINA EN LA NEFROPATÍA HIPERTENSIVA**, presentada por el Ldo. ANTONIO JESÚS BLANCA LOBATO 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.

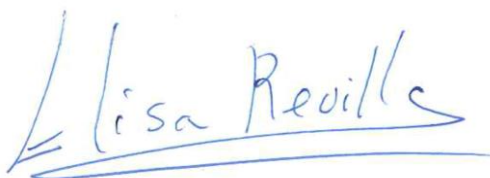
Y para que así conste, firman la presente en Sevilla, a 10 de Noviembre de 2014



Fdo.: Dra. Carmen M^a Vázquez Cueto



Fdo.: Dr. Alfonso Mate Barrero



Fdo.: Dra. Elisa Revilla Torres

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.

Durante su realización el autor ha disfrutado de contratos de apoyo de personal de investigación subvencionados por Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo (Instituto de Salud Carlos III) (FIS PS09/01395), y por la Junta de Andalucía (PI-0060/2012).

A MIS QUERIDOS PADRES

A MI HERMANA

Complicado es escribir una tesis doctoral, no menos, intentar agradecer de la forma más cariñosa a todas aquellas personas que han tomado parte durante este tiempo en ayudar, guiar, animar y levantar dicha tesis.

En primer lugar, agradecer a mi directora de tesis, Carmen, por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral, y no solo por ello, sino por los momentos de risas que hemos echado en congresos, en la hora de las comidas, en aquellas salidas con nuestros compañeros chilenos, en poder formarme como investigador. Seguramente lo que más me llevo conmigo es esa capacidad que tienes para convencer a los demás y despertar la curiosidad a la hora de realizar una investigación.

Agradecer a mi director de tesis Alfonso, su pulcritud y perfección a la hora de realizar y dirigir cualquier aspecto relacionado con mi tesis doctoral. Y por el tono desenfadado y cercano que siempre has tenido conmigo, y con mis compis de laboratorio. Me llevo conmigo el nombre de "Antoine" con el cual me identificas.

Por otro lado, dedicarle unas líneas a mi paisana, y directora Elisa Revilla, con la cual aparte de discutir bastantes aspectos de la tesis que me han ayudado muchísimo, me llevo en el recuerdo los momentos de risas, sus sugerencias del tipo "empieza ya a escribir" antes de empezar la tesis casi de empezar los experimentos (tono jocoso).

Pero sin duda, mis pilares principales han sido mis padres Antonio Y María Elena, los cuales siempre han sido desde que empecé mi educación, mis principales pilares, para que no callera en desánimo, para que me superara día a día. Atrás quedaron esos cuadernillos rubio, esas tablas de multiplicar, esos viajes con mi padre a la biblioteca de Morón, esas palabras de mi madre que decían: "poco a poco se entiende mejor tu letra", esos trabajitos de manualidades con los cuales me entretenía con mi padre para Biología y Geología, esos libros de la evolución del hombre que me metieron desde pequeño el pellizco de la ciencia y esas palabras más cercanas de mi madre en esta época última de tesis doctoral, ánimo y para adelante que te queda poco. Os quiero.

Y por supuesto mi hermana, motivo de ánimo continuo, de espejo en mi formación, educadora de calidad. Por escucharme siempre que tengo un problema y por presumir de hermano siempre que puede (aunque parezca que me coraje, sabes que me hace sentir muy bien). Te quiero.

También quiero acercarme de mis abuelos Manuel, Ángeles-Brígida, Francisco y Concha, que aunque no han podido disfrutar conmigo esta época seguro que lo ha hecho desde la presencia del santísimo, allí en el cielo.

Agradecer a mis tías y tíos Francisca, Rosario, y Antonio por partida doble (uno mirando desde el cielo), su preocupación y ánimo por la realización de la tesis. Y acordarme también de todos mis primos, que siempre han estado interesándose.

Por otro lado, como no acordarme de mis dos niñas Mariví y Sonia. De ti Mariví me llevo una amiga, una compañera, un punto de apoyo y una excelente persona trabajadora, ordenada y divertida. Quedarán en el recuerdo aquellas 3 semanas trabajando a tope y por las noches de fiesta con nuestros queridos chilenos, nuestros días de máster, nuestras últimas investigaciones trabajando en grupo, los congresos y en especial la sonrisa que siempre nos has mostrado a todos cada mañana al llegar. De la “pequeña” Sonia que decir, estudiamos juntos Bioquímica, empezamos juntos como alumnos internos, hemos tenido amigos comunes y fiestas. Espero que tu nueva andadura como “sueca” te vaya genial, aunque se de sobra que tú puedes con eso y con muchísimo más.

Unas palabras quiero también plasmar hacia una persona de la cual he aprendido muchísimo, como amigo, persona e investigador. Mi gran amigo José Luis, el cual me ha apoyado cada minuto de esta tesis, me ha solucionado dudas, me hace amena cada mañana con nuestros cafés y conversaciones. Sin duda eres un espejo para aprender de ti en muchísimos aspectos. Señor doctor, seguro que pronto llega lo que te mereces.

Agradecer también a mi amigo y compañero Karick Jotty, su amistad, nuestros buenos momentos y todo su apoyo brindado en esta tesis doctoral, seguro que seguirás triunfando como ya lo haces. A mi querida señora Dra. Lola y mi “hippie” preferida Elo, a las cuales quiero mucho y con las cuales comparto gran cantidad de risas sobre todo en nuestras horas de coger fuerzas en el almuerzo. También acordarme de su compañero Jose Manuel, que llegará a ser un gran doctor. Y como no, a mi vecino de laboratorio, Rui Rua, que le daba a las mañanas su toque futbolístico.

También mencionar a mis “viejillas”, Dra. Mercedes Cano y Dra. María Luisa Calonge por sus risas y bromas. Agradecer a las doctoras Olimpia Carreras, María Luisa Ojeda, Fátima Nogales, Ana Ilundáin, María José Peral y Livia Carrascal, y Consuelo Santa María su aprecio y su disposición a ofrecer su ayuda siempre que la he necesitado. Igualmente, dar las gracias a los doctores Pedro Núñez, Pablo García y Dani Praena por su simpatía y ayuda en todo momento. Y a mi querido Paco Frieria, el cual me ha transmitido mucha compañía y cariño.

Dar las gracias a todos mis amigos y amigas: Gildo, Edu, Santi, Dani, Marcos, Jose María, Vicky, Amalia, Pili, Mila, Juan Carlos; y a otras personas más recientes en mi vida

como Mati, Manolo, Rebeca, Rocío, Rosalía, Ame, Mónica, Desi, Miguel, Alberto que siempre me han mostrado su apoyo y admiración como nuevos amigos y amigas que son. De todos ellos, poner especial énfasis en mis 5 chavalotes, Gildo, Santi, Dani, Marcos y José María, por haber pasado tantos momentos juntos y los que seguiremos pasando, siendo parte esencial de mi vida.

Dar las gracias al grupo de investigación de Guillermo Zalba y Ana Fortuño, por darme la oportunidad de poder realizar y desarrollar parte de mi trabajo en su laboratorio, y recordar a Ana Montoya e Idoia en especial, con las cuales pase 3 meses muy divertidos, también mencionar la ayuda que, desinteresadamente, me prestaron Gorka, Maria Ujué, Ana Baltanás y Alvaro durante mi estancia.

Por último, agradecer al grupo de investigación de Luis Sobrevía su ayuda en la puesta a punto de la técnica de silenciamiento génico, así como sus estancias en nuestros laboratorios donde hemos pasado muy buenos ratos. Acordarme de Rocio Salsoso, compañera que emigro hacia Chile para realizar su tesis doctoral, y a los componentes del grupo de Luis Sobrevía: Andrea, Fabian, Pablo, Carlos Salomón, Enrique y Cata.

Y a todas aquellas personas que me hayan prestado su ayuda y que sin duda habré olvidado mencionar, muchas gracias.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	vii
LISTADO DE REACTIVOS Y ANTICUERPOS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE TABLAS	xix
INTRODUCCIÓN	
1. NEFROPATÍA HIPERTENSIVA	3
1.1. ESTRÉS OXIDATIVO	4
1.1.1. Concepto de estrés oxidativo. especies reactivas de oxígeno (ERO)	4
1.1.1.1. <i>Funciones biológicas de las especies reactivas de oxígeno</i>	5
1.1.1.2. <i>Fuentes enzimáticas productoras de las especies reactivas de oxígeno</i>	6
1.1.2. Estrés oxidativo: consecuencias patológicas renales	8
1.2. NADPH OXIDASA	9
1.2.1. Aspectos generales	9
1.2.2. Estructura y funcionamiento de la NADPH oxidasa	10
1.2.2.1. <i>NADPH oxidasa fagocítica: gp91phox</i>	10
1.2.2.2. <i>NADPH oxidasa no fagocítica</i>	13
1.2.2.3. <i>Diferencias entre la NADPH oxidasa fagocítica y no fagocítica</i>	18
1.2.3. Vías de señalización implicadas en la activación de la NADPH oxidasa	19
1.2.3.1. <i>Papel de la vía de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) en la activación de la NADPH oxidasa</i>	19
1.2.3.2. <i>Papel de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) en la activación de la NADPH oxidasa</i>	20
1.2.3.3. <i>Papel de la proteína quinasa C (PKC) en la activación de la NADPH oxidasa</i>	21
1.2.3.4. <i>Papel del factor nuclear kappa b (NF-κB) en la activación de la NADPH oxidasa</i>	23
1.2.3.5. <i>Activación de la NADPH oxidasa mediada por angiotensina II (Ang II)</i>	24
1.3. FIBROSIS	27
1.3.1. Aspectos generales. Eventos celulares en la fibrogénesis	27
1.3.2. Factor de crecimiento transformante β (TGFβ)	28
1.3.2.1. <i>Proceso de activación de la vía del TGFβ</i>	28
1.3.2.2. <i>Papel de la NADPH oxidasa en los efectos profibróticos mediados por TGFβ</i>	29

1.3.3. <i>Matriz extracelular: Metaloproteinasas y proteínas Timp</i>	30
2. L-CARNITINA.....	31
2.1. <i>ASPECTOS GENERALES</i>	31
2.2. <i>DEFICIENCIAS</i>	33
2.3. <i>PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTIFIBRÓTICAS</i>	33
2.3.1. <i>Propiedades antioxidantes</i>	33
2.3.2. <i>Propiedades antifibróticas</i>	34
2.4. <i>APLICACIONES TERAPÉUTICAS</i>	35
2.5. <i>MECANISMO DE ACCIÓN</i>	36
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
1. HIPÓTESIS.....	39
2. OBJETIVOS.....	39
2.2. <i>OBJETIVO GENERAL</i>	39
2.2. <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	39
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VITRO</i>	43
1.1. <i>ASPECTOS GENERALES DE LOS CULTIVOS CELULARES</i>	43
1.2. <i>LÍNEA CELULAR NRK-52E</i>	43
1.2.1 <i>Cultivo y mantenimiento</i>	44
1.2.1.1 <i>Medios de cultivo</i>	44
1.2.1.2 <i>Descongelación</i>	45
1.2.1.3 <i>Mantenimiento</i>	45
1.2.1.4 <i>Tripsinización</i>	45
1.2.1.5 <i>Congelación</i>	46
1.2.2 <i>Incubación con Ang II/TGFβ y LC: experimento prototipo</i>	46
1.2.3 <i>Procesamiento de las muestras</i>	47
1.2.3.1 <i>Análisis en medio de cultivo</i>	47
1.2.3.2 <i>Obtención de ARN y proteínas</i>	47
2. MODELO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i>	48
2.1 <i>ANIMALES Y TRATAMIENTOS</i>	48
2.2 <i>PROCESADO DE LAS MUESTRAS</i>	49
3. TÉCNICAS MOLECULARES.....	49
3.1 <i>CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS</i>	49

3.2 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO.....	50
3.2.1 <i>Caracterización de las fuentes celulares de anión superóxido.....</i>	50
3.2.2 <i>Caracterización de las vías de señalización intracelulares involucradas en la formación de anión superóxido.....</i>	51
3.2.3 <i>Caracterización de las isoformas de la NADPH oxidada involucradas en la formación de O₂⁻.....</i>	51
3.3 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD.....	51
3.3.1 <i>Reactivos.....</i>	52
3.3.2 <i>Protocolo experimental.....</i>	53
3.4 DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	52
3.4.1 <i>Reactivos.....</i>	52
3.4.2 <i>Protocolo experimental.....</i>	53
3.5 CUANTIFICACIÓN DEL ARNm.....	53
3.5.1 <i>Extracción de ARN.....</i>	53
3.5.2 <i>Determinación de la concentración e integridad del ARN.....</i>	54
3.5.3 <i>Retrotranscripción.....</i>	55
3.5.4 <i>PCR a tiempo real.....</i>	55
3.6 WESTERN BLOTTING.....	57
3.6.1 <i>Preparación de las muestras.....</i>	57
3.6.2 <i>Electroforesis.....</i>	57
3.6.3 <i>Transferencia.....</i>	58
3.6.4 <i>Inmunodetección.....</i>	59
3.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC).....	61
3.7.1 <i>Materiales y reactivos.....</i>	61
3.7.2 <i>Preparación de las muestras.....</i>	61
3.7.3 <i>Protocolo experimental.....</i>	62
3.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DEL SISTEMA NF-κB.....	63
3.8.1 <i>Estudio de la translocación de la subunidad p65 del complejo NF-κB.....</i>	63
3.8.2 <i>Estudio del grado de fosforilación de la proteína α-IκB.....</i>	65
3.9 TRANSFECCIÓN CON LÍPIDOS CATIÓNICOS PARA EL SILENCIAMIENTO DE GENES.....	65
3.9.1 <i>Reactivos.....</i>	66
3.9.2 <i>Protocolo experimental.....</i>	66
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	67

RESULTADOS

1. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR ANGIOTENSINA II: ESTUDIO DE LA NADPH OXIDASA.....	71
1.1. EFECTO DE LA ANGIOTENSINA II SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO.....	71
1.1.1. Ensayo concentración-respuesta para angiotensina II	71
1.1.2. Ensayo tiempo-respuesta para angiotensina II.....	72
1.2. CARACTERIZACIÓN DE LA FUENTE DE PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO EN RESPUESTA A LA ANGIOTENSINA II	72
1.3. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE LA LÍNEA NRK-52E.....	74
1.4. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA.....	74
1.4.1. Ensayo concentración-respuesta para la L-carnitina	74
1.4.2. Efecto de la L-carnitina sobre la actividad nadph oxidasa estimulada por angiotensina II.....	75
1.5. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II.....	76
1.6. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LOS NIVELES DE NITROSILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN CÉLULAS TRATADAS CON ANGIOTENSINA II.....	77
1.7. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS ISOFORMAS NOX1, NOX2 Y NOX4 DE LA NADPH OXIDASA EN CÉLULAS ESTIMULADAS CON ANGIOTENSINA II.....	78
1.8. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE LAS ISOFORMAS NOX1, NOX2 Y NOX4 DE LA NADPH OXIDASA EN CÉLULAS ESTIMULADAS CON ANGIOTENSINA II.....	80
1.9. CARACTERIZACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE LA NADPH OXIDASA INVOLUCRADAS EN LA FORMACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO Y H ₂ O ₂	82
2. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR INVOLUCRADAS EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA POR L-CARNITINA.....	93
2.1. EFECTO DE LA WORTMANINA, SB203580, PD98059 Y BIS I SOBRE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA.....	93

2.1.1. Efecto de la wortmanina, SB203580, PD98059 y BIS I sobre la actividad NADPH oxidasa inducida por angiotensina II.....	93
2.1.2. Efecto de la wortmanina, SB203580, PD98059 Y BIS I sobre la actividad NADPH oxidasa en células tratadas con angiotensina II y L-carnitina	94
2.2. EFECTO DE LA ANGIOTENSINA II Y LA L-CARNITINA SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS AKT, p38 MAPK Y ERK _{1/2}	96
2.2.1. Cinética de la fosforilación de la proteína Akt inducida por angiotensina II	96
2.2.2. Efecto de la L-carnitina sobre la fosforilación de la proteína Akt en células estimuladas con angiotensina II.....	97
2.2.3. Cinética de la fosforilación de la proteína p38 MAPK inducida por angiotensina II	99
2.2.4. Efecto de la L-carnitina sobre la fosforilación de la proteína p38 MAPK en células tratadas con angiotensina II.....	100
2.2.5. Cinética de la fosforilación de la proteína ERK _{1/2} inducida por angiotensina II	101
2.2.6. Efecto de la L-carnitina sobre la fosforilación de la proteína ERK _{1/2} en células tratadas con angiotensina II.....	102
2.3. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC) EN CÉLULAS ESTIMULADAS CON ANGIOTENSINA II.....	103
2.4. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA TRANSLOCACIÓN DEL NF-KB HACIA EL NÚCLEO.....	104
2.4.1. Cinética de la translocación del complejo NF-kB inducida por angiotensina II	104
2.4.2. Efecto de la L-carnitina sobre la translocación del complejo NF-KB hacia el núcleo en células tratadas con angiotensina II	104
2.4.3. Efecto de la L-carnitina en la fosforilación de α -I κ B inducida por angiotensina II..	106
 3. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LOS MECANISMOS FIBRÓTICOS INDUCIDOS POR TGF β . ESTUDIO DE LA NADPH OXIDASA, PROTEÍNAS SMAD Y METALOPROTEINASAS.	107
3.1. EFECTO DEL TGF β SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO. CARACTERIZACIÓN DE LA FUENTE DE O ₂ ⁻ EN RESPUESTA A TGF β	107
3.2. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA EN CÉLULAS ESTIMULADAS CON TGF β	108
3.2.1. Ensayo concentración-respuesta para la L-carnitina	108

3.2.2. Efecto de la L-carnitina sobre la actividad NADPH oxidasa estimulada por TGF β	109
3.3. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS ISOFORMAS NOX1, NOX2 Y NOX4 DE LA NADPH OXIDASA	110
3.4. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CTGF (MARCADOR DE FIBROSIS) INDUCIDA POR TGF β	113
3.5. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA SMAD2 INDUCIDA POR TGF β	114
3.6. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE EL SISTEMA DE DEGRADACIÓN DE COLÁGENO	115
3.6.1. Estudios <i>in vivo</i>	115
3.6.1.1. Efecto de la L-carnitina en la expresión génica de MMP-9 en corteza renal de ratas hipertensas	115
3.6.1.2. Efecto de la L-carnitina en la expresión génica de TIMP-1 en corteza renal de ratas hipertensas	116
3.6.1.3. Efecto de la L-carnitina en el ratio MMP-9/TIMP-1 en corteza renal de ratas hipertensas	117
3.6.2. Estudios <i>in vitro</i>	118
3.6.2.1. Efecto de la L-carnitina en la expresión génica de MMP9 en células NRK-52E	118
3.6.2.2. Efecto de la L-carnitina en la expresión génica de TIMP-1 en células NRK-52E	119
3.6.2.3. Efecto de la L-carnitina en el ratio MMP-9/TIMP-1 en células NRK-52E	120
DISCUSIÓN	
1. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO GENERADO POR ANGIOTENSINA II A TRAVÉS DE LA NADPH OXIDASA: RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS	123
1.1 EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO GENERADO POR ANGIOTENSINA II A TRAVÉS DE LA NADPH OXIDASA	123
1.2 RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO GENERADO POR ANGIOTENSINA II A TRAVÉS DE LA NADPH OXIDASA	129
2. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE EL ESTADO FIBRÓTICO INDUCIDO POR TGF β 131	
CONCLUSIONES	135
BIBLIOGRAFÍA	139

ABREVIATURAS

(e)NOS: (endotelial) óxido nítrico sintasa	ET-1: Endotelina 1
AA: ácido araquidónico	FAD: flavín adenín dinucleótido
Acetil CoA: acetil coenzima A	GADPH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
ADN: ácido desoxirribonucleico	GDP: guanosín difosfato
ARN: ácido ribonucleico	GEF: factor de intercambio de nucleótidos de guanina
AT1: receptor tipo I de la angiotensina II	GPx: Glutación peroxidasa
ATP: adenosín trifosfato	GR: Glutación reductasa
BH₄: tetrahidrobiopterina	GTP: guanosín trifosfato
BIS I: bisindolilmaleimida I	HNE: 4-hidroxi-2-nonenal
CAT: catalasa	HTA: hipertensión arterial
CoA: coenzima A	HUVEC: células endoteliales de vena umbilical humana
cPLA2: fosfolipasa A2 citosólica	IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo I
CTGF: factor de crecimiento de tejido conjuntivo	IκB: inhibidor de kappa B
DAG: diacilglicerol	LC: L-carnitina
DMSO: dimetilsulfóxido	L-NAME: N ω-nitro-L-arginina metil éster hidrocioruro
DPI: difenil-eno-iodonio	MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos
DTT: ditioneitol	MMP: metaloproteinasas de la matriz extracelular
DUOX: oxidasa dual	MOPS: ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	
EGTA: ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetil)-tetraacético	
ERK: quinasa activada por señales extracelulares	
ERO: especies reactivas de oxígeno	

MPO: mieloperoxidasa	RASMC: células de músculo liso de aorta de rata
NADPH: nicotinamín adenín dinucleótido fosfato	ROT: rotenona
NF-κB: factor de activación nuclear kappa B	SDS: dodecilsulfato sódico
NO: óxido nítrico	SFB: suero fetal bovino
NOX: NADPH oxidasa	SHR: <i>spontaneously hypertensive rats</i> (ratas genéticamente hipertensas)
NOXA1: <i>nox activator 1</i>	siRNA: ARN de interferencia
NOXO1: <i>nox organizer 1</i>	Smad: small mothers against decapentaplegic
Nrf2: factor relacionado al factor nuclear eritroidal 2	SOD: superóxido dismutasa
OCTN: <i>organic cation transporters novel</i>	SRA: sistema renina-angiotensina
OXI: oxipurinol	Src: tirosina quinasa Src
PAK: quinasa activada por p21	TGFβ: factor de crecimiento transformante β
PCR: reacción en cadena de la polimerasa	TIMP: inhibidor tisular endógeno de metaloproteinasas
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas	TNFα: factor de necrosis tumoral α
PI3K: fosfoinositol 3-fosfato quinasa	TβRI/ALK5: receptor de TGF β tipo I
PI3P: fosfatidilinositol 3-fosfato	TβRII: receptor de TGF β tipo II
PKC: proteína quinasa C	URL: unidades relativas de luz
PLC: fosfolipasa C	VSMC: células de músculo liso vascular
PLD: fosfolipasa D	XDH: xantina deshidrogenasa
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo	XO: xantina oxidasa
PPAR: receptor activador de la proliferación de peroxisomas	α-SMA: α -actina de músculo liso

LISTADO DE REACTIVOS Y ANTICUERPOS

- 2-acetilfenotiazina (*Sigma-Aldrich, España*) Art. 175226
- Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico (MOPS) (*USB, Alemania*).....
..... Art. 19256
- Ácido acético (*Panreac, España*)..... Art. 11008.1102
- Ácido clorhídrico (HCL) (*Panreac, España*)..... Art. 141020
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (*Sigma-Aldrich, España*).....
..... Art. E1644
- Ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetil)-tetraacético (EGTA) (*Sigma-Aldrich, España*).....
..... Art. E4378
- Acrilamida/Bisacrilamida al 30% (*Bio-Rad Laboratories*)..... Art. 67784
- Agarosa estándar baja EEO (*Ecogen, España*)..... Art. AG0120
- Agua-DEPC (*Invitrogen, España*)..... Art. AM9906
- *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection reagent* (*GE Healthcare Life Science, España*) Art. RPN2232
- Amonio persulfato (APS) (*Sigma-Aldrich, España*)..... Art. A3678
- *Amplex red hydrogen/peroxidase assay kit* (*Invitrogen, España*)
..... Art A22188
- Angiotensina II (*Sigma-Aldrich, España*)..... Art. A9525
- Anticuerpo anti-Akt (*Cell signaling, USA*) Art. 9272
- Anticuerpo anti-ERK_{1/2} (*Santa Cruz Biotechnology, España*).....
..... Art. sc-135900
- Anticuerpo anti-mouse IgG-HRP (*Santa Cruz Biotechnology, España*)
..... Art. sc-2031
- Anticuerpo anti-nitrotrosina (*Millipore, Alemania*)..... Art. 05-233
- Anticuerpo anti-NOX1 (*Santa Cruz Biotechnology, España*) Art. sc-25545

- Anticuerpo anti-NOX2 (*Epitomics, USA*)Art. 5653-1
- Anticuerpo anti-NOX4 (*Santa Cruz Biotechnology, España*) Art. sc-30141
- Anticuerpo anti-p38 MAPK (*Cell signaling, USA*) Art. 9212
- Anticuerpo anti-p65 NF-kB (*Santa Cruz Biotechnology, España*).....
..... Art. sc-372
- Anticuerpo anti-p-Akt (*Cell signaling , USA*) Art. 92715
- Anticuerpo anti-p-p38 MAPK (*Cell signaling, USA*) Art. 92115
- Anticuerpo anti-p-Smad2 (*Santa Cruz Biotechnology, España*)
..... Art. sc-101801
- Anticuerpo anti-rabbit IgG-HRP (*Santa Cruz Biotechnology, España*)
..... Art. sc-2030
- Anticuerpo anti- α -I κ B (*Santa Cruz Biotechnology, España*) Art. sc-8404
- Anticuerpo anti- β -actina (*Sigma-Aldrich, España*) Art. A5441
- Anticuerpo p-ERK_{1/2} (*Santa Cruz Biotechnology, España*) Art. sc-81492
- Aprotinina (*Sigma-Aldrich, España*) Art. A-1153
- Azul de bromofenol (*Sigma-Aldrich, España*) Art. B-8026
- Benzamidina (*Sigma-Aldrich, España*) Art. B6506
- **Bio-Rad Protein Assay (Reactivo de Bradford)** (*Bio-Rad Laboratories, USA*)
..... Art. 500-0006
- Bisindolilmaleimida I (BIS I) (*Sigma-Aldrich, España*) Art. B6292
- **Blotting-Grade Blocker** (*Bio-Rad Laboratories*) Art. 170-6404
- Cloroformo (*Sigma-Aldrich, España*) Art. C-2432
- Cloruro cálcico (CaCl₂) (*Sigma-Aldrich, España*) Art. C3881
- Cloruro magnésico (MgCl₂) (*Sigma-Aldrich, España*) Art. MM1058335000
- Cloruro potásico (KCl) (*Sigma-Aldrich, España*) Art. P4504
- Cloruro sódico (NaCl) (*Panreac, España*) Art. 211939

- Cóctel inhibidor de fosfatasas (*Sigma-Aldrich, España*)Art. P0044
- Cóctel inhibidor de proteasas (*Roche, USA*) Art. 11697498001
- Deoxicolato sódico (*Sigma-Aldrich, España*)..... Art. D6750
- difenil-eno-iodonio (DPI) (*Sigma-Aldrich, España*)..... Art. D2926
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma-Aldrich, España*) Art. 276855
- Ditiotreitól (*Sigma-Aldrich, España*)..... Art. D-0632
- Dodecilsulfato sódico (SDS) (*Sigma-Aldrich, España*)..... Art. 3771
- *Dulbecco,s Modified Eagle,s Medium (DMEM) 1X (Invitrogen, España)*
.....Art. 12491-015
- *Dulbecco,s phosphate buffered saline (DPBS) 1X (Invitrogen, España)*.....
.....Art. 14190-250
- Etanol absoluto (*Panreac, España*)Art. 141086.1214
- *FastStart SYBR Green Master (Roche, Alemania)*Art. 7504673514001
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (*Sigma-Aldrich, España*).....Art. P7626
- Fluoruro de sodio (*Sigma-Aldrich, España*)..... Art. 201154
- Formaldehído (*Panreac, España*).....Art. 131328.1211
- Fosfato potásico monobásico (KH_2PO_4) (*Panreac, España*) Art. 141509
- γ -globulina bovina (*Bio-Rad Laboratories, USA*).....Art. 500-0005
- Glicerol (*Sigma-Aldrich, España*).....Art. G-5516
- Glicina (*Sigma-Aldrich, España*)..... Art. G-8898
- gp91 ds-tat (*Anaspec, USA*) Art. 63818
- HEPES (*Sigma-Aldrich, España*)..... Art. H3375
- Isopropanol (*Sigma-Aldrich, España*)Art. I-9516
- *Kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems, España)*
..... Art. 4322171
- L-carnitina (*Roig Farma*)Art. 32183-25
- Leupeptina (*Sigma-Aldrich, España*)..... Art. L2884

- <i>Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen, España)</i>	Art.11668019
- <i>Lucigenina (Sigma-Aldrich, España)</i>	Art. M-8010
- <i>Marcador de pesos moleculares (Bio-Rad Laboratories, USA)</i>	Art.161-073
- <i>Membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories)</i>	Art. 162-0115
- <i>Metanol (Panreac, España)</i>	Art. 131091.1214
- <i>N ω-nitro-L-arginina metil éster hidrocloreuro (L-NAME) (Sigma-Aldrich, España)</i>	Art. N5751
- <i>Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich, España)</i>	Art. NP40S
- <i>Opti-MEM I Reduced Serum Medium (1X) (Invitrogen, España)</i>	Art. 31985062
- <i>Ortovanadato de sodio (Sigma-Aldrich, España)</i>	Art. S6508
- <i>Oxipurinol (Sigma-Aldrich, España)</i>	Art. O6861
- <i>PD98059 (Sigma-Aldrich, España)</i>	Art. P215
- <i>Penicilina/estreptomicina 100X (Invitrogen, España)</i>	Art. 15070-063
- <i>PKC kinase activity kit (Enzo Life Sciences, USA)</i>	Art. ADI-EKS-420A
- <i>Ponceau S (Sigma-Aldrich, España)</i>	Art. P3504
- <i>Red-Safe nucleic acid staining solution (Intron Biotechnology, Corea)</i>	Art. 21141
- <i>Rotenona (Sigma-Aldrich, España)</i>	Art. R8875
- <i>Sacarosa (Merck, Alemania)</i>	Art. 107654
- <i>SB203580 (Sigma-Aldrich, España)</i>	Art. S8307
- <i>Silencer Selected Negative Control siRNA (Applied Biosystems, España)</i>	Art. 4390844
- <i>Silencer Selected pre-designed siRNA for NOX2 (Applied Biosystems, España)</i>	Art. 4390771

- <i>Silencer Selected pre-designed siRNA for NOX4 (Applied Biosystems, España)</i>	
.....	Art. 4390771
- Suero fetal bovino (SFB) (<i>Invitrogen, España</i>).....	Art. 244-0096
- Superóxido dismutasa (SOD) (<i>Sigma-Aldrich, España</i>).....	Art. S5751
- Tampón de muestra, <i>Laemmli 2x concentrate (Sigma-Aldrich, España)</i>	
.....	Art. S-3401
- TEMED (<i>Bio-Rad Laboratories, USA</i>).....	Art. 161-0800
- TGF β (<i>R&D Biosystems, USA</i>).....	Art. 240-B-002
- Tripsina-EDTA (1X) (<i>Invitrogen, España</i>).....	Art. 25300054
- Tris-hidroximetil-animometano (Trizma®, Tris) (<i>Sigma-Aldrich, España</i>).....	
.....	Art. T-1358
- TRizol® (<i>Invitrogen, España</i>).....	Art. 15596018
- Tween-20 (<i>Sigma-Aldrich, España</i>).....	Art. P1379
- Wortmanina (<i>Sigma-Aldrich, España</i>).....	Art. W1628
- β -glicerolfosfato (<i>Sigma-Aldrich, España</i>).....	Art. G5422
- β -mercaptoetanol (<i>Bio-Rad Laboratories</i>).....	Art. 161-0710
- β -Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) (<i>Sigma-Aldrich, España</i>).....	
.....	Art. N-6505

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo de las especies reactivas de oxígeno (ERO).....	5
Figura 2. Reacciones catalizadas por la xantina oxidasa.....	6
Figura 3. Estructura de la NADPH oxidasa fagocítica: gp91phox.....	11
Figura 4. gp91phox.....	12
Figura 5. NOX1.....	14
Figura 6. NOX3.....	15
Figura 7. NOX4.....	16
Figura 8. NOX5.....	17
Figura 9. DUOX1/2.....	18
Figura 10. Mecanismo de activación de la NADPH oxidasa mediado por PI3K.....	20
Figura 11. Mecanismo de activación de la NADPH oxidasa mediado por p38 MAPK y ERK _{1/2}	21
Figura 12. Mecanismo de activación de la NADPH oxidasa mediado por PKC.....	22
Figura 13. Mecanismo de activación de la NADPH oxidasa mediado por NF-κB.....	24
Figura 14. Mecanismo de activación de la NADPH oxidasa mediado por Ang II.....	26
Figura 15. Activación de la vía del TGFβ dependiente de Smad.....	29
Figura 16. Estructura química de la L-carnitina.....	32
Figura 17. Línea celular NRK-52E.....	44
Figura 18. Inducción de la producción de anión superóxido (O ₂ ⁻) por angiotensina II (Ang II): ensayo concentración-respuesta.....	71
Figura 19. Inducción de la producción de anión superóxido (O ₂ ⁻) por angiotensina II (Ang II): ensayo tiempo-respuesta.....	72
Figura 20. Caracterización de la fuente de anión superóxido (O ₂ ⁻) en células NRK-52E tratadas con angiotensina II (Ang II) durante 24 horas.....	73

Figura 21. Ensayo concentración-viabilidad celular para L-carnitina (LC)	74
Figura 22. Concentración-respuesta para L-carnitina (LC) en células NRK-52E tratadas con Ang II	75
Figura 23. Efecto de la para L-carnitina (LC) sobre la actividad NADPH oxidasa tras la estimulación con angiotensina (Ang II)	76
Figura 24. Efecto de la L-carnitina (LC) y angiotensina II (Ang II) en la producción de H ₂ O ₂	77
Figura 25. Efecto de la L-carnitina (LC) y angiotensina II (Ang II) en los niveles de nitrosilación de las proteínas.....	78
Figura 26. Efecto de la L-carnitina (LC) sobre la expresión génica de las isoformas NOX1 (A), NOX2 (B) y NOX4 (C) de la NADPH oxidasa en células tratadas con angiotensina II (Ang II)	80
Figura 27. Efecto de la L-carnitina (LC) sobre la expresión proteica de las isoformas NOX1 (A), NOX2 (B) y NOX4 (C) de la NADPH oxidasa en células estimuladas con angiotensina II (Ang II)	82
Figura 28. Efecto del inhibidor de NOX2 (gp91 ds-tat) sobre la actividad NADPH oxidasa en presencia de la L-carnitina (LC) y angiotensina II (Ang II).....	83
Figura 29. Efecto del silenciamiento de NOX2 sobre la expresión proteica de las isoformas de las isoformas NOX2 (A), NOX1 (B) y NOX4 (C) de la NADPH oxidasa.....	85
Figura 30. Efecto del silenciamiento de NOX2 sobre la actividad NADPH oxidasa	86
Figura 31. Efecto del silenciamiento de NOX2 sobre la producción de H ₂ O ₂	87
Figura 32. Efecto del inhibidor de NOX1 (2-acetilfenotiazina) sobre la actividad NADPH oxidasa en presencia de L-carnitina (LC) y angiotensina II (Ang II).....	88
Figura 33. Efecto del silenciamiento de NOX4 sobre la expresión génica de las isoformas NOX4 (A), NOX1 (B) y NOX2 (C) de la NADPH oxidasa	90
Figura 34. Efecto del silenciamiento de NOX4 sobre la actividad NADPH oxidasa	91
Figura 35. Efecto del silenciamiento de NOX4 sobre la producción de H ₂ O ₂	92
Figura 36. Efecto de la wortmanina, SB203580, PD98059 y BIS I sobre la actividad de la NADPH oxidasa estimulada por angiotensina II (Ang II)	94

Figura 37. Efecto de la wortmanina, SB203580, PD98059 y BIS I sobre la actividad de la NADPH oxidasa en células tratadas con L-carnitina (LC) y angiotensina II (Ang II)	95
Figura 38. Fosforilación tiempo-dependiente de la proteína Akt inducida por angiotensina II (Ang II)	96
Figura 39. Efecto de la L-carnitina (LC) y angiotensina II (Ang II) sobre la fosforilación de la proteína Akt	97
Figura 40. Efecto de la L-carnitina (LC) y la wortmanina (W) en la fosforilación de la proteína Akt	98
Figura 41. Fosforilación tiempo-dependiente de la proteína p38 MAPK inducida por angiotensina II (Ang II)	99
Figura 42. Efecto de la L-carnitina (LC) y angiotensina II (Ang II) sobre la fosforilación de la proteína p38 MAPK	100
Figura 43. Fosforilación tiempo-dependiente de la proteína p-ERK _{1/2} por angiotensina II (Ang II)	101
Figura 44. Efecto de la L-carnitina (LC) y angiotensina II (Ang II) sobre la fosforilación de la proteína ERK _{1/2}	102
Figura 45. Efecto de la L-carnitina (LC) y angiotensina II (Ang II) sobre la actividad de la proteína PKC	103
Figura 46. Translocación tiempo-dependiente de la proteína NF-kB inducida por angiotensina II (Ang II)	104
Figura 47. Efecto de la L-carnitina (LC) sobre la translocación del complejo NF-kB inducida por angiotensina II (Ang II)	105
Figura 48. Efecto de la L-carnitina (LC) en la fosforilación de la proteína α -I κ B inhibida por angiotensina II (Ang II)	106
Figura 49. Caracterización de la fuente de O ₂ ⁻ en células NRK-52E tratadas con TGF β durante 24 horas	108
Figura 50. Ensayo concentración-respuesta para L-carnitina (LC) en células NRK-52E tratadas con TGF β durante 24 horas	109

Figura 51. Efecto de la L-carnitina (LC) sobre la actividad NADPH oxidasa tras la estimulación con TGF β durante 24 horas.....	110
Figura 52. Efecto de la L-carnitina (LC) en la expresión génica de las isoformas NOX1 (A), NOX2 (B) y NOX4 (C) de la NADPH oxidasa en células tratadas con TGF β	112
Figura 53. Efecto de la L-carnitina (LC) y TGF β en la expresión génica de CTGF	113
Figura 54. Efecto de la L-carnitina (LC) en la fosforilación de la proteína Smad2 inducida por TGF β	114
Figura 55. Efecto de la L-carnitina (LC) en la expresión génica de MMP-9 en corteza renal de ratas hipertensas.....	115
Figura 56. Efecto de la L-carnitina (LC) en la expresión génica de TIMP-1 en corteza renal de ratas hipertensas.....	116
Figura 57. Efecto de la L-carnitina (LC) en el ratio MMP-9/TIMP-1 de corteza renal de ratas hipertensas.....	117
Figura 58. Efecto de la L-carnitina (LC) en la expresión génica de MMP-9 en células tratadas con TGF β	118
Figura 59. Efecto de la L-carnitina (LC) en la expresión génica de TIMP-1 en células tratadas con TGF β	119
Figura 60. Efecto de la L-carnitina (LC) L-carnitina (LC) sobre el ratio MMP-9/TIMP-1 en la línea celular NRK-52E.....	120

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del tampón sacarosa	47
Tabla 2. Reactivos necesarios para la determinación de peróxido de hidrógeno.....	53
Tabla 3. Componentes de la mezcla de reacción.....	55
Tabla 4. Cebadores utilizados en los estudios de PCR a tiempo real.....	56
Tabla 5. Condiciones experimentales del termociclador para la realización de una PCR a tiempo real.....	56
Tabla 6. Composición del tampón de electroforesis 10X	58
Tabla 7. Composición del tampón de transferencia 1X.....	58
Tabla 8. Composición de la solución de <i>Ponceau S</i>	59
Tabla 9. Composición de la solución de lavado (TBS-T 1X)	59
Tabla 10. Anticuerpos y diluciones utilizadas en los estudios de Western Blot.....	60
Tabla 11. Reactivos y materiales necesarios para la determinación de la actividad PKC..	61
Tabla 12. Composición del tampón de lisis	62
Tabla 13. Composición tampón A	64
Tabla 14. Composición tampón B	64
Tabla 15. Composición tampón C.....	65
Tabla 16. Reactivos necesarios para la transfección con lípidos catiónicos para el silenciamiento de genes.....	66



INTRODUCCIÓN

1. NEFROPATÍA HIPERTENSIVA

La hipertensión arterial (HTA), definida como una elevación crónica de los valores normales de presión arterial, es el problema de salud más común en las sociedades desarrolladas, constituyendo uno de los factores de riesgo cardiovascular más relevantes.^{1,2} Además del sistema cardiovascular, la HTA afecta a otros órganos vitales como el riñón; de hecho, una de las principales consecuencias de la HTA es la pérdida progresiva de la función renal.³ Estudios recientes sugieren que la hipertensión es causa y consecuencia de las enfermedades renales, estando la presencia de fallo renal asociada al desarrollo de enfermedades cardiovasculares.⁴

La nefropatía hipertensiva, por tanto, se define como un trastorno dañino del riñón causado por una elevación continuada de los valores de presión arterial.⁵ Así, el incremento en la presión sanguínea sistémica conduce a un aumento de la presión glomerular, provocándose un estiramiento de la pared de los vasos, daño endotelial y un aumento en la filtración glomerular de proteínas. Estos procesos, a su vez, provocan cambios en las células mesangiales y tubulares proximales, resultando en última instancia en una sustitución del tejido funcional por tejido conectivo no funcional; esto es, provocándose una fibrosis.⁶

Por otro lado, uno de los factores más importantes en la progresión del fallo renal crónico es la activación del sistema renina-angiotensina (SRA), no solo por su efecto sobre la elevación de la presión sanguínea, sino también por favorecer los procesos de proliferación celular, inflamación y acumulación de matriz extracelular que acompañan a la nefropatía hipertensiva. Numerosos estudios demuestran que la angiotensina II (Ang II) tiene un papel fundamental en el daño funcional y estructural del riñón derivado de la hipertensión arterial, a través del efecto que realiza sobre el estrés oxidativo y la participación de la enzima NADPH oxidasa. Así, en la actualidad está aceptado que la Ang II genera estrés oxidativo en el riñón a través del receptor tipo I de la Ang II (AT1), mediando la generación de hipertensión arterial y el desarrollo de un daño renal progresivo.⁶⁻⁹

1.1. ESTRÉS OXIDATIVO

1.1.1. CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la formación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y los mecanismos de defensa antioxidantes, fenómeno que participa en multitud de procesos patológicos.¹⁰

En general, los radicales libres son especies químicas con un electrón desapareado, siendo moléculas altamente reactivas. La formación de radicales libres en cadena lidera el daño a tejidos y sistemas biológicos. La gran mayoría de estos radicales libres son principalmente radicales de oxígeno y otras ERO. Entre estas especies reactivas se encuentran: anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH\cdot$), óxido nítrico (NO), peroxinitrito ($ONOO\cdot$), ácido hipocloroso (HOCl) y oxígeno singlete (1O_2)^{11,12} (Figura 1). Las ERO tienen un alto potencial deletéreo para la integridad de las células, por lo cual deben de ser neutralizadas por el sistema de defensa antioxidante. En los sistemas biológicos, existen sistemas enzimáticos y no enzimáticos que protegen a la célula de los efectos perjudiciales del estrés oxidativo. Entre las enzimas antioxidantes que participan en la eliminación de las ERO se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), que convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno, y las enzimas catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX), las cuales catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua. También la enzima glutatión reductasa (GR) es de vital importancia, ya que genera glutatión reducido (GSH) a partir de glutatión oxidado (GSSG), siendo aquél necesario para la acción de la GPX (Figura 1). Entre los antioxidantes endógenos no enzimáticos destacan principalmente el glutatión, y las vitaminas A, C, E entre otros.^{13,14}

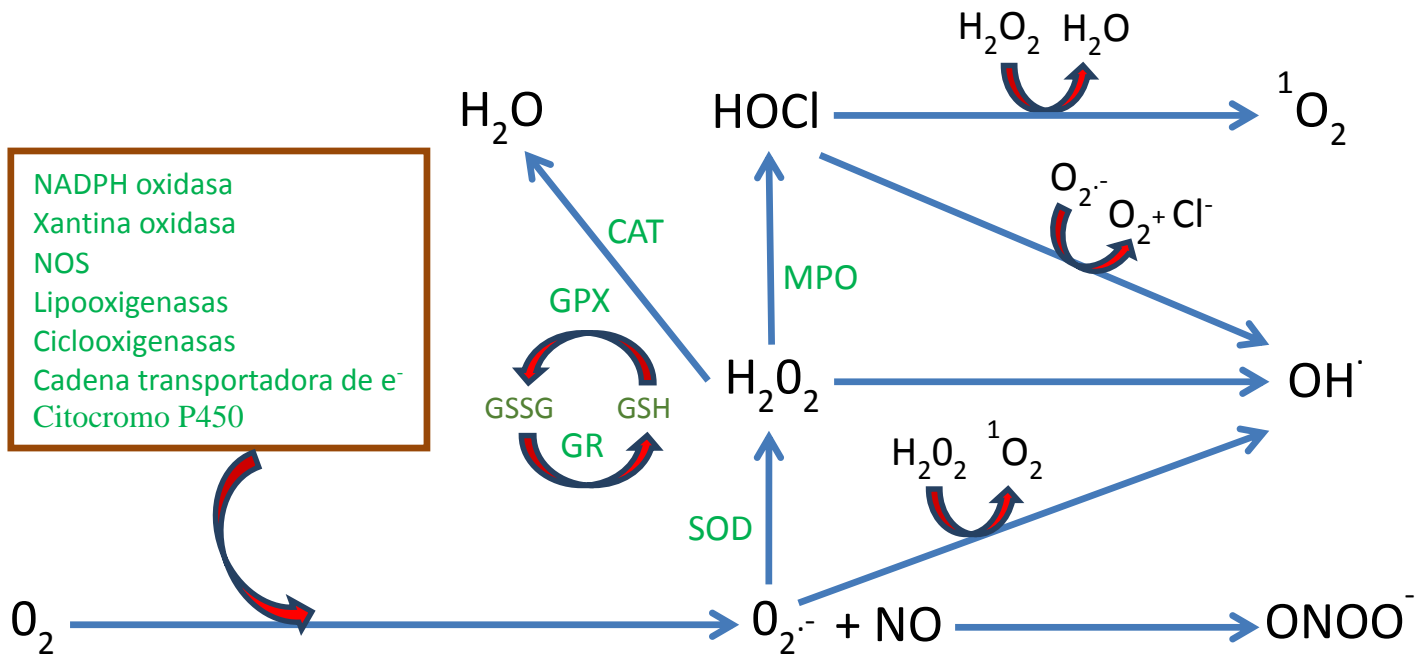


Figura 1: Metabolismo de las especies reactivas de oxígeno (ERO). CAT, catalasa; Cl⁻, cloruro; GPX, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; H₂O, agua; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; HOCl, ácido hipocloroso; MPO, mieloperoxidasa; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintasa; O₂, oxígeno molecular; O₂^{·-}, anión superóxido; ¹O₂, oxígeno singlete; OH[·], radical hidroxilo; ONOO⁻, peroxinitrito; SOD, superóxido dismutasa.

1.1.1.1. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las ERO participan y contribuyen en una amplia variedad de funciones y mecanismos esenciales para la célula. Así, forman parte del sistema inespecífico de defensa frente a bacterias u otros microorganismos, actúan como sensores de la presión de oxígeno, y participan en el desarrollo y migración de las células de la musculatura lisa, en la modulación de la función endotelial (regulando el tono vascular), en la expresión de las citoquinas proinflamatorias y en la modificación de la matriz extracelular, entre otros.^{9,10,15}

Las ERO también pueden actuar como segundos mensajeros (principalmente el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno), amplificando las señales de transducción de

varios receptores de membrana. Así, por ejemplo, el anión superóxido estimula la activación de la enzima guanilato ciclasa, formando GMPc, que es un potente mensajero secundario, además de actuar como mensajero intracelular esencial en la acción presora de la Ang II.^{15,16} Por otro lado, el peróxido de hidrógeno participa en vías de señalización que regulan procesos de migración y diferenciación celular, así como en vías de señalización involucradas en procesos de hipertrofia, modulando la activación de proteínas MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógeno) tales como p38 MAPK (proteína quinasa p38 activada por mitógeno) y ERK_{1/2} (proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2).¹⁷

1.1.1.2. FUENTES ENZIMÁTICAS PRODUCTORAS DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

En las células existen muchas fuentes enzimáticas productoras de especies reactivas de oxígeno. Entre ellas, cabe destacar:

a) La enzima xantina oxidasa. Se encuentra localizada en el citosol, en la superficie externa de la membrana celular (con predominio en las regiones de contacto intercelular) y en vesículas intracelulares. Es una metaloflavoproteína que puede estar en dos formas interconvertibles y diferentes entre sí, denominadas xantina deshidrogenasa (XDH) y xantina oxidasa (XO). De estas dos formas, solo la segunda genera anión superóxido por oxidación de la hipoxantina a xantina, y de la xantina a ácido úrico (procesos que requieren la reducción de oxígeno molecular) (Figura 2). Por tanto, la activación en exceso de XO puede aumentar la generación de las ERO, siendo ésta la causa de muchas enfermedades que cursan con daño en la función vascular.^{18,19}

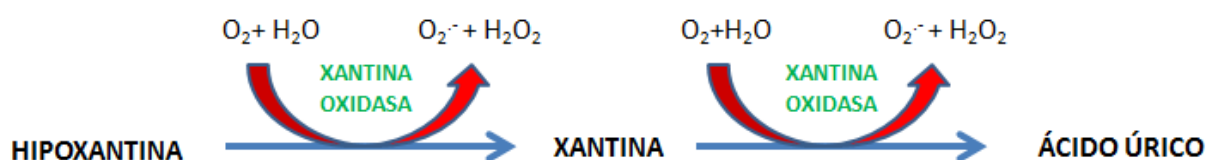


Figura 2: Reacciones catalizadas por la xantina oxidasa. H₂O, agua; H₂O₂, peróxido de hidrógeno; O₂, oxígeno molecular; O₂⁻, anión superóxido.

b) **La enzima óxido nítrico sintasa (NOS) desacoplada.** La NOS se localiza en caveolas del sarcolema, túbulos T de cardiomiocitos, mitocondria y retículo endoplásmico. En condiciones fisiológicas, esta enzima, en presencia de cofactores como la L-arginina y la tetrahidrobiopterina (BH₄), produce NO. Ahora bien, en situaciones adversas, puede llegar a sufrir un proceso de “desacoplamiento” por deficiencia de BH₄ o L-arginina. En estas condiciones, la NOS reduce el oxígeno molecular y genera anión superóxido (Figura 1). Además, hay que tener en cuenta que el peroxinitrito, formado por la unión entre el anión superóxido y el óxido nítrico (Figura 1), puede oxidar a la BH₄, colaborando en el proceso de desacoplamiento. El incremento en la producción de anión superóxido, así como el aumento en la generación de peroxinitrito, forman parte de la fisiopatología de muchas enfermedades cardiovasculares.¹⁹⁻²¹

c) **La cadena respiratoria mitocondrial.** La producción de ERO en la mitocondria es importante para el control del metabolismo y de la transducción de señales, entre otras funciones. Más del 95% del O₂ consumido por las células es reducido por 4 electrones para generar 2 moléculas de agua mediante los complejos enzimáticos (I-IV) de la cadena mitocondrial. En menor medida, este flujo de electrones es dirigido hacia la generación de anión superóxido (Figura 1). Los complejos que más anión superóxido generan en la cadena respiratoria mitocondrial son el complejo I (NADH deshidrogenasa) y el complejo III (ubiquinona-citocromo c reductasa). La mayoría del superóxido generado es rápidamente dismutado a peróxido de hidrógeno por la enzima superóxido dismutasa²²⁻²⁴ (Figura 1).

d) **La enzima citocromo P450.** Se encuentra localizada en las membranas plasmática, mitocondrial y del retículo endoplásmico, generando anión superóxido y radicales hidroxilo^{19,25,26} (Figura 1).

e) **Las enzimas lipooxigenasas, ciclooxigenasas y mieloperoxidasa (MPO).** La enzima MPO genera HOCl a partir de Cl⁻ y H₂O₂, localizándose en los gránulos primarios de neutrófilos. Las enzimas ciclooxigenasas y lipooxigenasas generan anión superóxido^{23,26-28} (Figura 1).

f) **La enzima NADPH oxidasa.** Por su importancia en el contexto del presente estudio, dedicaremos el apartado 1.2 a la descripción detallada de esta enzima generadora de especies reactivas de oxígeno. Los cambios en la regulación de esta enzima pueden

inducir un aumento del estrés oxidativo de especial relevancia en la iniciación y progresión de enfermedades cardiovasculares y renales.

1.1.2. ESTRÉS OXIDATIVO: CONSECUENCIAS PATOLÓGICAS RENALES

En determinadas condiciones patológicas, el incremento en la generación de ERO y/o la depleción del sistema antioxidante producen un aumento de estrés oxidativo que resulta, como hemos comentado, en un daño en el tejido. Las ERO tienen un efecto deletéreo sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. La peroxidación lipídica es particularmente dañina, al ir acompañada de una liberación adicional de sustancias reactivas, con modificación de las estructuras celulares. Por su parte, especies reactivas como el peroxinitrito pueden reaccionar con residuos de proteínas, provocando la aparición de nitrotirosina. A continuación, las proteínas oxidadas se inactivan y se vuelven más susceptibles a ser eliminadas por proteólisis. Por último, las ERO también atacan a todos los componentes de la molécula de ADN, pudiendo provocar modificaciones permanentes en el material genético.²⁹⁻³³

Todos estos mecanismos dañinos para la célula han sido implicados en la patogénesis de muchas enfermedades, incluyendo alteraciones renales como glomerulonefritis, fallo renal agudo, fallo renal progresivo y nefritis túbulo-intersticial. Por otro lado, hay que tener en cuenta la especial vulnerabilidad del riñón ante el daño por estrés oxidativo, debido al alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que existe entre los lípidos renales.^{10,34}

Existen distintas enfermedades que inducen estrés oxidativo en el riñón, contribuyendo a la enfermedad renal. Entre estas enfermedades se encuentran la hipercolesterolemia, el síndrome metabólico, la *diabetes mellitus* o la hipertensión. En concreto, y como ya se ha señalado, la hipertensión arterial se considera una de las mayores causas de desarrollo de fallo renal, siendo el regulador clave en el desarrollo de esta patología el estrés oxidativo.³⁴

Por otro lado, el SRA juega un papel esencial en la regulación de procesos fisiológicos y fisiopatológicos en el riñón. La Ang II produce estrés oxidativo en el riñón a

través de la sobreexpresión de la enzima NADPH oxidasa a lo largo de la nefrona, con la consecuente generación de anión superóxido. Así, el aumento de la peroxidación lipídica en pacientes hipertensos con enfermedad renovascular, se relaciona con un aumento del estrés oxidativo producido por la activación del sistema SRA y los consiguientes efectos sistémicos de la Ang II.^{9,35}

1.2. NADPH OXIDASA

1.2.1. ASPECTOS GENERALES

La enzima *nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa* (NADPH oxidasa) es un complejo multienzimático que cataliza la producción de anión superóxido, mediante la transferencia de un electrón procedente de una molécula de NADPH hasta el oxígeno molecular. Todas las isoformas de la NADPH oxidasa poseen una serie de propiedades estructurales comunes: sitio de unión a NADPH, sitio de unión a *flavina adenina dinucleótido* (FAD), 6 dominios transmembrana conservados, y 4 histidinas altamente conservadas asociadas a grupos hemo.^{36,37}

La enzima NADPH oxidasa interviene en numerosas funciones, entre las que destacan: señalización celular, mediación de efectos hormonales, regulación de la actividad de canales iónicos, sensor de O₂, diferenciación de adipocitos, expresión génica, reproducción, proliferación celular, senescencia, apoptosis y sistema de defensa.³⁷⁻³⁹

La primera NADPH oxidasa descrita fue la fagocítica, siendo ésta un componente clave en la inmunidad innata. El componente catalítico de la NADPH oxidasa fagocítica (NADPH oxidasa "clásica") se denomina gp91phox y se localiza en membranas intracelulares y en la membrana plasmática. Sin embargo, gp91phox también se ha encontrado en otras células no fagocíticas, tales como las vasculares, cardíacas, renales, neuronas, miocitos y hepatocitos, pasándose a llamar a NOX2. En estos casos, la localización subcelular de NOX2 va a depender del tipo de célula (Sedeek, Hebert, Kennedy, Burns, & Touyz, 2009).

Estudios posteriores han demostrado la existencia de proteínas homólogas a gp91phox en otros tipos celulares no fagocíticos, describiéndose de este modo las 7

isoformas que componen en la actualidad la familia de las NADPH oxidasas: NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 Y DUOX 2.⁴⁰

NOX1 se ha detectado principalmente en células epiteliales de colon, próstata, útero, células endoteliales, fibroblastos adventicios y células de músculo liso.^{14,41} Se localiza en la membrana plasmática, caveolas y endosomas.⁴²

NOX3 se ha descrito en riñón fetal, cerebro, cráneo y oído interno, estando involucrada en la función vestibular. No está asociada a la enfermedad cardiovascular.⁴³ Se localiza en la membrana plasmática.¹⁷

NOX4 está abundantemente representada en riñón, denominándose por ello “Renox”. Además se expresa en células endoteliales, fibroblastos, osteoclastos, células musculares vasculares lisas y cardiomiocitos.^{14,44} Se localiza en la membrana plasmática, en las membranas de vesículas perinucleares y en el retículo endoplásmico.^{42,45}

NOX5 aparece en testículos, tejido linfoide, células endoteliales, estómago y fibroblastos cardiacos. No se expresa en roedores.^{46,47} Se localiza principalmente en membranas intracelulares, como el retículo endoplásmico, aunque también existe una pequeña proporción de NOX5 en la membrana plasmática.^{48,49}

DUOX1 y DUOX2 se expresan en tiroides, estando involucradas en la síntesis de hormonas tiroideas.⁴⁴ Se localizan en la membrana plasmática.¹⁷

Al menos 3 isoformas de la enzima NADPH oxidasa se expresan en la corteza renal: NOX1, NOX2 y NOX4. NOX4 es la isoforma que más abunda, localizándose en su mayor parte en células tubulares y, en menor medida, en el glomérulo y en las células mesangiales.³⁶

1.2.2. ESTRUCTURA Y FUNCIONAMIENTO DE LA NADPH OXIDASA

1.2.2.1. NADPH OXIDASA FAGOCÍTICA: GP91PHOX

Como hemos señalado, la NADPH oxidasa fagocítica es la NADPH oxidasa clásica; ésta se compone de dos dominios con propiedades diferentes, siendo citosólicos tanto el extremo amino como el carboxilo. La parte amino terminal incluye 6 alfa-hélices

transmembrana conectadas por 5 lazos, 3 de los cuales son extracelulares e incluyen sitios de glicosilación. Los otros dos son intracelulares y accesibles a reguladores citosólicos. Además, dos de las hélices transmembrana (III y V) incluyen dos residuos de histidina que coordinan dos átomos de Fe pertenecientes a grupos hemo. El extremo carboxilo terminal constituye un dominio deshidrogenasa que incluye lugares de unión para el sustrato NADPH y el cofactor FAD (Figura 3). Cuando el complejo se activa, 2 electrones se transfieren desde el NADPH hasta el FAD, produciéndose cambios redox en los átomos de Fe del grupo hemo. Finalmente, cada electrón reduce una molécula de oxígeno molecular a anión superóxido. El O_2^- producido por gp91phox en células fagocíticas es liberado hacia el exterior de la célula o hacia el lumen de una vesícula, ejerciendo una función microbicida.^{35,50-52}

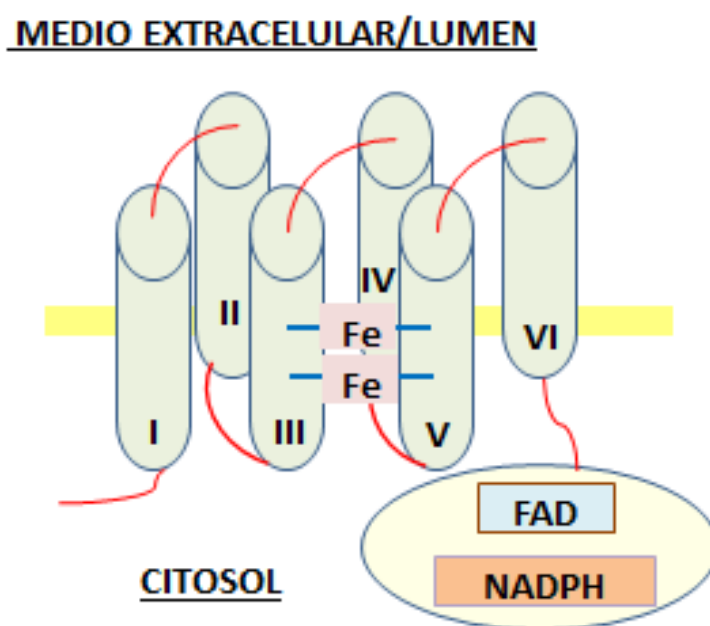


Figura 3: Estructura de la NADPH oxidasa fagocítica: gp91phox. I-VI, alfa-hélices transmembrana; FAD, sitio de unión a FAD; Fe, átomos de hierro pertenecientes al grupo hemo; NADPH, sitio de unión a NADPH.

Aparte de la subunidad catalítica gp91phox, la NADPH oxidasa fagocítica involucra a otras 4 subunidades: p47phox, p67phox, p40phox y p22phox. En condiciones basales, p47phox se encuentra desfosforilada formando un trímero con p67phox y p40phox en el

citósol, mientras que p22phox y gp91phox están en la membrana formando una flavoproteína heteromérica denominada citocromo b_{558} . Cuando se produce una activación mediada por la llegada de un estímulo, p47phox se fosforila y se transloca, junto con p67phox y p40phox, a la membrana, donde se unen al citocromo b_{558} ; es este ensamblaje, pues, lo que activa la NADPH oxidasa. La enzima activa transfiere electrones desde el NADPH hasta el oxígeno molecular, formándose anión superóxido como hemos señalado. El proceso de activación requiere también la presencia de la GTPasa RAC. En estado de reposo, RAC tiene unida una molécula de GDP, pero, tras la llegada de un estímulo, el GDP es sustituido por una molécula de GTP a través de la acción de la proteína GEF (factor de intercambio de nucleótidos de guanina). Tras esto, RAC se transloca hacia la membrana simultáneamente (aunque de manera independiente) al trímero compuesto por p47phox, p67phox y p40phox (Figura 4). Además, existen diferentes tipos de proteínas RAC (RAC1 y RAC2) que intervienen en la activación de las diferentes isoformas de la NADPH oxidasa. En concreto, RAC1 participa en la activación de NOX1 y NOX3, y RAC2 en la activación de gp91phox/NOX2.^{22,53-56}

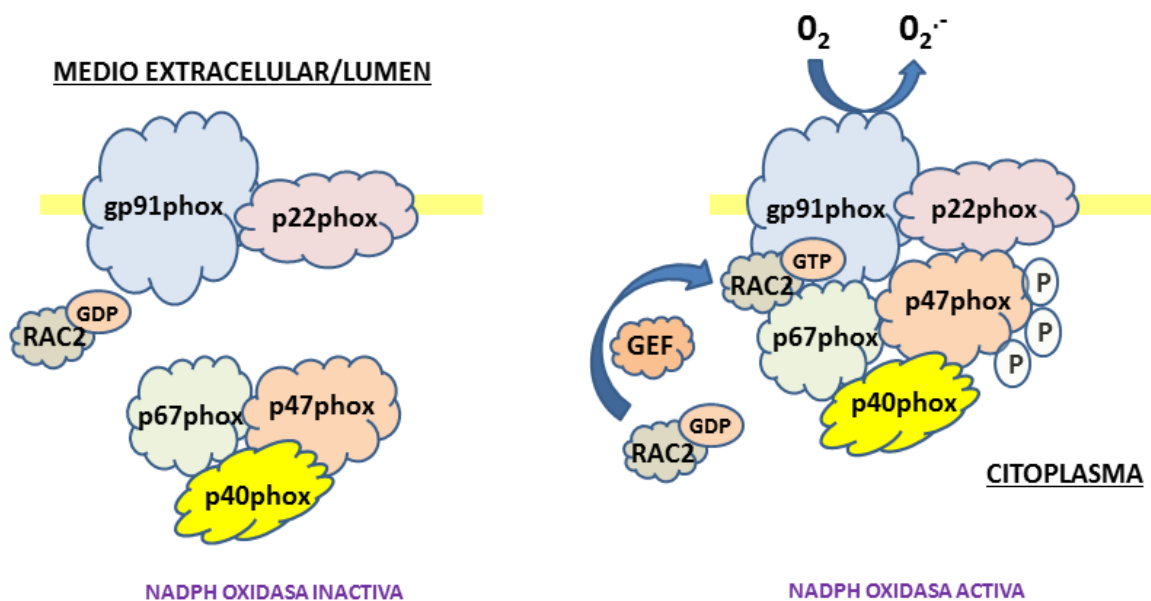


Figura 4: gp91phox. GDP, guanósín difosfato; GEF, factor de intercambio de nucleótidos de guanina; gp91phox, glicoproteína 91phox; GTP, guanósín trifosfato; O_2 , oxígeno molecular; $O_2^{\cdot-}$, anión superóxido; p22phox, citocromo b-245; p40phox, factor citosólico 4 de neutrófilos; p47phox, factor citosólico 1 de neutrófilos; p67phox, factor citosólico 2 de neutrófilos; RAC2, GTPasa.

1.2.2.2. NADPH OXIDASA NO FAGOCÍTICA

Como ya se ha descrito anteriormente, gp91phox fue encontrada también en células no fagocíticas, denominándose en estos casos NOX2; su funcionamiento y su activación son similares a lo descrito para gp91phox, siendo su localización subcelular de vital importancia para la función que realiza. Así, la NOX2 situada en la membrana plasmática libera O_2^- hacia el exterior; sin embargo, NOX2 también se encuentra frecuentemente localizada en compartimentos intracelulares, generándose en este caso O_2^- hacia el medio intracelular para intervenir en procesos de señalización celular.⁵¹

NOX1 presenta una actividad constitutiva basal débil, la cual puede aumentar en presencia de estimuladores como la Ang II, aumentando así la capacidad de NOX1 de generar anión superóxido.^{36,50} Al igual que NOX2, NOX1 está unida a p22phox formando un citocromo unido a membrana. Para su activación, se une con las subunidades citosólicas NOXO1 (*Nox organizer 1*) y NOXA1 (*Nox activator 1*), homólogas respectivamente a p47phox y p67phox. p40phox (u homólogos) no es importante para la activación de NOX1, pero sí es necesaria la GTPasa RAC1. A diferencia de la NADPH oxidasa fagocítica, la subunidad NOXO1 se encuentra localizada en la membrana junto a NOX1 y p22phox en ausencia de activación.^{40,57-59} NOX1 produce anión superóxido hacia el medio intracelular (citósol), estando este anión involucrado en procesos de señalización intracelular.⁵⁰ Por otro lado, existe un mecanismo de inhibición de NOX1 a través de la fosforilación de NOXA1, fosforilación que provoca la disociación entre RAC1 y NOXA1^{14,51} (Figura 5).

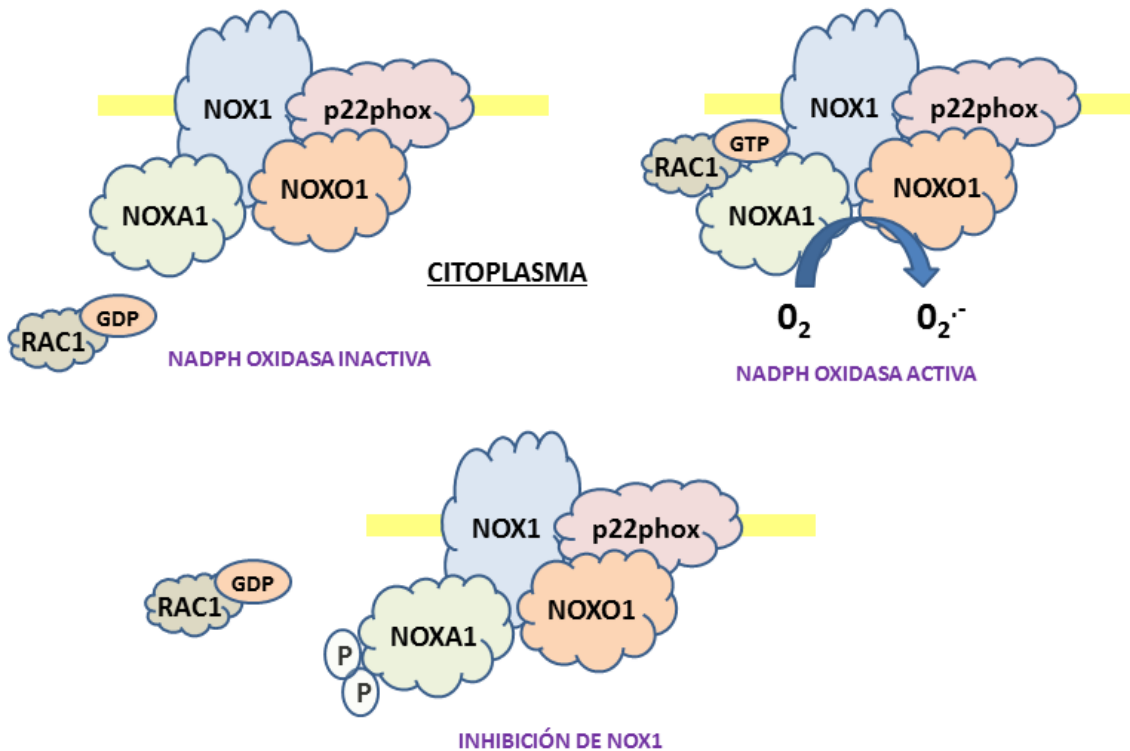
MEDIO EXTRACELULAR

Figura 5: NOX1. GDP, guanósín difosfato; GTP, guanósín trifosfato; NOX1, NADPH oxidasa 1; NOXA1, *nox activator 1*; NOXO1, *nox organizer 1*; O_2 , oxígeno molecular; $O_2^{\cdot-}$, anión superóxido; p22phox, citocromo b-245; RAC1, GTPasa.

Otra de las NADPH oxidasa descritas es NOX3, la cual produce anión superóxido formando un complejo funcional con p22phox. En el proceso de activación, NOX3 muestra una flexibilidad inusual respecto a las subunidades que participan en dicha activación, ya que pueden participar tanto p47phox/p67phox, como NOXO1/NOXA1 (aunque la presencia de NOXA1 no está bien definida en la bibliografía actual) (Figura 6). Además, existen excepciones, ya que p47phox o NOXO1 son capaces de aumentar la producción de anión superóxido en ausencia de p67phox o NOXA1.^{60,61} En todo caso, NOX3 parece liberar ERO hacia el medio extracelular, si bien existe poca información en la bibliografía a este respecto.⁶²

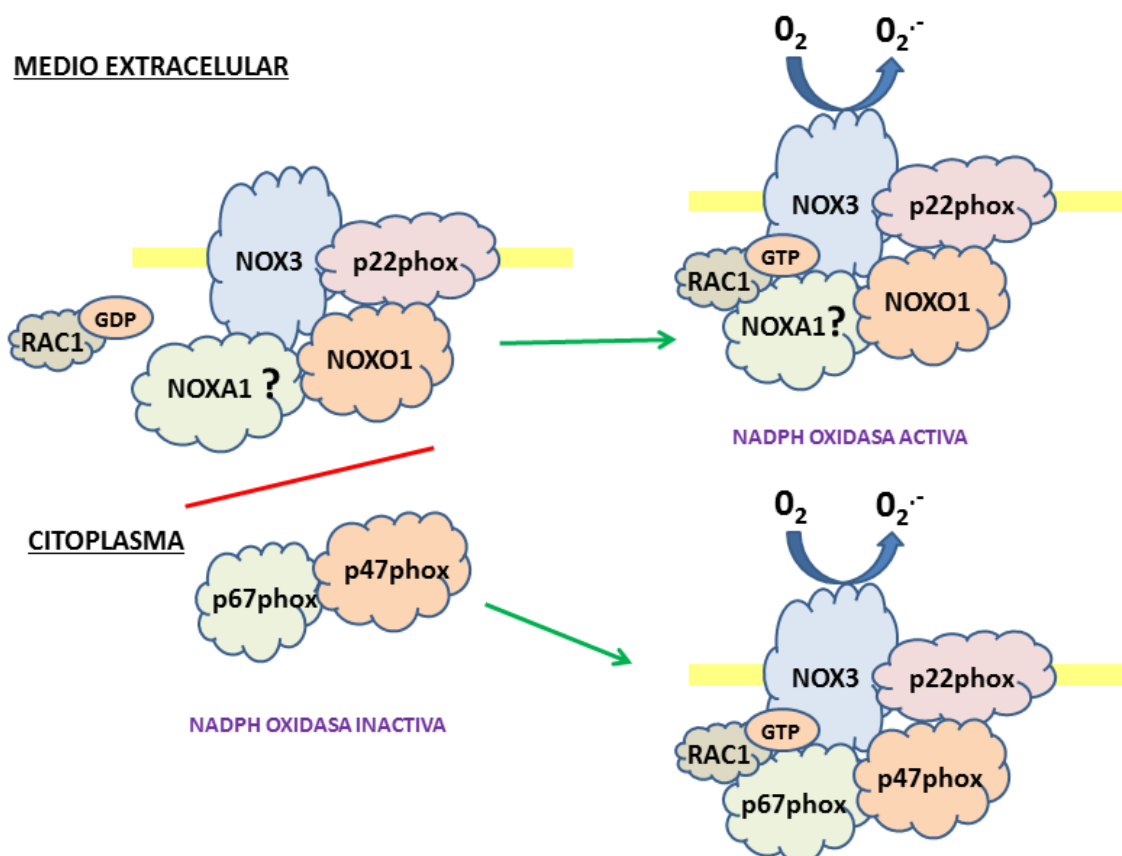


Figura 6: NOX3. GDP, guanósín difosfato; GTP, guanósín trifosfato; NOX3, NADPH oxidasa 3; NOXA1, *nox activator 1*; NOXO1, *nox organizer 1*; O₂, oxígeno molecular; O₂⁻, anión superóxido; p22phox, citocromo b-245; p47phox, factor citosólico 1 de neutrófilos; p67phox, factor citosólico 2 de neutrófilos; RAC1, GTPasa.

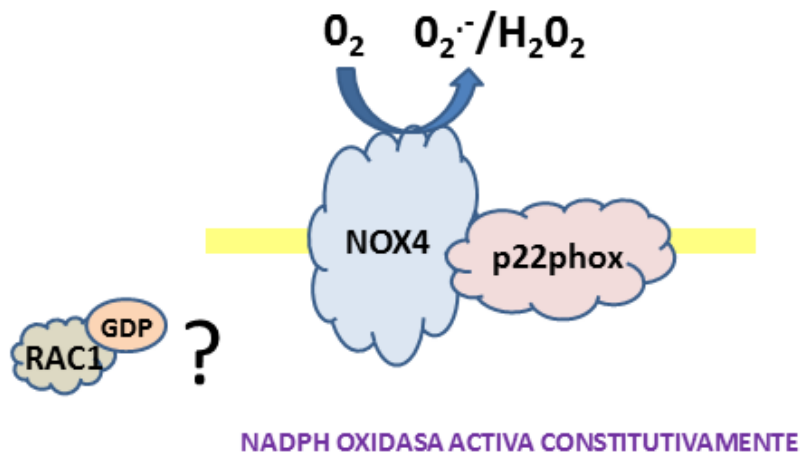
En cuanto a NOX4, esta isoforma fue originalmente descrita como un sensor de oxígeno y como regulador del crecimiento celular renal, siendo la NADPH oxidasa que presenta menos homología con gp91phox. A diferencia de otras NOX, NOX4 está constitutivamente activa, contribuyendo a la producción basal de ERO, habiendo incluso estudios que muestran un papel protector de esta NADPH oxidasa.^{22,36,63}

NOX4 está colocalizada y unida a la proteína p22phox. Sin embargo, la activación de NOX4 no requiere la interacción con las subunidades citosólicas clásicas (p47phox, p67phox, p40phox). Tampoco se conoce con exactitud la función de RAC1 en la actividad de NOX4^{63,64} (Figura 7). Existen algunas proteínas que pueden regular la actividad de

NOX4, como Poldip2 y TKS (que inducen un aumento de actividad de NOX4).⁶⁴ También existen trabajos que han propuesto un papel inhibitorio de NOXA1 sobre NOX4.⁵⁵

Según la literatura reciente, el H_2O_2 parece ser el producto principal de NOX4, aunque la bioquímica del proceso no se conoce muy bien. Puede que se produzca una rápida dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno tras ser liberado por NOX4. Otros autores proponen que la disociación del anión superóxido de NOX4 es más lenta que en otras isoformas de gp91phox, permitiendo la dismutación hacia H_2O_2 antes de ser liberada por NOX4. En este sentido, se ha propuesto un mecanismo por el cual NOX4 produce preferencialmente H_2O_2 mediante la implicación de un residuo altamente conservado en el lazo E de NOX4, que promovería la rápida dismutación de anión superóxido antes de salir de la enzima⁶⁴⁻⁶⁶. Sea como fuere, NOX4 libera H_2O_2 al medio extracelular cuando se encuentra localizada en la membrana extracelular. Cuando está localizada en membranas de estructuras intracelulares, la liberación de H_2O_2 se produce hacia el lumen de estos orgánulos^{45,67} (Figura 7).

MEDIO EXTRACELULAR/LUMEN



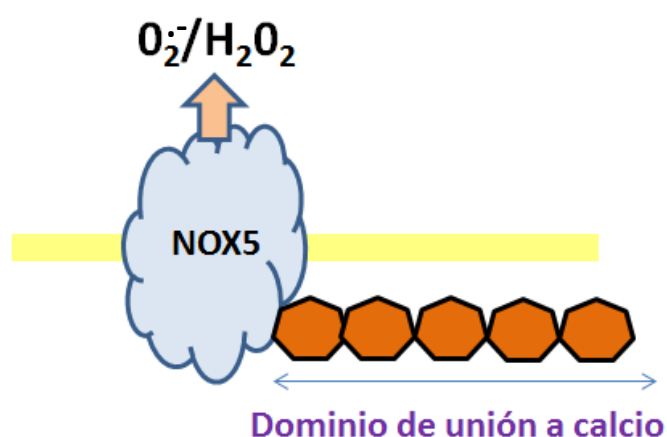
CITOPLASMA

Figura 7: NOX4. GDP, guanosín difosfato; H_2O_2 , peróxido de hidrógeno; NOX4, NADPH oxidasa 4; O_2 , oxígeno molecular; $\text{O}_2\cdot^-$, anión superóxido; p22phox, citocromo b-245; RAC1, GTPasa.

La isoforma NOX5 genera anión superóxido y peróxido de hidrógeno en respuesta a incrementos de los niveles intracelulares de calcio. Posee un dominio calmodulina en la región aminoterminal, en la cual se localizan 4 sitios de unión a calcio, no necesitando otras subunidades para su activación (Figura 8). El dominio carboxiterminal presenta sitios de unión a FAD y NADPH.^{64,68}

Debido a su localización en las membranas de orgánulos celulares, tales como el retículo endoplásmico, se ha descrito la producción de ERO hacia el lumen de dichos orgánulos.⁴⁸ Por otro lado, NOX5 también genera ERO hacia el medio extracelular cuando NOX5 está presente en la membrana plasmática (Figura 8), aunque en menor proporción que cuando se localiza intracelularmente.^{48,49}

MEDIO EXTRACELULAR/LUMEN



CITOPLASMA

Figura 8: NOX5. H₂O₂, peróxido de hidrógeno; NOX5, NADPH oxidasa 5; O₂⁻, anión superóxido.

Por último, DUOX1 y DUOX2 no requieren subunidades reguladoras para su funcionamiento, pudiendo ser activadas directamente por calcio. Producen peróxido de hidrógeno,^{36,58} existiendo estudios que muestran que DUOX1 y DUOX2 producen H₂O₂ hacia el medio extracelular⁶⁹ (Figura 9).

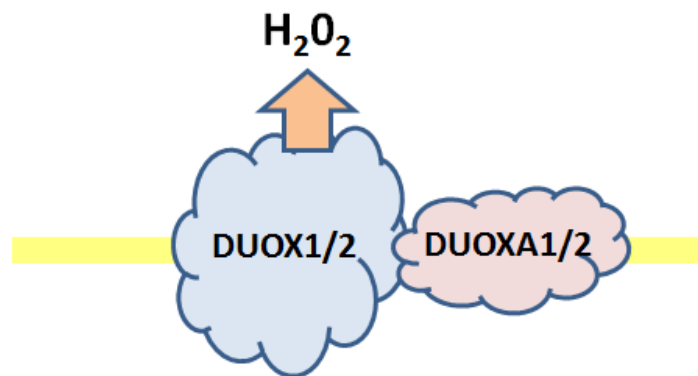
MEDIO EXTRACELULAR**CITOPLASMA**

Figura 9: DUOX1/2. DUOX1/2, Dual oxidasa 1/2; DUOXA 1/2, factor 1/2 de maduración de DUOX; y H₂O₂, peróxido de hidrógeno.

1.2.2.3. DIFERENCIAS ENTRE LA NADPH OXIDASA FAGOCÍTICA Y NO FAGOCÍTICA

Aunque la NADPH oxidasa fagocítica y la no fagocítica son similares entre sí, presentan importantes diferencias funcionales entre ellas. Así, la NADPH fagocítica no produce anión superóxido en condiciones basales, ya que en reposo está completamente inactiva, como hemos señalado; por el contrario, la no fagocítica consta de una actividad constitutiva basal moderada. Otro aspecto diferencial se halla en la forma y cantidad de anión superóxido producido: las células fagocíticas liberan más cantidad de superóxido y mucho más rápidamente que las no fagocíticas, que alcanzan su producción máxima desde minutos hasta horas.^{70,71}

Por otra parte, las células fagocíticas generan anión superóxido hacia el espacio extracelular para su función microbicida. Mientras tanto, las no fagocíticas generan anión superóxido tanto hacia el medio extracelular como hacia el intracelular, interviniendo en procesos de señalización celular.⁵² En cuanto a la utilización del donador de electrones como sustrato, si bien en ambos casos pueden usar NADPH, la NADPH oxidasa no fagocítica puede utilizar NADH.^{72,73}

1.2.3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA ACTIVACIÓN DE LA NADPH OXIDASA

Como hemos visto, la activación de la NADPH oxidasa (ya sea en su forma fagocítica o no fagocítica) está modulada e involucra normalmente el ensamblaje de componentes citosólicos y del citocromo b_{558} unido a membrana. Las vías de señalización que provocan la activación de la NADPH oxidasa no están completamente definidas, existiendo vías que activan los dos procesos necesarios para la activación de la NADPH oxidasa, a saber: 1) la translocación de los componentes citosólicos a la membrana, y 2) la activación y translocación de RAC.

1.2.3.1. PAPEL DE LA VÍA DE FOSFATIDILINOSITOL 3-QUINASA (PI3K) EN LA ACTIVACIÓN DE LA NADPH OXIDASA

PI3K es una enzima quinasa capaz de fosforilar moléculas de fosfatidilinositol (PI) en fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) que actúa como molécula de señalización.⁷⁴

Cuando un estímulo se une a su receptor, acoplado a proteínas G triméricas, provoca en última instancia la activación de PI3K, lo que conlleva una acumulación de PI3P y la subsiguiente activación de Akt y GEFs (factores de intercambio de nucleótido de guanina). Akt fosforila a p47phox, y GEF provoca el paso de GDP a GTP en la proteína RAC. A continuación, RAC activa a p67phox, y además activa a PAK (quinasa activada por p21), que fosforila a p47phox, provocando finalmente la activación de la NADPH oxidasa⁷⁵ (Figura 10).

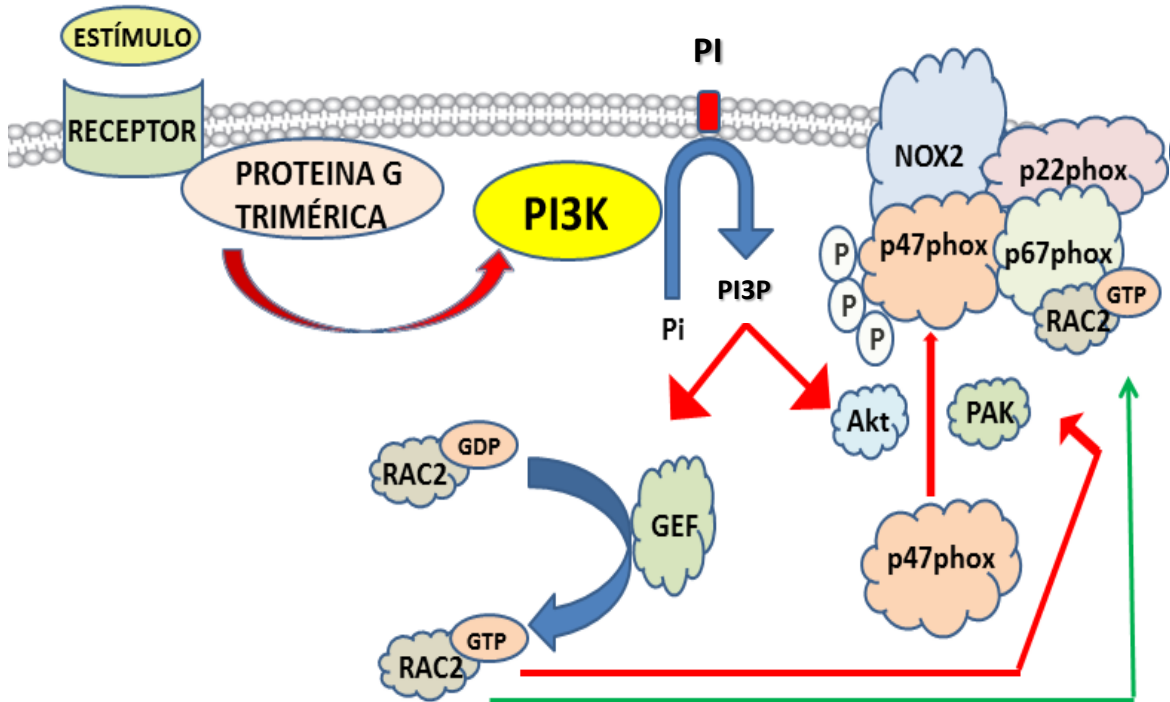


Figura 10: Mecanismo de activación de la NADPH oxidasa mediado por PI3K. Akt, proteína quinasa B; GDP, guanósín difosfato; GEF, factor de intercambio de nucleótido de guanina; GTP, guanósín trifosfato; NOX2, NADPH oxidasa 2; p22phox, citocromo b-245; p47phox, factor citosólico 1 de neutrófilos; p67phox, factor citosólico 2 de neutrófilos; PAK, quinasa activada por p21; Pi, fosfato inorgánico; PI, fosfatidil inositol; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa; PI3P, fosfatidilinositol 3-fosfato; RAC2, GTPasa.

1.2.3.2. PAPEL DE LAS PROTEÍNAS QUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENO (MAPK) EN LA ACTIVACIÓN DE LA NADPH OXIDASA

Las MAPK son proteínas involucradas en la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Dentro de esta familia de proteínas quinasas encontramos 2 grupos importantes: 1) Quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK_{1/2}), y 2) la familia proteína quinasa p38 activada por mitógeno (p38 MAPK).⁷⁶

Las quinasas ERK_{1/2} y p38 MAPK han sido también descritas como mediadoras de la activación de la NADPH oxidasa, estando involucradas en la fosforilación de los componentes citosólicos de esta enzima. Además, también son dianas para las especies reactivas de oxígeno, es decir, que pueden actuar como dianas y también como

moduladoras de éstas. Existen estudios que sugieren que ambas proteínas actúan activando a la fosfolipasa A₂ citosólica (cPLA₂). De este modo, se libera ácido araquidónico que finalmente conduce a la activación de la NADPH oxidasa⁷⁷ (Figura 11).

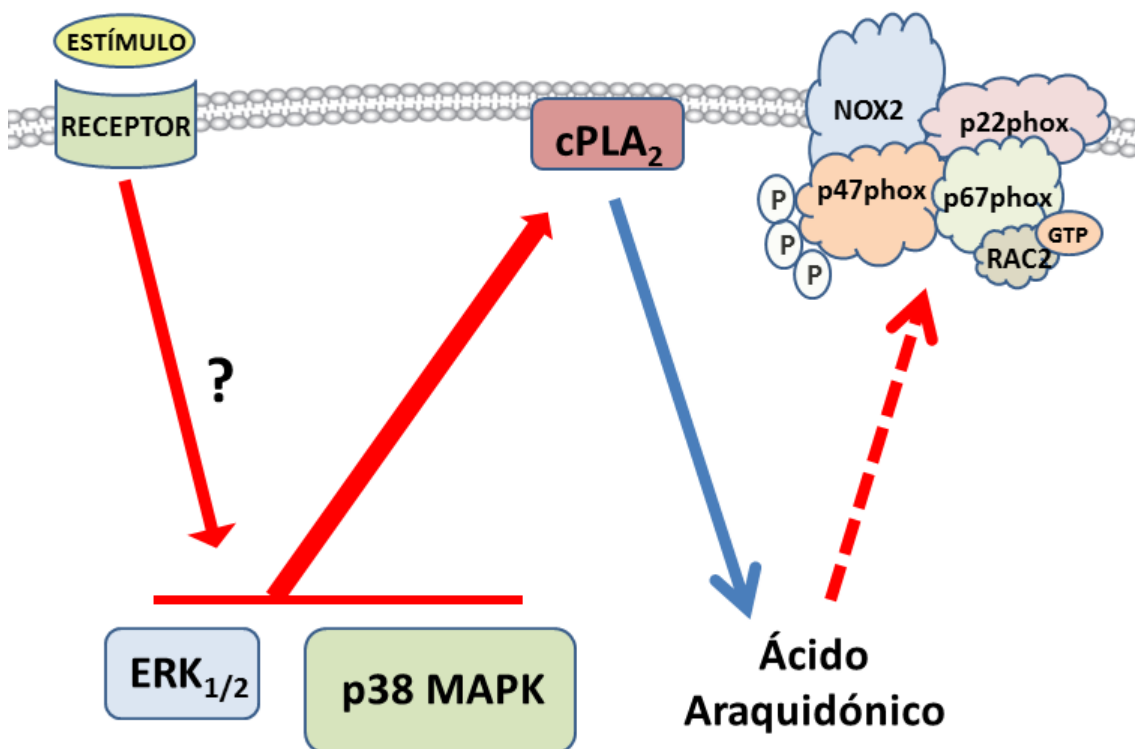


Figura 11: Mecanismo de activación de la NADPH oxidasa mediado por p38 MAPK y ERK_{1/2}. cPLA₂, fosfolipasa A₂ citosólica; ERK_{1/2}, quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2; GTP, guanósín trifosfato; NOX2, NADPH oxidasa 2; p22phox, citocromo b-245; p38 MAPK, proteína quinasa p38 activada por mitógeno; p47phox, factor citosólico 1 de neutrófilos; p67phox, factor citosólico 2 de neutrófilos; RAC2, GTPasa.

1.2.3.3. PAPEL DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC) EN LA ACTIVACIÓN DE LA NADPH OXIDASA

La proteína quinasa C (PKC) es una proteína quinasa que participa en la activación de la NADPH oxidasa, tanto en células fagocíticas como no fagocíticas, mediante la fosforilación de p47phox.⁷⁸

En la activación de la NADPH oxidasa por esta vía, la llegada del estímulo y la unión a su receptor provoca la activación de la proteína fosfolipasa C (PLC) mediada por proteínas G. Esto provoca una liberación de diacilglicerol (DAG), llevando consigo la activación de la PKC que, al igual que Akt y PAK en la vía PI3K, es capaz de fosforilar a la subunidad p47phox y activar de este modo la enzima^{75,79} (Figura 12).

La activación de las isoformas convencionales de la PKC es dependiente de calcio, estando el flujo de calcio y la PKC interrelacionados en los procesos de activación de la NADPH oxidasa. Esto es de vital importancia, ya que el calcio, junto con la PKC, activa a la pequeña GTPasa RAC (Figura 12), lo cual es imprescindible para la activación de la NADPH oxidasa, como señalamos anteriormente^{78,80} (Figura 10).

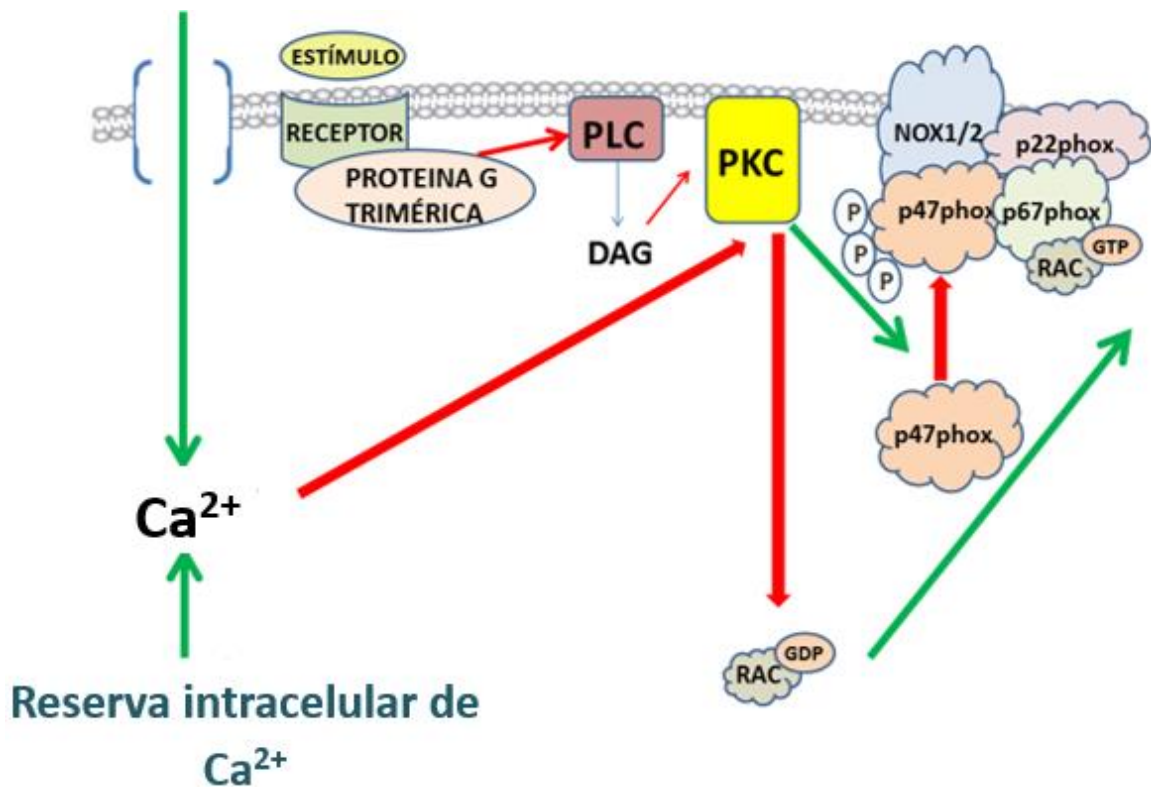


Figura 12: Mecanismo de activación de la NADPH oxidasa mediado por PKC. Ca²⁺, calcio; DAG, diacilglicerol; GDP, guanosín difosfato; GTP, guanosín trifosfato; NOX1/2, NADPH oxidasa 1/2; p22phox, citocromo b-245; p47phox, factor citosólico 1 de neutrófilos; p67phox, factor citosólico 2 de neutrófilos; PKC, proteína quinasa C; PLC, fosfolipasa C; RAC, GTPasa.

1.2.3.4. PAPEL DEL FACTOR NUCLEAR KAPPA B (NF-kB) EN LA ACTIVACIÓN DE LA NADPH OXIDASA

El factor de transcripción NF-kB es un heterodímero cuyo mecanismo de activación engloba al complejo de subunidades p50/p65. Este complejo se sitúa en el citosol, siendo regulado mediante una interacción con una familia de proteínas denominada IκB (inhibidor de kappa B). La activación por estímulos extracelulares induce la fosforilación de IκB a través de quinasas específicas. Esta fosforilación provoca rápidamente que IκB se ubiquitine y se degrade. Esta eliminación de IκB provoca que el complejo NF-kB (p50/p65) quede libre y se transloque hacia el interior del núcleo celular, participando en la modulación de la transcripción génica⁸¹ (Figura 13).

NF-kB parece estar involucrado no solo en la regulación transcripcional de los componentes de la NADPH oxidasa, ya que existen estudios que relacionan este sistema con la modulación de la actividad de la enzima. Así, en diferentes ensayos utilizando inhibidores de NF-kB, sistemas de sobreexpresión de IκB o delección del gen que codifica para la subunidad p65, se observa en todos los casos la pérdida de la actividad NADPH oxidasa. Además, el aumento en la actividad del complejo (p50/p65) es directamente proporcional a un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno.^{82,83} Todos estos estudios apoyan el papel regulador de este factor nuclear en la actividad de la enzima NADPH oxidasa.

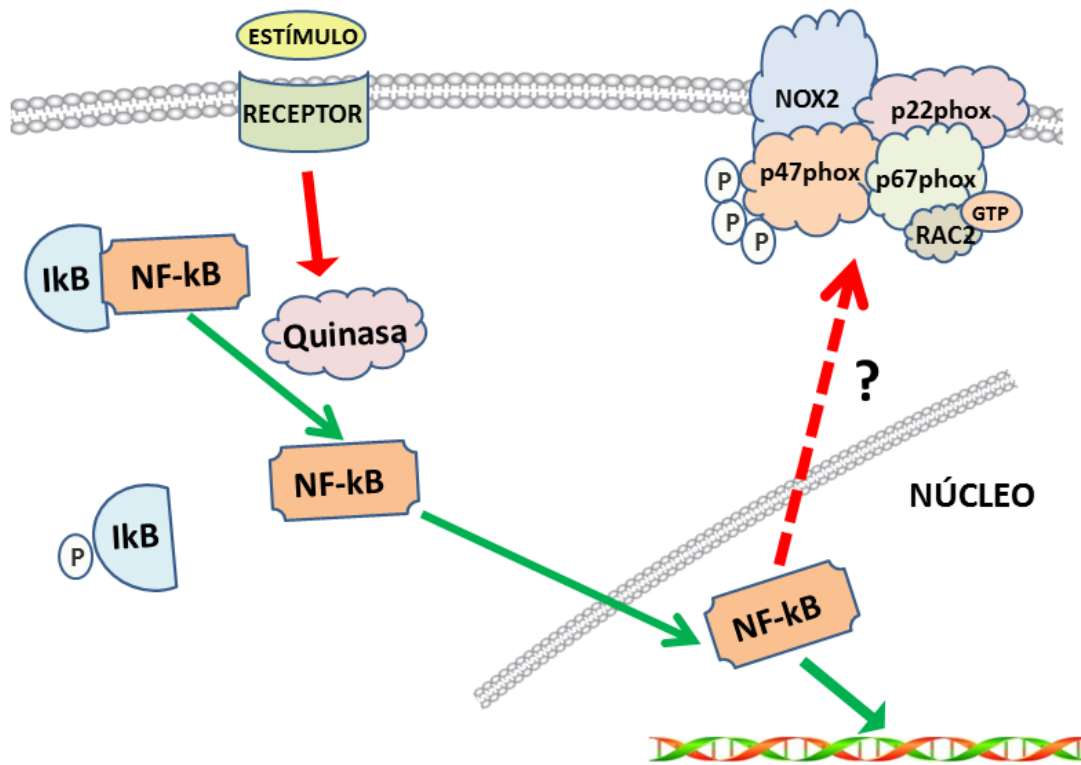


Figura 13: Mecanismo de activación de la NADPH oxidasa mediado por NF-kB. GTP, guanósín trifosfato; IκB, inhibidor de kappa B; NF-kB, factor nuclear kappa B; NOX2, NADPH oxidasa 2; p22phox, citocromo b-245; p47phox, factor citosólico 1 de neutrófilos; p67phox, factor citosólico 2 de neutrófilos; RAC2, GTPasa.

1.2.3.5. ACTIVACIÓN DE LA NADPH OXIDASA MEDIADA POR ANGIOTENSINA II

La NADPH oxidasa es activada y regulada por diversas moléculas y factores, entre ellos la Ang II. Así, la Ang II es un potente estimulador de la enzima, aumentando la producción de anión superóxido. A pesar de que el mecanismo de señalización mediante el cual la Ang II activa la NADPH oxidasa no se conoce con exactitud, parece ser que las vías de las proteínas PI3K, PKC y MAPK están involucradas.⁸⁴

Para activar a la NADPH oxidasa, la Ang II se une a su receptor AT1, que está acoplado a proteínas G, produciéndose a través de este sistema la activación de la PLC. A continuación, y como hemos visto anteriormente (Figura 12), se produce una liberación de DAG que activaría a la PKC, fosforilando y provocando la translocación de p47phox y, por

tanto, la activación de la oxidasa.^{75,85,86} Además, la estimulación de AT1 puede activar a PI3K, la cual, como ya sabemos, promueve la activación de la proteína Akt, que a su vez fosforila a p47phox^{87,88} (Figura 10). Por otro lado, la Ang II también puede activar a la proteína Src (proteína tirosina quinasa que interacciona con receptores localizados en la superficie celular, participando en vías intracelulares de transducción de señales), la cual promueve la activación de la fosfolipasa D (PLD); se libera así ácido fosfatídico (PA) que, junto con el ácido araquidónico (AA) generado por cPLA₂, interviene en la formación de leucotrienos, que son también lípidos activadores de la NADPH oxidasa (Figura 14). En la formación del AA están involucradas las proteínas ERK_{1/2} y p38 MAPK, como se indicó con anterioridad^{75,77} (Figura 11).

Teniendo en cuenta lo indicado anteriormente, parece que existe un modelo bifásico de activación de la NADPH oxidasa mediada por Ang II. En primer lugar, se produce una activación de la NADPH oxidasa mediada por PKC (1); además, la acción de las proteínas Src y EGF, junto con la actuación de PI3K provoca una fuerte activación de RAC (2), prolongándose así la generación de anión superóxido. Posteriormente, habría una segunda fase independiente de PKC, en la cual la actuación de RAC estimularía la actividad de la proteína PAK (3), sustituyendo ésta a PKC como quinasa para fosforilar a p47phox y activar consecuentemente a la enzima NADPH oxidasa⁷⁵ (Figura 14).

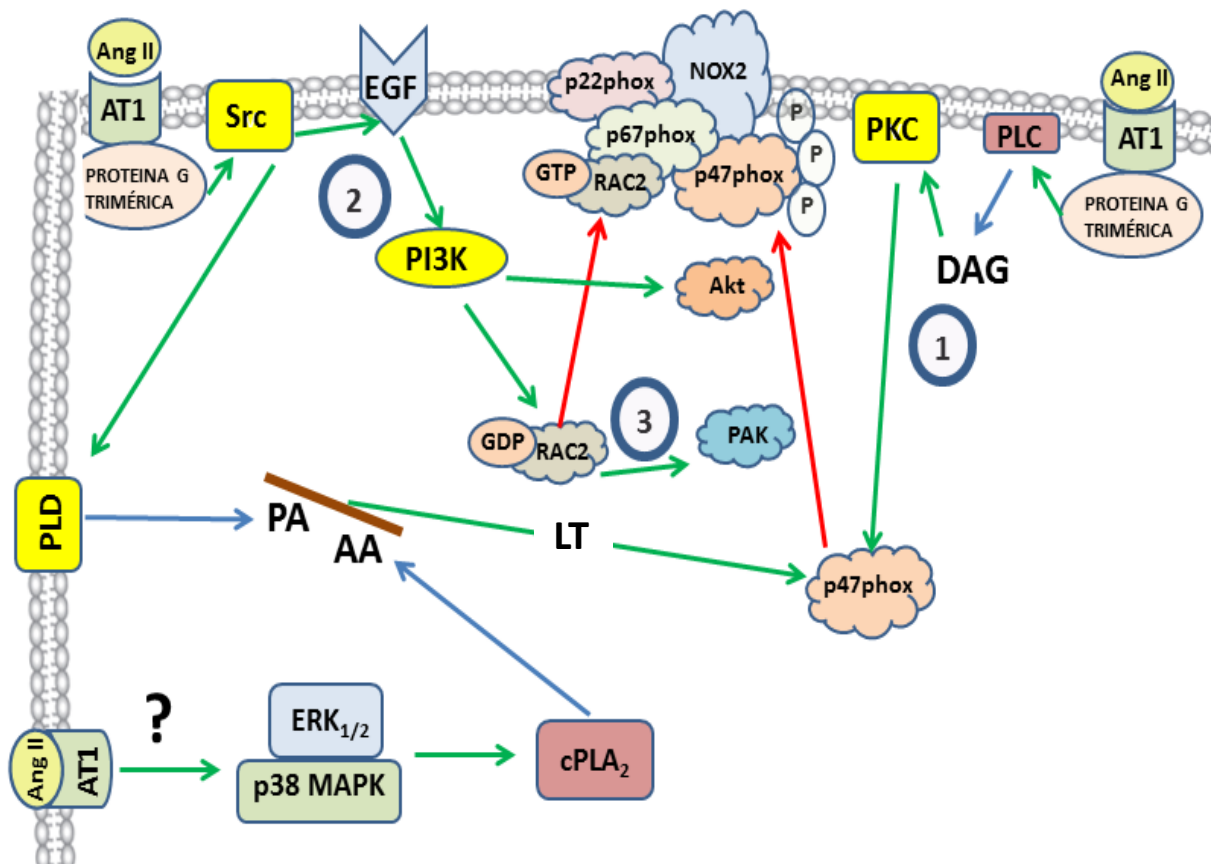


Figura 14: Mecanismo de activación de la NADPH oxidasa por angiotensina II (Ang II). AA, ácido araquidónico; Akt, proteína quinasa B; Ang II, angiotensina II; AT1, receptor de angiotensina II tipo 1; cPLA₂, fosfolipasa A₂ citosólica; DAG, diacilglicerol; EGF, Factor de crecimiento epidérmico; ERK_{1/2}, quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2; GDP, guanósín difosfato; GTP, guanósín trifosfato; NOX2, NADPH oxidasa 2; p22phox, citocromo b-245; p38 MAPK, proteína quinasa p38 activada por mitógeno; p47phox, factor citosólico 1 de neutrófilos; p67phox, factor citosólico 2 de neutrófilos; PA, ácido fosfatídico; PAK, quinasa activada por p21; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa; PKC, proteína quinasa C; PLC, fosfolipasa C; PLD, fosfolipasa D; RAC2, GTPasa; Src, tirosina quinasa Src.

1.3. FIBROSIS

1.3.1. ASPECTOS GENERALES. *EVENTOS CELULARES EN LA FIBROGÉNESIS*

La fibrosis es un proceso cicatrizante no fisiológico que se caracteriza por una deposición excesiva de matriz extracelular, produciéndose una incapacidad en la función del órgano afectado. La progresión de muchas enfermedades crónicas en órganos como el hígado, riñón, corazón y pulmón está asociada al proceso fibrótico. En concreto, la fibrosis renal se caracteriza por el desarrollo de fibrosis túbulo-intersticial, glomeruloesclerosis, infiltración inflamatoria y pérdida de parénquima renal.^{89,90}

En el desarrollo de la fibrosis tiene un papel clave el incremento crónico e inapropiado en los niveles de ciertas hormonas y citoquinas como la Ang II, el factor de crecimiento transformante beta (TGF β), la endotelina 1 (ET-1), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), ya que estas hormonas y citoquinas activan a los fibroblastos dentro del tejido conectivo, convirtiéndolos en miofibroblastos. Estos miofibroblastos expresan altos niveles de la proteína α -SMA (α -actina de músculo liso), y son responsables de la producción excesiva de matriz extracelular.

Cuando se produce una lesión, los miofibroblastos que actúan frente al daño producido no solo proceden de los fibroblastos que se encuentran en la zona lesionada, sino que otros tipos celulares también pueden transformarse en miofibroblastos. Tal es el caso de las células epiteliales, mediante un proceso denominado *transición epitelio-mesénquima* (denominada *transición endotelio-mesénquima* en el caso de las células endoteliales); la infiltración tisular de macrófagos/monocitos/células T; el reclutamiento de fibrocitos, o la transformación de pericitos y células de músculo liso vascular en fibroblastos de tejido conectivo.^{89,90}

1.3.2. FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE β (TGF β)

La superfamilia de los TGF β incluye cerca de 30 proteínas en mamíferos, incluyendo TGF β s, actininas e inhibinas, miostatina y la hormona antimulleriana entre otras. Todas ellas cumplen muchas funciones, entre las que se encuentran la participación en el desarrollo embrionario, homeostasis, quimiotaxis, control del ciclo celular y cicatrización de heridas.⁹¹

La proteína TGF β es un mediador esencial para la generación y movilización de los fibroblastos, dos procesos esenciales en el proceso fibrótico. Además, como se indicó anteriormente, el TGF β promueve la acumulación de proteínas de la matriz extracelular mediante la inducción de un cambio fenotípico en los fibroblastos, que les confiere una alta eficiencia en la producción de matriz extracelular. Además, el TGF β media la transición epitelio-mesénquima y endotelio-mesénquima. También inhibe la expresión de las denominadas metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) y estimula la expresión de inhibidores tisulares endógenos de las metaloproteinasas (TIMP)⁹², dos elementos de los que hablaremos en el apartado 1.3.3.

1.3.2.1. PROCESO DE ACTIVACIÓN DE LA VÍA DEL TGF β

Las señales intracelulares del TGF β son mediadas por el receptor de TGF β tipo 1, denominado T β RI o ALK5 (*activin linked kinase*), y por el receptor de TGF β tipo 2, llamado T β RII. El mecanismo de activación comienza cuando el TGF β se une al receptor tipo II, el cual permite que el ligando pueda interactuar con el receptor de tipo I, formándose un complejo heteromérico consistente en dos moléculas de T β RI y dos moléculas de T β RII. A continuación, T β RI/ALK5 provoca la fosforilación de Smad (*small mothers against decapentaplegic*) 2 y 3, las cuales se unen a Smad 4 y se translocan al interior del núcleo para regular la expresión génica de aquellos genes modulados por TGF β . Existen también otras proteínas Smad que son inhibitoras, como es el caso de Smad 7, que actúa regulando negativamente la señalización del TGF β (Figura 15). Smad 7 compete con Smad 2 y Smad 3 para unirse a T β RI activado, inhibiendo la fosforilación de éstas y reclutando ubiquitín-ligasas, lo que resulta en la degradación del receptor.⁹³⁻⁹⁶

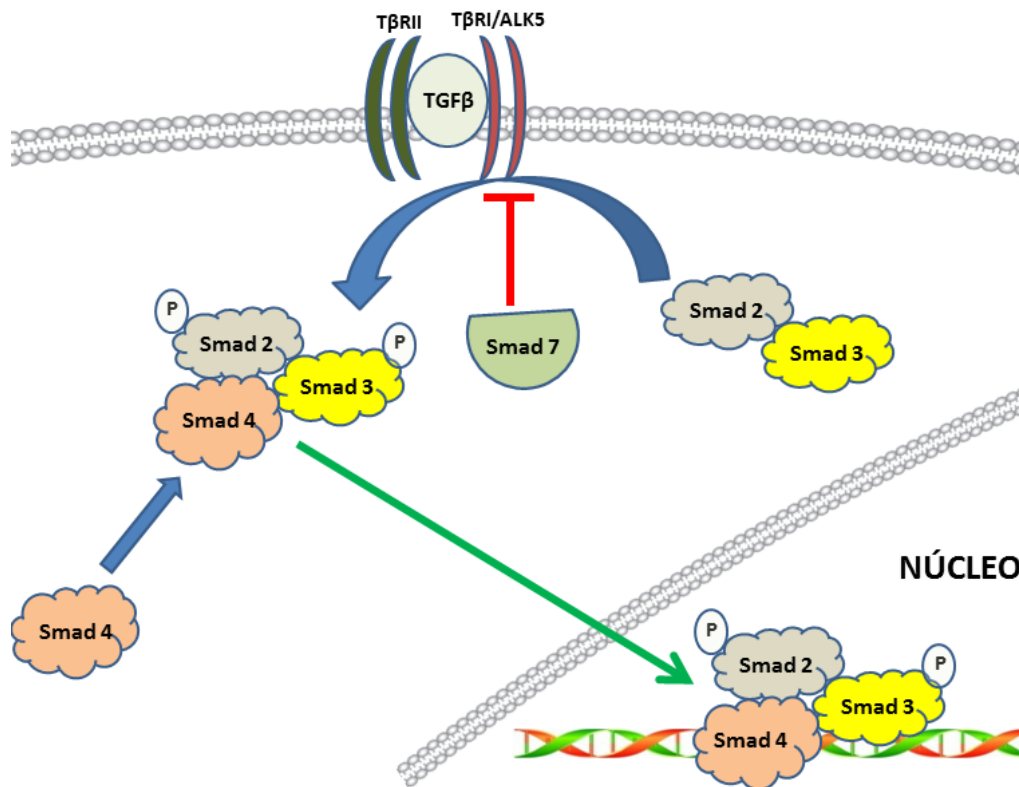


Figura 15: Activación de la vía del TGFβ dependiente de Smad. Smad 2, 3, 4 y 7, *small mothers against decapentaplegic* 2, 3, 4 y 7; TGFβ, factor de crecimiento transformante β; TβRI/ALK5, receptor de TGFβ tipo 1; TβRII, receptor de TGFβ tipo 2.

Por otro lado, existen otras vías de transducción independientes de proteínas Smad que son activadas por TGFβ. Éstas incluyen a las vías de las MAP quinasas (ERK/JNK/p38 MAPK) y PI3K. En algunos casos, estas vías podrían regular la activación de la vía Smad, pero en otros podrían inducir una respuesta no relacionada con la regulación de la expresión génica.⁹⁶

1.3.2.2. PAPEL DE LA NADPH OXIDASA EN LOS EFECTOS PROFIBRÓTICOS MEDIADOS POR TGFβ

Existen evidencias que muestran que la NADPH oxidasa está involucrada en las respuestas fibróticas mediadas por TGFβ, particularmente la isoforma NADPH oxidasa

tipo 4.⁹² Así, estudios realizados en fibroblastos cardiacos describen que NOX4 es un efector que facilita la producción de colágeno inducida por TGF β .⁹⁷ Por otro lado, también se ha descrito que NOX4 tiene un papel esencial como mediador de la activación de las Smad 2 y Smad 3, además de estar involucrada en la diferenciación de fibroblastos cardiacos a miofibroblastos inducida por TGF β .⁹⁸ Por el contrario, existe un estudio que muestra un posible papel protector de NOX4 frente a la fibrosis renal. Según los autores, la ausencia de NOX4 promovería una fibrosis renal independiente de NOX2 (a través de procesos de apoptosis de células tubulares), un descenso de la microvascularización y un aumento del estrés oxidativo.⁹⁹

En relación a NOX2, en cultivos de células mesangiales de ratas tratadas con homocisteína se produce un incremento tanto de NOX2 como de la acumulación de colágeno I; estos efectos son inhibidos en presencia de DPI (difenil-eno-iodonio, inhibidor de la NADPH oxidasa), sugiriendo un posible papel de NOX2 en esta acumulación de colágeno I.¹⁰⁰ Además, investigaciones realizadas en células epiteliales tubulares, utilizando DPI, sugieren que la NADPH oxidasa está involucrada en la producción de proteínas de la matriz extracelular y en el proceso de transición epitelio-mesénquima.⁹²

1.3.3. MATRIZ EXTRACELULAR: METALOPROTEINASAS Y PROTEÍNAS TIMP

La homeostasis de la matriz extracelular es sostenida mediante una regulación precisa llevada a cabo por una serie de enzimas denominadas metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs), así como por sus inhibidores específicos, las proteínas TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinases*).¹⁰¹

Las MMPs, también denominadas matrixinas, son proteínas que participan en la degradación de la matriz extracelular, y se clasifican en varios grupos: colagenasas (tales como MMP-1 o MMP-8), gelatinasas (MMP-2, MMP-9), estromelinas (MMP-3, MMP-10, MMP-11), matrilisinas (MMP-7, MMP-26), tipo membrana (transmembrana (MMP-14, MMP-15), ancladas a membrana (MMP-17, MMP-25)), y otras MMPs (MMP-20 (enamelinasa), MMP-12 (metaloelastasa), etc.).¹⁰²

Todas las MMPs son dependientes de Zn²⁺ y presentan otras características comunes: 1) secuencia homóloga a MMP-1 (colagenasa tipo I), 2) motivo con cisteína en

el propéptido que mantiene a las MMPs en forma zimógena, y 3) motivo de unión a Zn^{2+} en el dominio catalítico. En condiciones catalíticas, la actividad de las MMPs está fuertemente regulada: a nivel transcripcional, en la fase de activación de zimógeno, interaccionando con componentes de la matriz extracelular, y por inhibición a través de inhibidores endógenos. Una pérdida en el control de la actividad de estas proteínas puede conllevar a la aparición de muchos desordenes patológicos, entre los cuales se encuentra la generación de fibrosis.¹⁰² Se conoce que las MMP-2 y MMP-9 son de vital importancia en el proceso fibrótico, dada su actividad proteolítica frente a los componentes de la membrana basal, laminina y colágeno tipo IV.¹⁰³ Además, se ha descrito que ambas MMPs se expresan principalmente en glomérulo, túbulo proximal e intersticios renales.¹⁰⁴

Por otro lado, las proteínas TIMPs actúan como inhibidores específicos que se unen a MMPs con una estequiometría 1:1. En vertebrados, se han identificado hasta el momento 4 proteínas TIMP: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. En condiciones patológicas, los cambios en los niveles de las TIMPs pueden afectar el nivel de actividad de las MMPs.^{101,102} Así, la actividad de MMP-2 es inhibida por TIMP-2, mientras que MMP-9 se inhibe por TIMP-1 (proteína que desempeña un papel fundamental en la fibrosis intersticial que se produce en ratas SHR).^{104,105}

2. L-CARNITINA

2.1. ASPECTOS GENERALES

La L-carnitina (LC) (L-3-hidroxi-4-N,N,N-trimetilamoniobutirato) es un derivado aminoacídico (amina cuaternaria) (Figura 16) presente en la mayoría de las especies animales, microorganismos y plantas. Las concentraciones de LC en mamíferos son preservadas mediante síntesis endógena, absorción intestinal procedente de fuentes alimenticias y una reabsorción renal muy eficiente.¹⁰⁶

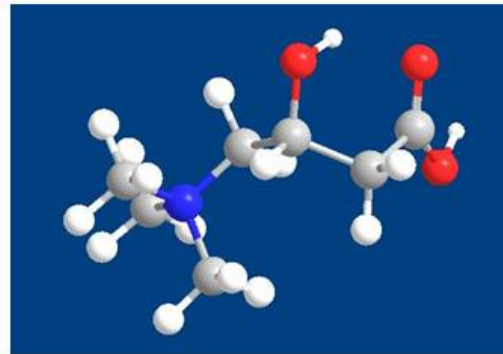
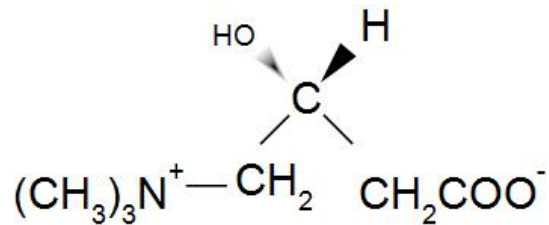


Figura 16: Estructura química de la L-carnitina

La LC se sintetiza endógenamente a partir de los aminoácidos lisina y metionina, siendo los principales lugares de síntesis el riñón, el hígado y el cerebro. Una vez sintetizada, la LC se transporta por la circulación, llegando a los tejidos a través de proteínas transportadoras denominadas *organic cation transporters novel* (OCTN). OCTN2 es el transportador de alta afinidad de LC de manera dependiente de sodio, y media la absorción intestinal y la reabsorción renal de LC para mantener su concentración en los tejidos y en la sangre circulante.¹⁰⁷

La LC cumple varias funciones de vital importancia para la célula, entre las que destacan: el ingreso de ácidos grasos de cadena larga al interior de la mitocondria desde el citosol, para su metabolización mediante el proceso de la beta-oxidación; el transporte ácidos orgánicos activados de cadena media y corta desde los peroxisomas hasta la mitocondria, para su incorporación al ciclo de Krebs; y la modulación de la ratio acetilcoenzima A/coenzima A (AcetilCoA/CoA), reduciendo los efectos tóxicos de los grupos acilos de cadena corta (p. ej., acetilo) mediante su transporte al exterior mitocondrial en forma de acetilcarnitina.^{106,108,109}

2.2. DEFICIENCIAS

Los fallos en la homeostasis de LC pueden inducir complicaciones en determinadas enfermedades y situaciones, como la diabetes mellitus, obesidad, cardiomiopatía, malnutrición y hemodiálisis, entre otras. Clásicamente, se establecen dos tipos de deficiencia de LC: primaria y secundaria.¹¹⁰

La deficiencia primaria de LC es causada por una mutación recesiva en el gen *slc22a5*, que codifica para la proteína transportadora OCTN2. La falta de actividad de OCTN2 conduce a un déficit en la reabsorción renal de LC, que resulta en una pérdida de la misma por vía urinaria. Esto hace que disminuyan los niveles plasmáticos y la acumulación intracelular de LC.¹¹¹

La deficiencia secundaria de LC cursa igualmente con un aumento en la eliminación de LC en la orina y una acumulación de ácidos orgánicos. Esta deficiencia puede ser causada por una terapia farmacológica, por desórdenes metabólicos, dieta pobre, malabsorción de LC o en pacientes sometidos a hemodiálisis, entre otros.¹¹⁰

2.3. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTIFIBRÓTICAS

2.3.1. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

Existen muchos estudios, realizados tanto en modelos celulares como animales, que muestran la capacidad de la LC para proteger a la célula frente a una lesión oxidativa. Incluso se ha descrito a la LC como una molécula capaz de neutralizar ERO como O_2^- y H_2O_2 , es decir, que podría actuar como *scavenger* de estas moléculas.¹¹² La LC parece ser un agente antioxidante efectivo frente al estado de estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana)¹¹³, y también en células de neuroblastoma y hepatocitos.¹¹⁴

También se ha demostrado que la LC protege al sistema enzimático endógeno de defensa antioxidante, incluyendo la actividad de las enzimas GPX, CAT y SOD (apartado 1.1.1); esta acción protectora se ha descrito tanto en modelos celulares, en un estudio

realizado en células tubulares proximales humanas,¹¹⁵ como en modelos animales de ratas hipertensas¹¹⁶ y en ratas tratadas con etanol.¹¹⁷

En el corazón de ratas hipertensas, la LC restablece la actividad de las enzimas antioxidantes y la capacidad antioxidante total del plasma, al tiempo que disminuye la peroxidación lipídica.¹¹⁸ Igualmente, se ha observado que la LC inhibe la generación de las ERO intracelulares y disminuye el grado de peroxidación lipídica en células HK-2 (línea celular de túbulo proximal de riñón humano) con toxicidad inducida por peróxido de hidrógeno.¹¹⁵

Por otro lado, la LC también se ha definido como una molécula cuyas propiedades antioxidantes normalizan las alteraciones del estado oxidativo asociado a la edad.^{119,120}

Nuestro grupo de investigación ha puesto de manifiesto que la actividad antioxidante de LC en ratas hipertensas está mediada por una modulación de factores de transcripción implicados en el desarrollo del estrés oxidativo, entre ellos el NF- κ B (apartado 1.2.3.4), el Nrf2 (factor relacionado al factor nuclear eritroidal 2), y el PPAR α (receptor activador de la proliferación de peroxisomas alfa), provocando de este modo una bajada en la producción de O₂⁻.¹¹⁶

2.3.2. PROPIEDADES ANTIFIBRÓTICAS

Se ha demostrado que la LC presente efectos beneficiosos frente a la fibrosis generada en diferentes patologías. En concreto, existen estudios realizados en riñón que señalan que la LC ejerce un efecto antifibrótico a través del PPAR γ en ratas hipertensas¹²¹ y también en ratas tratadas con ciclosporina (inductora de fibrosis), existiendo una supresión de la expresión de TGF β por parte de la LC.¹²²

También se ha observado un efecto antifibrótico de la LC asociado a la hipertensión arterial a nivel cardíaco.^{123,124} Igualmente, en investigaciones realizadas en ratas tratadas con tetracloruro de carbono, se observó una inhibición en la fibrosis hepática tras el tratamiento con LC.¹²⁵

Por otro lado, hay autores que muestran efectos antifibróticos de la LC derivados de su acción a nivel de los sistemas de degradación de colágeno. En concreto, en ratas

que presentaban fibrosis renal intersticial inducida por cisplatino, la LC ejerció su capacidad antifibrótica modulando la relación entre MMP-9 y TIMP-3.¹²⁶

2.4. APLICACIONES TERAPÉUTICAS

Actualmente, la administración farmacológica de la LC está 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 LC, y pérdidas de LC durante el tratamiento hemodialítico.

Además de lo anterior, existen muchos estudios que muestran los efectos beneficiosos de la LC en diferentes patologías. Así, se ha demostrado sus efectos sobre la diabetes tipo II, siendo la LC capaz de mejorar la disposición de glucosa mediada por insulina.^{127,128} En pacientes con cáncer, la suplementación con LC produce una mejora en la fatiga, depresión y calidad del sueño, manifestaciones típicas en estos enfermos.¹²⁹

Igualmente, se han demostrado los efectos beneficiosos de la LC en enfermedades neurodegenerativas. En modelos experimentales de Parkinson, en los cuales se utiliza metanfetamina para generar daño mitocondrial, la LC mejoró la fosforilación oxidativa mitocondrial y previno el aumento en los niveles de peroxinitritos inducido por la administración del fármaco¹³⁰ Los ésteres de LC, como la acetil-L-carnitina, parecen reducir la progresión de la enfermedad de Alzheimer, existiendo estudios que recomiendan la administración de LC en las fases tempranas de esta enfermedad y también en la demencia vascular.^{131,132} Otros autores proponen el uso de la LC para el tratamiento de la miopatía mitocondrial y la encefalomiopatía, un grupo de enfermedades caracterizadas por una degeneración progresiva y debilidad tanto neurológica como muscular.¹³³


Por otro lado, se ha demostrado el efecto beneficioso de la LC en la enfermedad coronaria y en la insuficiencia cardíaca y renal. La LC altera la apoptosis, el mayor determinante de la miopatía del músculo esquelético, en un modelo animal de insuficiencia cardíaca ¹³⁴. Además, hay autores que muestran que la LC protege al miocardio contra la lesión producida por la isquemia-reperusión.¹³⁵

2.5. MECANISMO DE ACCIÓN

Se han realizado algunos estudios, en diferentes contextos, para tratar de descifrar las vías de señalización por la cuales la LC o sus derivados realizan sus efectos beneficiosos. Así, el derivado de la LC de cadena corta, la acetil-L-carnitina, parece activar la vía PI3K/Akt en neuronas corticales primarias, protegiendo a estas neuronas del estrés oxidativo y neurotoxicidad provocado por 4-hidroxi-2-nonenal.¹³⁶ Otro estudio realizado en la línea celular de mioblastos L6, muestra que la acetil-L-carnitina mejora el transporte de glucosa en células estimuladas con TNF-alfa (factor de necrosis tumoral alfa) a través de una modulación de Akt.¹³⁷ Asimismo, otro derivado de cadena corta de LC, la propionil-L-carnitina, provoca en células endoteliales la activación de PI3K y Akt, induciendo la activación de la *óxido nítrico sintasa endotelial* (eNOS) y, por tanto, favoreciendo la formación de óxido nítrico.¹³⁸

También existen estudios que muestran que la LC es capaz de modular la activación de las MAP quinasas p38 MAPK y ERK_{1/2}. En estudios realizados en la línea celular GL261 (células de glioblastoma), la LC es capaz de reducir la proliferación de estas células a través de la vía de p38 MAPK.¹³⁹ En otros estudios realizados sobre fibroblastos cardiacos, la LC fue capaz de modular la fosforilación de ERK previamente inducida por Ang II.¹⁴⁰ Igualmente, otros autores muestran que la fosforilación de ERK_{1/2}, mediada por la acetil-L-carnitina y el ácido alfa-ácido lipoico, juega un papel fundamental en su acción neuroprotectora en neuronas que presentan neurotoxicidad y estrés oxidativo provocado por 4-hidroxi-2-nonenal.¹³⁶

Pese a todo lo anterior, a día de hoy no son muchos los estudios existentes que describan los mecanismos y vías de señalización por los cuales la LC ejerce sus efectos beneficiosos, por ello esta tesis doctoral pretende discernir dichos procesos en un contexto de estrés oxidativo y fibrosis, en el cual la enzima NADPH oxidasa tiene vital importancia.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

Nuestro grupo de investigación ha demostrado previamente los efectos antioxidantes y antifibróticos de la L-carnitina (LC) en modelos animales con hipertensión arterial (HTA) y fibrosis (cardiaca y renal), estando la enzima NADPH oxidasa involucrada en estos efectos beneficiosos de la LC.^{116,121,123} Resulta de gran interés determinar cómo modula la LC las diferentes isoformas de la NADPH oxidasa, y qué vías de señalización celular están implicadas al respecto. Nuestra hipótesis de trabajo es que la LC modula la actividad/expresión de la NADPH oxidasa en un contexto de HTA y fibrosis (con un aumento de estrés oxidativo subyacente), actuando de forma específica sobre una o varias isoformas y regulando las vías de señalización intracelular responsables de las acciones patológicas de la enzima.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis doctoral es demostrar el papel de la NADPH oxidasa en el efecto modulador de la L-carnitina (LC) en un modelo *in vitro* de nefropatía hipertensiva (creando un fenotipo hipertensivo y otro fibrótico mediante la estimulación de células NRK-52E con angiotensina II (Ang II) y factor de crecimiento transformante beta (TGFβ), respectivamente), evaluando las vías de señalización implicadas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estudiar los efectos de la Ang II y de la LC sobre la actividad/expresión de la enzima NADPH oxidasa, los niveles de nitrosilación de proteínas (marcador de estrés oxidativo) y la producción de peróxido de hidrógeno.
- 2) Identificar las isoformas de la NADPH oxidasa involucradas en su acción oxidante sobre las células NRK-52E, mediante el uso de inhibidores moléculas de interferencia (siRNA) específicos.

- 3) Estudiar los mecanismos moleculares y vías de señalización intracelular implicados en los efectos de la Ang II y de la LC: vía de PI3K/Akt, vía de la PKC, vía de p38 MAPK, vía de ERK1/2 y sistema NF- κ B.
- 4) Evaluar los efectos de la LC sobre la actividad y expresión de la NADPH oxidasa inducidas por TGF β .
- 5) Estudiar los efectos de la LC sobre la activación de la vía de las proteínas Smad y sobre la expresión de CTGF dependientes de TGF β .
- 6) Analizar los efectos de la LC sobre el sistema de degradación de colágeno, realizando para ello experimentos tanto *in vivo* e *in vitro*.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

1.1. ASPECTOS GENERALES DE LOS CULTIVOS CELULARES

El cultivo celular es una técnica muy utilizada actualmente en investigación, ya que permite el manejo de células bajo unas condiciones controladas, así como una aproximación *in vitro* a sistemas y estudios que presentan muchas dificultades bajo condiciones *in vivo*. De este modo, se puede controlar de forma precisa el ambiente en el cual vive la célula (pH, temperatura, etc.) y se obtiene mayor homogeneidad en los resultados, ya que el cultivo celular permite obtener con facilidad un número elevado de réplicas semejantes entre sí, siendo esto una gran ventaja frente a la heterogeneidad de las muestras inherente al uso de modelos animales.

En función del origen, existen dos tipos de cultivos celulares: los cultivos primarios y las líneas celulares. En el primer caso, las células se obtienen a partir de tejidos extraídos de un organismo vivo, y su fenotipo solo se mantiene durante un número limitado de pases. Por el contrario, las líneas celulares mantienen su fenotipo de manera prolongada, ya que presentan alteraciones genéticas que las hacen inmortales.

1.2. LÍNEA CELULAR NRK-52E

Para realizar los experimentos de esta tesis doctoral, se ha utilizado la línea celular NRK-52E (Figura 17), cedida desinteresadamente por la Dra. Ana Fortuño (Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Universidad de Navarra), y originalmente obtenida de la *American Type Culture Collection* (ATCC). Esta línea celular corresponde a células epiteliales renales de túbulo proximal de rata (ATCC® CRL-1571™), siendo células adherentes con un crecimiento en monocapa.

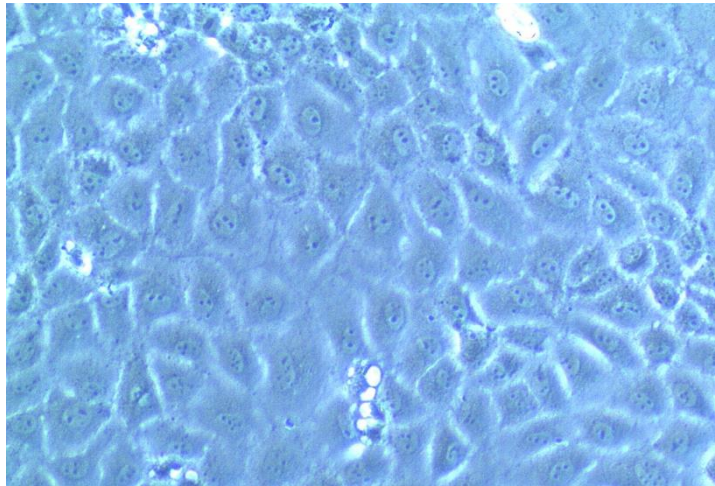


Figura 17: Línea celular NRK-52E (ATCC® CRL-1571™). Células epiteliales de túbulo proximal de riñón de rata.

1.2.1. CULTIVO Y MANTENIMIENTO

1.2.1.1. MEDIOS DE CULTIVO

a) MEDIO COMPLETO

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 1X con 4,5 g/L de glucosa, L-glutamina, rojo fenol y piruvato sódico.
- Suero fetal bovino (SFB) al 10% v/v.
- Antibiótico (penicilina-estreptomina) al 1% v/v.

b) MEDIO MÍNIMO

- DMEM 1X con 4,5 g/L de glucosa, L-glutamina, rojo fenol y piruvato sódico.
- SFB al 0,5% v/v.
- Antibiótico (penicilina-estreptomina) al 1% v/v.

c) MEDIO DE CONGELACIÓN

- DMEM 1X con 4,5 g/L de glucosa, L-glutamina, rojo fenol y piruvato sódico.
- SFB al 20% v/v.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% v/v.
- Antibiótico (penicilina-estreptomicina) al 1% v/v.

1.2.1.2. DESCONGELACIÓN

Los viales de congelación con células de la línea NRK-52E se conservan en nitrógeno líquido hasta su utilización. Para la descongelación de un vial, éste se pasa del nitrógeno líquido a un baño a 37°C, y se incuba durante 2 minutos. A continuación, en una campana de flujo laminar, el contenido del vial se transfiere a un tubo de polipropileno y se añaden 9 mL de medio completo. Se centrifuga a 2000 g durante 5 minutos, descartándose el sobrenadante y resuspendiéndose suavemente el sedimento (*pellet*) de células con medio completo. Tras esto, se transfiere la suspensión resultante a un frasco de 75 cm², el cual se incuba a 37°C y bajo un 5% de CO₂, tal y como se indica a continuación. El cultivo celular alcanza normalmente una confluencia del 100% después de 48 horas.

1.2.1.3. MANTENIMIENTO

El mantenimiento de las células NRK-52E se realiza en un incubador con una humedad relativa del 95% a 37°C, en una atmósfera con un 5% de CO₂. Todas las manipulaciones de los cultivos celulares se realizan en el interior de una campana de flujo laminar (modelo Bio IIA, TELSTAR) y en condiciones asépticas, para evitar la contaminación; para ello, la zona de trabajo se rocía continuamente con etanol de 70%, y se emplea material fungible estéril de un solo uso.

1.2.1.4. TRIPSINIZACIÓN

Este proceso se aplica a los frascos de cultivo para mantener la viabilidad de las células cuando éstas alcanzan confluencia. Para realizar este proceso, primero se retira el medio de cultivo y se realizan dos lavados con *Dulbecco's phosphate buffered saline*

(DPBS) 1X. Posteriormente, se añade Tripsina-EDTA 1X, y se incuba durante 4 minutos a 37°C. Tras comprobar al microscopio óptico la separación total de las células de la superficie de cultivo, se añade medio de cultivo completo para inactivar la tripsina. Las células despegadas se recogen y son contadas en una cámara de Neubauer. Dependiendo del experimento a realizar, se siembran en placas de cultivo con 6/12 pocillos (para la posterior obtención de ARN), en frascos de 25 cm² (para obtención de proteínas) o en frascos de 75 cm² (para el mantenimiento celular).

1.2.1.5. CONGELACIÓN

El procedimiento de congelación se inicia en frascos de 75 cm², cuando las células están confluentes. Se procede a la tripsinización y centrifugación a 2000 g durante 5 minutos a 4°C, para posteriormente retirar el sobrenadante y resuspender el *pellet* de células en 1 mL de medio de congelación. Finalmente, la suspensión se introduce en un criotubo y se congela a -80°C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, los criotubos se trasladan a un contenedor de nitrógeno líquido. Este proceso permite mantener la viabilidad de las células hasta nuevo uso, momento en el que se descongelará el criotubo y se procesarán las células según el procedimiento descrito anteriormente.

1.2.2. INCUBACIÓN CON ANG II/TGFβ Y LC: EXPERIMENTO PROTOTIPO

Para el tratamiento de los cultivos, las células se incuban en medio mínimo a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas, lo que permite que todas queden en la misma fase del ciclo celular y no se dividan.

Transcurridas las 24 horas en medio mínimo, se procede a la estimulación con Ang II o TGFβ (en función del experimento a realizar), y LC. Se establecen 4 grupos de estudio: 1) células incubadas en medio mínimo, como grupo control (grupo que denominamos como C en la sección de Resultados); 2) células incubadas en medio mínimo con LC (1 mM) (grupo LC); 3) células incubadas en medio mínimo con Ang II (10⁻⁷ M) (grupo Ang II) o, en su caso, TGFβ (10 ng/mL) (grupo TGFβ); y 4) células incubadas en medio mínimo con una estimulación mixta con Ang II más LC (grupo ALC) o, en su caso, TGFβ más LC (TLC). Tras el tiempo de estimulación estipulado (indicado en cada caso), se retiran los medios y se procesan las células de cada grupo para realizar posteriormente los

experimentos programados. En todos los casos en los cuales se añade LC, ésta se aplica como “pretratamiento”, es decir, 30 minutos antes de la adición de la Ang II o del TGF β .

Estas condiciones generales se corresponden con la mayoría de los experimentos programados; no obstante, existen algunas modificaciones (que se especifican en los correspondientes apartados) para la realización de estudios preparatorios de concentración-respuesta y tiempo-respuesta para la puesta a punto de las estimulaciones en los diferentes contextos.

1.2.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

1.2.3.1. ANÁLISIS EN MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo se utiliza para la determinación de H₂O₂ en los distintos grupos. Así, al finalizar las estimulaciones, se recoge el medio de cultivo y se centrifuga a 2000 g para precipitar las células muertas que están en suspensión. El medio libre de células se conserva entonces a -80°C hasta que se proceda a la medida de H₂O₂.

1.2.3.2. OBTENCIÓN DE ARN Y PROTEÍNAS

Para la obtención de proteínas celulares, se procede al lavado del cultivo con DPBS 1X y posterior raspado con el mismo medio para la separación de las células, centrifugando a 2000 g y resuspendiendo en tampón sacarosa (Tabla 1) el *pellet* obtenido. El homogeneizado resultante se congela a -80°C durante un mínimo de 30 minutos para favorecer la rotura celular y permitir la liberación de las proteínas intracelulares, cuya concentración se determina siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.1. El tampón sacarosa se prepara suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas y, en el caso de los estudios de fosforilación, con un cóctel de inhibidores de fosfatasa.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
<i>Sacarosa</i>	<i>150 mM</i>
<i>EGTA</i>	<i>1 mM</i>
<i>KH₂PO₄</i>	<i>50 mM</i>

Tabla 1: Composición del tampón sacarosa

Para la obtención de ARN, se añade directamente TRIzol® a las células en cultivo, y se procede a aislar el ARN según el protocolo establecido por la casa comercial (apartado 3.5.1).

2. MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

2.1. ANIMALES Y TRATAMIENTOS

Los estudios *in vivo* se han realizado en ratas macho pertenecientes a la cepa Wistar, con una edad comprendida entre las 8-10 semanas y procedentes del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla. Todos los procedimientos cumplen con la normativa en vigor a nivel internacional, nacional y autonómico relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos¹.

Las ratas fueron divididas aleatoriamente en 4 grupos experimentales: 1) ratas control (grupo C); 2) ratas tratadas con 400 mg de L-carnitina/kg de peso/día (grupo LC); 3) ratas tratadas con 25 mg de L-NAME²/kg de peso/día (grupo LN); y 4) ratas tratadas simultáneamente con L-NAME y LC (grupo LNLC). Los tratamientos con LC se mantuvieron 12 semanas, mientras que el tratamiento con L-NAME comenzó dos semanas más tarde que el de LC, manteniéndose por tanto durante 10 semanas. Durante el periodo experimental, los animales se mantuvieron en condiciones estándar ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclos de 12 horas luz/12 horas oscuridad), y se alimentaron *ad libitum* con pienso comercial (Panlab, S.L.) y con libre acceso al agua de bebida (en la cual iba disuelto el tratamiento, en su caso).

¹ Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010; en la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio; Ley 6/2013, de 11 de junio, de modificación de la Ley 32/2007; Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia; y normativa autonómica de desarrollo del RD 53/2013.

² Compuesto que produce vasoconstricción gracias a la inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), con la consecuente disminución en la síntesis de óxido nítrico (NO), siendo éste una de las principales sustancias vasodilatadoras del organismo.

2.2. PROCESADO DE LAS MUESTRAS

Tras las 12 semanas de tratamiento, las ratas se someten a un ayuno de 12 horas, tras lo cual son anestesiadas con pentorbital (50 mg/kg i.p.). Una vez sacrificados los animales, se extraen los riñones, eliminándose la cápsula externa con ayuda de dos pinzas. Los riñones se lavan en suero fisiológico frío (NaCl 0,9% p/v, 4°C), se secan en papel de filtro y se disecciona la corteza renal, separándola de la médula renal. La corteza se congela por inmersión en nitrógeno líquido, y se conserva a -80°C hasta la realización de los estudios de expresión génica.

3. TÉCNICAS MOLECULARES

3.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas en los homogeneizados de cultivo celular de NRK-52E, obtenidos según se describe en el apartado 1.2.3.2, se ha determinado siguiendo el método descrito por Bradford,¹⁴¹ utilizando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* con un patrón de γ -globulina. El método se basa en la reacción de las proteínas con este reactivo, resultando un complejo coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas de la muestra.

La técnica consiste en incubar, en una microplaca ELISA, 5 μ L de los homogeneizados (previamente diluidos en agua bidestilada), o del patrón de γ -globulina (con diferentes diluciones establecidas para preparar una curva patrón a partir de una solución madre de 1,47 μ g/ μ L), con 250 μ L del reactivo *Bio-Rad* (el cual se diluye con agua bidestilada y se filtra a través de un papel Whatman n°1 justo antes de su uso), durante 10 minutos a temperatura ambiente, agitándose al inicio y al final de este periodo con ayuda de un agitador de placas. Las muestras se ensayan por triplicado, y los estándares por duplicado. Transcurrido este tiempo, se leen las absorbancias a 595 nm en un lector de placas (ASYS UVM340). Finalmente, a partir de los valores de absorbancia obtenidos de cada muestra, se calculan las correspondientes concentraciones mediante interpolación en la curva patrón.

3.2. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO

Se utiliza una técnica basada en un proceso de quimioluminiscencia, en el cual el anión superóxido (producto de la reacción catalizada por la enzima NADPH oxidasa) oxida a moléculas de lucigenina, en una reacción que libera fotones de luz que son registrados en un luminómetro de tubo (*BERTHOLD Junior LB 9509*).

En un tubo de poliestireno para luminómetro, se añaden, por duplicado, 10 μL de muestra (convenientemente diluida con DPBS 1X para que estos 10 μL sean equivalentes a 5 μg de proteínas totales); en el otro extremo del tubo, sin mezclarlo con la muestra, se añaden 10 μL de NADPH 3 mM (disuelto en DPBS 1X). Por último, se añaden 280 μL de lucigenina 5,3 μM (disuelta en DPBS 1X y protegida de la luz). La adición de este último reactivo permite la mezcla de todos los componentes y, por tanto, el inicio de la reacción (la cual se lleva a cabo a 37°C). Se toman medidas de URL (unidades relativas de luz) en el luminómetro a los 4 minutos de iniciada la reacción.

3.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS FUENTES CELULARES DE ANIÓN SUPERÓXIDO

La participación de las diferentes fuentes enzimáticas productoras de anión superóxido en los homogeneizados proteicos de células NRK-52E, se ha analizado, siguiendo el protocolo que acabamos de describir, en presencia y ausencia de inhibidores específicos de dichas fuentes, a saber: difenil-eno-iodonio (DPI), rotenona y oxipurinol. El DPI es un inhibidor de la producción de especies reactivas de oxígeno por el conjunto de las flavoproteínas celulares. La rotenona actúa inhibiendo la cadena mitocondrial de electrones, mientras que el oxipurinol inhibe a la enzima xantina oxidasa. Todos los inhibidores se preincuban (a una concentración de 0,1 mM) con la muestra durante 5 minutos a 37°C.

Por otro lado, también se analiza el efecto de la enzima superóxido dismutasa (SOD) sobre la producción de anión superóxido en estos homogeneizados proteicos (la determinación se realiza en las mismas condiciones anteriores, preincubando en este caso las muestras con 100 U/mL de SOD). La SOD es una enzima que convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno (apartado 1.1.1 de la sección Introducción), que no tiene ninguna reactividad con la lucigenina; esto permite confirmar la especificidad del método, descartándose que las lecturas del luminómetro correspondan a otra especie reactiva de oxígeno diferente al anión superóxido.

3.2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULARES INVOLUCRADAS EN LA FORMACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO

El estudio de las vías de señalización intracelulares que participan en la producción de $O_2^{\cdot-}$, se realiza siguiendo el mismo protocolo descrito, en presencia y ausencia en este caso de inhibidores específicos de diferentes vías de señalización. En concreto, se ha utilizado wortmanina (inhibidor de la vía PI3K/Akt), SB203580 (inhibidor de p38 MAPK), PD98059 (inhibidor de MEK-1 (vía ERK_{1/2})) y bisindolilmaleimida I (BIS I, inhibidor de PKC), a una concentración de 1 μ M en todos los casos. Las células se preincubaban durante 1 minuto a 37°C con estos inhibidores, adicionándose a continuación Ang II y/o LC según lo descrito en el apartado 1.2.2.

3.2.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE LA NADPH OXIDASA INVOLUCRADAS EN LA FORMACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO

Para llevar a cabo este experimento, se han utilizado inhibidores específicos de las isoformas NOX2 (gp91 ds-tat), y NOX1 (2-acetilfenotiazina), ambos a una concentración de 50 μ M. Las células se preincubaban durante 30 minutos a 37°C con estos inhibidores, adicionándose a continuación Ang II y/o LC según lo descrito en el apartado 1.2.2.

3.3. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

En este ensayo, el rojo neutro es captado por las células, específicamente por los lisosomas y endosomas. A medida que las células pierden viabilidad por acción de la molécula en estudio (en nuestro caso la LC), el colorante se libera al medio ya que solo las células viables son capaces de retener el colorante en su interior, midiéndose la cantidad de rojo neutro que permanece dentro de las células tras la exposición a LC.

3.3.1. REACTIVOS

- a) Disolución madre de rojo neutro. 0,1 gramos de rojo neutro en 10 mL de DPBS 1X.
- b) Disolución de trabajo de rojo neutro. 100 μ L de disolución madre de rojo neutro por cada 10 mL de medio de cultivo.
- c) Ácido acético:etanol:agua (1:49:50).

d) Formol-Ca²⁺. 50 mM de CaCl₂ en 500 mL de agua destilada y autoclavada. Una vez disuelto, añadir 14 mL de formaldehído (35%).

3.3.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

En primer lugar, se centrifuga la disolución de trabajo de rojo neutro durante 10 minutos a 400 g. Las células se siembran en placas de 96 pocillos (35.000 células/cm², con objeto de que a las 24 horas estén confluentes), estimulándose con LC (0-5-100 mM) durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se retira el medio de cultivo y se añaden en cada pocillo 100 µL de disolución de trabajo de rojo neutro, incubándose durante 3 horas a 37°C (al microscopio, se deben observar las células teñidas y la ausencia de cristales en el pocillo). Pasadas las 3 horas, se retira la solución de trabajo de rojo neutro volcando la placa, y a continuación se fijan las células con 200 µL de formol-Ca²⁺ durante 2 minutos. Se retira entonces la solución de formol-Ca²⁺, y se añaden 200 µL de la solución de ácido acético/etanol/agua para extraer el colorante de las células. Tras incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente, en un agitador orbital de placas, se lee finalmente la absorbancia a 540 nm. Los resultados se expresan en % con respecto a la absorbancia medida en las células controles, de forma que a mayor absorbancia, mayor viabilidad celular.

3.4. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

3.4.1. REACTIVOS

El kit utilizado, *Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit*, utiliza el reactivo *Amplex[®] Red* (10-acetil-3,7-dihidroxyfenoxazina) para detectar peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa, el *Amplex[®] Red* reacciona con H₂O₂ con una estequiometría 1:1, originando un producto rojo fluorescente, la resorufina. Ésta tiene una excitación y emisión máximas a 571 nm y 585 nm, respectivamente, y posee un coeficiente de extinción alto (58000 ± 5000 cm⁻¹ M⁻¹), por lo que se puede realizar el ensayo mediante fluorescencia o espectrofotometría.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
<i>Amplex® Red</i>	10 mM
<i>Tampón de reacción</i>	1X
<i>Horseradish peroxidase (HRP)</i>	10 U/mL
<i>Peróxido de hidrógeno</i>	20 mM
<i>DMSO</i>	

Tabla 2: Reactivos necesarios para la determinación de peróxido de hidrógeno

3.4.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

En primer lugar, se prepara una curva estándar diluyendo la solución de trabajo de H_2O_2 (20 mM) en tampón de reacción 1X hasta obtener concentraciones desde 0 a 10 μM de H_2O_2 . A continuación, se diluyen las muestras (dilución 1/2), (obtenidas según se describe en el apartado 1.2.3.1) en tampón de reacción 1X, y se cargan 50 μL de las muestras o estándares (por triplicado en ambos casos) en pocillos de una placa ELISA.

Por otro lado, se mezclan 50 μL de *Amplex® Red* 10 mM (diluido extemporáneamente en DMSO), 100 μL de HRP 10 U/mL y 4,85 mL de tampón de reacción 1X, para obtener la solución de trabajo de 100 μM de *Amplex® Red* y 0,2 U/mL de HRP. Se añade 50 μL de la solución de trabajo a las muestras o estándares, y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. A continuación, se procede a medir la absorbancia a 560 nm, expresándose los resultados obtenidos en μM de H_2O_2 .

3.5. CUANTIFICACIÓN DEL ARNm

3.5.1. EXTRACCIÓN DE ARN

El método clásico de extracción de ARN se basa en la diferente solubilidad de las biomoléculas (ARN, ADN, proteínas y lípidos) en disolventes orgánicos (tales como 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 enzimas ribonucleasas (ARNasas).

Se añade 1 mL de TRIzol® en los frascos o placas de cultivo, pasando inmediatamente a recuperar este volumen en tubos de 2 mL de capacidad, los cuales se dejan reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se añaden 200 μL

de cloroformo, se agita vigorosamente y se deja reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realiza una centrifugación a 12000 g durante 15 minutos a 4°C, para la separación de las distintas fases. Se recupera cuidadosamente la fase acuosa superior, que contiene el ARN, y se deposita en el interior de microtubos de 1,5 mL de capacidad. A continuación, se añaden 500 µL de isopropanol, mezclando por inversión, y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se centrifuga a 12000 g durante 10 minutos a 4°C. Se elimina el sobrenadante, y se lava el precipitado de ARN con 1 mL de etanol al 75%, agitando en un agitador de tubos tipo vórtex durante 20 segundos. El precipitado de ARN se recupera centrifugando a 8000 g durante 5 minutos a 4°C, y eliminando de nuevo el sobrenadante. Se deja secar el ARN bajo la luz de un flexo que aporte el calor necesario para evaporar completamente los restos de etanol. Una vez seco el precipitado de ARN, se añaden 35 µL de agua estéril y libre de ARNasas (H₂O-DEPC), y se deja 10 minutos a temperatura ambiente, resuspendiéndose finalmente con ayuda de una micropipeta automática.

3.5.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN E INTEGRIDAD DEL ARN

La concentración del ARN se ha medido por espectrofotometría ultravioleta con el espectrofotómetro *NANODROP 2000 UV-Vis* (Thermo Scientific), empleando 1 µL de volumen de muestra. Los ácidos nucleicos absorben a 260 nm, por lo que midiendo a esta longitud de onda obtenemos la concentración del ARN (según la aproximación: 1 unidad de absorbancia = 40 µg/mL de ARN). Teniendo en cuenta que las proteínas absorben a 280 nm, también se calcula la relación A_{260}/A_{280} para conocer el grado de pureza, debiéndose obtener un valor cercano a 2.

Por otro lado, hay que comprobar la integridad del ARN para asegurar que no ha sufrido degradación durante su extracción. Para ello, se realiza una electroforesis en gel de agarosa al 2% previo marcaje con bromuro de etidio, el cual permite la visualización del ARN bajo una fuente de luz ultravioleta. Si el ARN no está degradado, se deben observar dos bandas que corresponden con los ARN ribosómicos 28s y 18s.

3.5.3. RETROTRANSCRIPCIÓN

La retrotranscripción es el mecanismo por el cual se obtiene, tomando ARN como molde, una molécula de ADN denominada ADN complementario (ADNc). Para llevar a cabo este procedimiento, se ha utilizado un kit suministrado por Applied Biosystems (*High-Capacity cDNA Archive kit*). De cada muestra se toman volúmenes equivalentes a 2 µg de ARN en tubos libres de ARNasas, añadiendo H₂O-DEPC hasta completar un volumen de 50 µL en cada tubo. A continuación, se desnaturaliza el ARN calentando durante 10 minutos a 65°C, utilizando un termociclador (*Biometra® T Gradient*). Se aprovecha este tiempo para preparar la mezcla de reacción que se compone de: Tampón RT 10X, *Random primers* 10X, mezcla de desoxinucleótidos 25X, *Multiscribe™ RT* (50 U/µL) y H₂O-DEPC. Transcurrido el tiempo, se colocan los tubos inmediatamente a 4°C para evitar la renaturalización del ARN. Finalmente, a cada tubo de ARN se añaden 50 µL de la mezcla reactiva, y se llevan al termociclador, el cual tiene programadas unas condiciones de retrotranscripción previamente establecidas (en nuestro caso, 10 minutos a 25°C seguidos de 2 horas a 37°C).

3.5.4. 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), ubicado en el Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (*CITIUS*), 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 como el *SYBR® Green I*.

COMPONENTES DE LA REACCIÓN	CONCENTRACIÓN/CANTIDAD	VOLUMEN (µL)
<i>FastStart SYBR® Green Master</i>	2X	10
<i>Cebadores específicos (sentido y antisentido)</i>	300 nM	0,6 (por cada cebador)
<i>Agua bidestilada autoclavada</i>		7,8

Tabla 3: Componentes de la mezcla de reacción

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

CEBADOR	SECUENCIA SENTIDO (5'-3')	SECUENCIA ANTISENTIDO (5'-3')
<i>NOX1</i>	<i>TTCACCAATTCCCAGGATTGAAGTGGATGGTC</i>	<i>GACCTGTCACGATGTCAGTGGCCTTGCAA</i>
<i>NOX2</i>	<i>CCCTTTGGTACAGCCAGTGAAGAT</i>	<i>CAATCCCACGTCCCACTAACATCA</i>
<i>NOX4</i>	<i>TTGCTTTTGTATCTTC</i>	<i>CTTACCTTCGTACAG</i>
<i>CTGF</i>	<i>TAGCAAGAGCTGGGTGTGTG</i>	<i>TTCACTTGCCACAAGCTGTC</i>
<i>MMP-9</i>	<i>TCGAAGGCGACCTCAAGTG</i>	<i>TTCGGTGTAGCTTTGGATCCA</i>
<i>TIMP-1</i>	<i>CGCAGCGAGGAGGTTTCTCAT</i>	<i>GGCAGTGATGTGCAAATTTCC</i>
<i>GADPH</i>	<i>GCCAAAAGGGTCATCATCTCCGC</i>	<i>GGATGACCTTGCCACAGCCTTG</i>

Tabla 4: Cebadores utilizados en los estudios de PCR a tiempo real

Una vez preparada la mezcla de reacción según la tabla 3, se añaden 19 μ L de ésta a cada pocillo de la placa de 96 pocillos, y tras ello 1 μ L de ADNc (por duplicado). Una vez cargada la placa, se introduce en el termociclador, que se programa tal y como se indica en la tabla 5.

PROCESO	CONDICIONES	CICLOS
<i>Activación SYBR® Green I</i>	<i>50 °C, 2 minutos</i>	
<i>Desnaturalización inicial</i>	<i>95 °C, 10 minutos</i>	
<i>Desnaturalización</i>	<i>95 °C, 15 segundos</i>	40
<i>Hibridación/elongación</i>	<i>60 °C, 1 minuto</i>	

Tabla 5: Condiciones experimentales del termociclador para la realización de una PCR a tiempo real

Para el análisis cuantitativo de los productos de la PCR, se ha empleado un método de cuantificación relativo, expresando cada gen de estudio 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$. “ C_t ” 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 ADN.

3.6. WESTERN BLOTTING

La técnica de *Western blotting* permite la separación de proteínas según su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), y su identificación gracias al empleo de anticuerpos específicos.

3.6.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se mezclan volúmenes iguales de los homogeneizados proteicos de las células NRK-52E (equivalentes a la cantidad de proteína previamente optimizada para la determinación de la proteína en estudio) y de tampón de muestra 2X. La mezcla se hierve a 95°C durante 5 minutos, para desnaturizar las proteínas. Transcurrido este tiempo, se colocan inmediatamente en hielo hasta la realización de la electroforesis.

3.6.2. 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 la proteína de interés.

El gel de electroforesis se compone de dos tipos de geles: 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 utilizamos geles preparados en gradiente de concentración (4-20%), *Mini-protean TGX™ precast gels* (Bio-Rad Laboratories). Una vez colocado el gel en la cubeta de electroforesis, se separan los peines y se vierte tampón de electroforesis 1X (previamente diluido a partir de tampón de electroforesis 10X, Tabla 6) hasta que los pocillos queden sumergidos. Las muestras se cargan en los pocillos, y se incluye también 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 con

tampón de electroforesis, se cierra el circuito y se aplica un voltaje constante de 150 V durante 60 minutos.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
<i>TRIS</i>	<i>250 mM</i>
<i>Glicina</i>	<i>1,92 M</i>
<i>SDS</i>	<i>1%</i>

Tabla 6: Composición del tampón de electroforesis 10X

3.6.3. TRANSFERENCIA

Las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida son transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm de poro, mediante un sistema de electrotransferencia (*Mini Trans-Blot Cell*, Bio-Rad). Una vez que ha finalizado la electroforesis, se elimina el gel concentrador y se procede al montaje en un casete para realizar la transferencia, siguiendo las indicaciones del fabricante. El casete se coloca entonces dentro de la cubeta de transferencia, acompañado de un bloque de hielo y un agitador magnético. Se llena la cubeta con tampón de transferencia 1X (Tabla 7) y se cierra el circuito. Se aplica un voltaje constante de 100 V durante una hora a 4°C.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
<i>TRIS</i>	<i>20 mM</i>
<i>Glicina</i>	<i>150 mM</i>
<i>Metanol</i>	<i>20%</i>

Tabla 7: Composición del tampón de transferencia 1X

Una vez terminada la transferencia, y para confirmar que ésta se ha realizado adecuadamente, se coloca la membrana en un recipiente con colorante *Ponceau S* (Tabla 8) durante 1 minuto. Eliminando gradualmente el exceso de colorante mediante sucesivos lavados con agua destilada, se debe distinguir en cada carril el patrón de bandas correspondientes a las diferentes proteínas que contienen las muestras.

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

Tabla 8: Composición de la solución *Ponceau S*

3.6.4. INMUNODETECCIÓN

Consiste en la detección de la proteína en estudio en la membrana de nitrocelulosa mediante el empleo de anticuerpos específicos. Para ello, se incuba la membrana con solución de bloqueo al 5% disuelta en tampón TBS-T 1X (Tabla 9) durante 1 hora, con objeto de evitar uniones inespecíficas del anticuerpo a la superficie de la membrana. Transcurrido este tiempo, se incuba la membrana con el anticuerpo primario específico (diluido en solución de bloqueo), dejándolo toda la noche a 4°C con agitación.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
<i>TRIS/HCL (pH=7,5)</i>	<i>10 mM</i>
<i>NaCl</i>	<i>100 mM</i>
<i>Tween 20</i>	<i>0,1%</i>

Tabla 9: Composición de la solución de lavado (tampón TBS-T 1X)

Posteriormente se lava la membrana (8 lavados de 3 minutos cada uno) con solución de lavado (TBS-T 1X), para eliminar el exceso de anticuerpo no fijado. Después, se incuba la membrana con el anticuerpo secundario, durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación, y se repite el proceso de lavado con TBS-T 1X. Por último, se procede al revelado de la membrana mediante una técnica que utiliza quimioluminiscencia, usando *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent*. Las imágenes se capturan mediante un sistema de análisis de imágenes quimioluminiscentes (*Fujifilm LAS 3000 min*). Para la cuantificación, se analizan las bandas mediante densitometría óptica, utilizando el programa informático PCBAS (versión 2.08e).

Como control de carga, se realiza posteriormente en cada membrana la inmunodetección de la proteína β -actina, que es una proteína expresada de forma constitutiva en todas las membranas analizadas. En la Tabla 10 se indican los anticuerpos utilizados en esta memoria así como las condiciones para su determinación.

ANTICUERPO PRIMARIO	ORIGEN	DILUCIÓN AC. PRIMARIO	DILUCIÓN AC. SECUNDARIO
<i>Anti-β-actina</i>	<i>Ratón monoclonal</i>	<i>1:5000</i>	<i>1:10000</i>
<i>Anti-NOX1</i>	<i>Conejo policlonal</i>	<i>1:1000</i>	<i>1:2000</i>
<i>Anti-NOX2</i>	<i>Conejo monoclonal</i>	<i>1:2000</i>	<i>1:4000</i>
<i>Anti-NOX4</i>	<i>Conejo policlonal</i>	<i>1:1000</i>	<i>1:2000</i>
<i>Anti-Nitrotirosina</i>	<i>Ratón monoclonal</i>	<i>1:1000</i>	<i>1:2000</i>
<i>Anti-p-Akt</i>	<i>Conejo policlonal</i>	<i>1:1000</i>	<i>1:2000</i>
<i>Anti-Akt</i>	<i>Conejo policlonal</i>	<i>1:1000</i>	<i>1:2000</i>
<i>Anti-p-p38 MAPK</i>	<i>Conejo policlonal</i>	<i>1:1000</i>	<i>1:2000</i>
<i>Anti-p38 MAPK</i>	<i>Conejo policlonal</i>	<i>1:1000</i>	<i>1:2000</i>
<i>Anti-p-ERK_{1/2}</i>	<i>Ratón monoclonal</i>	<i>1:1000</i>	<i>1:2000</i>
<i>Anti-ERK_{1/2}</i>	<i>Ratón monoclonal</i>	<i>1:1000</i>	<i>1:2000</i>
<i>Anti-p65 NF-kB</i>	<i>Conejo policlonal</i>	<i>1:1000</i>	<i>1:3000</i>
<i>Anti-p-Smad2</i>	<i>Conejo policlonal</i>	<i>1:1000</i>	<i>1:3000</i>
<i>Anti-p-α-IκB</i>	<i>Ratón monoclonal</i>	<i>1:1000</i>	<i>1:3000</i>

Tabla 10: Anticuerpos y diluciones utilizados en los estudios de *Western blotting*

3.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC)

El ensayo de actividad PKC se realiza mediante un kit suministrado por *Enzo Life Sciences*, basado en un ensayo ELISA que utiliza un péptido sintético específico como sustrato para la PKC, y un anticuerpo policlonal que reconoce la forma fosforilada de dicho sustrato.

3.7.1. MATERIALES Y REACTIVOS

MATERIAL/REACTIVO	PREPARACIÓN
<i>Placa Elisa con sustrato PKC</i>	
<i>Anticuerpo específico frente al sustrato fosforilado</i>	
<i>Anti-rabbit IgG:HRP</i>	<i>Diluir 1:1000 en tampón de dilución para anticuerpo</i>
<i>Tampón de dilución para anticuerpo</i>	
<i>Tampón de dilución para ensayo quinasa</i>	
<i>ATP</i>	<i>Reconstituir con 2 mL de tampón de dilución para ensayo quinasa</i>
<i>PKC activa</i>	<i>Usada como control positivo</i>
<i>Tampón de lavado 20X</i>	<i>Diluir hasta 1X con agua bidestilada</i>
<i>Substrato TMB</i>	
<i>Solución de parada</i>	

Tabla 11: Reactivos y materiales necesarios para la determinación de la actividad PKC

3.7.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

En primer lugar, se retira el medio de cultivo y se lava con DPBS 1X a 4°C. Añadir inhibidores de proteasas (PMSF, leupeptina y aprotinina) al frasco de cultivo antes de la preparación del lisado. Se añade 1 mL de tampón de lisis (Tabla 12) y se deja 10 minutos en hielo. A continuación se raspan las células y se pasa el contenido a un microtubo eppendorf de 1,5 mL preenfriado, centrifugándose a 16000 g durante 15 minutos. Tras esto, se transfiere el sobrenadante a otro microtubo de 1,5 mL preenfriado, siendo ésta la fracción citosólica que se utiliza para determinar la actividad PKC.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
<i>MOPS</i>	<i>20 mM</i>
<i>β-glicerolfosfato</i>	<i>50 mM</i>
<i>Fluoruro de sodio</i>	<i>50 mM</i>
<i>Ortovanadato de sodio</i>	<i>1 mM</i>
<i>EGTA</i>	<i>5 mM</i>
<i>EDTA</i>	<i>2 mM</i>
<i>NP-40</i>	<i>1%</i>
<i>DTT</i>	<i>1 mM</i>
<i>Benzamidina</i>	<i>1 mM</i>
<i>PMSF</i>	<i>1 mM</i>
<i>Leupeptina</i>	<i>10 µg/mL</i>
<i>Aprotinina</i>	<i>10 µg/mL</i>

Tabla 12: Composición del tampón de lisis

3.7.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para comenzar, se añade a cada pocillo 50 µL del tampón de dilución para ensayo quinasa y se deja reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos, eliminándolo pasado este tiempo. Añadir, por duplicado, 30 µL de muestra (o 30 µL de PKC activa diluida en tampón de dilución para ensayo quinasa (control positivo)). Iniciar la reacción añadiendo 10 µL de ATP a cada pocillo. Para evitar contaminación, se utiliza una punta de pipeta por cada pocillo. Después, se cubren los pocillos con papel adhesivo y se incuba a 30°C durante 30 minutos en una estufa, agitándolo cada 10 minutos suavemente con la mano para obtener resultados óptimos. Para parar la reacción, se vacía el contenido de los pocillos. Para ello se invierte la placa y se seca en papel de filtro mediante golpes suaves en la placa.

Posteriormente, añadir 40 µL del anticuerpo específico frente al sustrato fosforilado a cada pocillo. Cubrir los pocillos con un nuevo papel adhesivo e incubar a temperatura ambiente durante 60 minutos, preferiblemente con un pequeño movimiento cada 20 minutos.

Aspirar el líquido de los pocillos y añadir 100 µL de tampón de lavado 1X a todos los pocillos, usando una pipeta multicanal (lavar durante 1-2 minutos). Repetir el proceso de aspiración y lavado 3 veces más. Después del cuarto lavado, aspirar el líquido de los

pocillos e invertir la placa y secar con pequeños golpes suaves la placa en un papel de filtro.

Añadir 40 µL de la dilución de *anti-rabbit IgG:HRP* a cada pocillo. Cubrir los pocillos con un papel adhesivo, e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, realizando un suave movimiento de mezcla cada 10 minutos.

Aspirar el líquido de los pocillos, y repetir los pasos de aspirado, lavado y secado de la placa tal y como se describe más arriba. A continuación, se añaden 60 µL de sustrato TMB a cada pocillo y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, se añaden 20 µL de solución de parada a cada pocillo en el mismo orden en el cual fue añadido el sustrato TMB. Por último, se mide la absorbancia a 450 nm.

Para calcular la actividad quinasa relativa se aplica la siguiente formula:

$$\text{Actividad PKC relativa} = \frac{\text{Media absorbancia (muestra)} - \text{media absorbancia (blanco)}}{\text{Concentración de proteína}}$$

3.8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DEL SISTEMA NF-KB

La determinación se basa en el estudio de: 1) la translocación de la subunidad p65 del complejo NF-kB desde el citosol hasta el núcleo, y 2) el grado de fosforilación de la proteína α-IkB.

3.8.1. ESTUDIO DE LA TRANSLOCACIÓN DE LA SUBUNIDAD p65 DEL COMPLEJO NF-KB

La técnica se basa en la separación de las fracciones citosólica y nuclear de las células, para después detectar, con un anticuerpo específico, la subunidad p65 en ambas fracciones.

Inicialmente, se procede al raspado celular y centrifugación durante 5 minutos a 1000 g. Tras esto, se retira el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en 150 µL de tampón

A (4°C). Posteriormente se incuba 15 minutos y se centrifuga durante 10 minutos a 3000 g, siendo el sobrenadante el **extracto citoplasmático**.

El *pellet* obtenido se lava añadiendo tampón B (4°C) y se centrifuga de nuevo durante 10 minutos a 3000 g. El *pellet* resultante se resuspende en 100 µL de tampón C (4°C), y se incuba 30 minutos, centrifugándose posteriormente 30 minutos a 15000 g. El sobrenadante obtenido entonces corresponde al **extracto nuclear**.

Para finalizar, se detecta mediante *Western blotting* la subunidad p65 del sistema NF-κB en los extractos citosólicos y nucleares bajo las mismas condiciones.

La composición de los tampones A, B y C se muestran en las tablas 13, 14 y 15 respectivamente.

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
<i>HEPES</i>	5 mM
MgCl ₂	1,5 mM
<i>KCl</i>	10 mM
<i>Nonidet P-40</i>	0,5%
<i>DTT</i>	0,5 mM
<i>NaF</i>	50 mM
<i>Inhibidor de proteasas</i>	10%

Tabla 13: Composición tampón A

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
<i>HEPES</i>	5 mM
MgCl ₂	1,5 mM
<i>KCl</i>	10 mM
<i>DTT</i>	0,5 mM
<i>NaF</i>	50 mM
<i>Inhibidor de proteasas</i>	10%

Tabla 14: Composición tampón B

REACTIVOS	CONCENTRACIÓN
<i>HEPES</i>	<i>20 mM</i>
<i>MgCl₂</i>	<i>1,5 mM</i>
<i>Glicerol</i>	<i>25%</i>
<i>NaCl</i>	<i>0,5 M</i>
<i>DTT</i>	<i>0,5 mM</i>
<i>EDTA</i>	<i>0,5 mM</i>
<i>NaF</i>	<i>50 mM</i>
<i>Inhibidor de proteasas</i>	<i>10%</i>

Tabla 15: Composición tampón C

3.8.2. ESTUDIO DEL GRADO DE FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA α -I κ B.

Para empezar, se obtienen las fracciones citosólicas y nucleares utilizando el procedimiento y tampones descritos en el apartado 3.8.1. A continuación, se detecta mediante *Western blotting* el grado de fosforilación de la proteína α -I κ B.

3.9. TRANSFECCIÓN CON LÍPIDOS CATIÓNICOS PARA EL SILENCIAMIENTO DE GENES

La utilización de ARN de interferencia (siRNA) nos proporciona una potente herramienta para el estudio de la función celular de muchos genes, que podemos “silenciar” a voluntad. Para ello, se utilizan lípidos catiónicos que permiten introducir el siRNA al interior celular. Esta técnica se basa en el proceso por el cual el ARN de doble cadena puede inducir un silenciamiento específico en eucariotas. El proceso de silenciamiento se inicia cuando un ARN de doble cadena largo es procesado a pequeños fragmentos de ARN (21-26 nucleótidos) mediante la enzima endorribonucleasa *Dicer*. Estas moléculas pequeñas de ARN (siRNA) suprimen la expresión del gen diana mediante el corte en dos mitades del ARN mensajero a través del complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). Las dos mitades del ARNm son posteriormente degradadas por la maquinaria celular, lo que conlleva la supresión de la expresión del gen.

3.9.1. REACTIVOS

REACTIVOS
<i>siRNA NOX2, siNOX4</i>
<i>Scramble</i>
<i>Medio de transfección Opti-MEM®</i>
<i>Lipofectamina® 2000</i>
<i>DMEM 1X</i>

Tabla 16: Reactivos necesarios para la transfección con lípidos catiónicos para el silenciamiento de genes

3.9.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Previamente, se siembran 15.000 células/cm² en placas de 6 pocillos para obtener, pasadas 24 horas, una confluencia del 50-60%. Para iniciar el experimento, en primer lugar se preparan dos tipos de microtubos eppendorf libres de ARNasas: los que llevan el siRNA del gen en estudio, y los que llevan la lipofectamina. En los microtubos con siRNA, en un volumen final de 200 µL, se preparan las concentraciones de siRNA (10 nM para siNOX2 y 17,5 nM para siNOX4) en medio *Opti-MEM®*.

Por otra parte, en los microtubos eppendorf con lipofectamina, se añaden en todos los casos 5 µL de lipofectamina en medio *Opti-MEM®* hasta llegar a un volumen final de 200 µL. Cada microtubo se agita levemente con mucho cuidado y se deja incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo, se une el contenido de ambos microtubos (siRNA y lipofectamina), agregando el siRNA a la lipofectamina con mucho cuidado y pipeteando arriba y abajo para mezclar. Tras esto, se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Por otro lado, se lavan las placas con las células 3 veces con DPBS 1X y se agregan a cada pocillo 600 µL de DMEM 1X sin suero ni antibiótico. A continuación, se agregan los 400 µL de mezcla siRNA-lipofectamina con mucho cuidado y en pequeñas gotas. A continuación se incuban a 37°C, 5% CO₂ durante 24 horas para permitir que se realice la transfección.

Pasadas las 24 horas, se lavan las células con DPBS 1X 3 veces, y se agrega medio de cultivo completo con antibiótico y suero. Para ensayos de expresión génica, las células se incuban durante 48 horas; para los análisis con proteínas (expresión proteica y actividad), durante 72 horas.

En paralelo, y en las mismas condiciones que el siRNA, se utiliza como control un *scramble*, que es una secuencia desordenada que no provoca degradación ninguna del ARNm.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados están expresados como media \pm error estándar. La comparación entre las diferentes condiciones experimentales se ha realizado utilizando el test de ANOVA, y en aquellos casos que han mostrado significación estadística, se ha aplicado el test de Tukey, considerándose diferencias estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$. Se ha utilizado el software estadístico *IBM SPSS Statistics 20*.



RESULTADOS

1. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR ANGIOTENSINA II: ESTUDIO DE LA NADPH OXIDASA

1.1. EFECTO DE LA ANGIOTENSINA II SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO

1.1.1. ENSAYO CONCENTRACIÓN-RESPUESTA PARA ANGIOTENSINA II

La incubación de las células NRK-52E con Ang II durante 24 horas, a concentraciones desde 0,1 a 100 nM, incrementó significativamente la producción de anión superóxido, duplicándose aproximadamente los valores basales al utilizar la concentración más alta de Ang II (Figura 18). En vista de estos resultados, se eligió la concentración 100 nM de Ang II para realizar los experimentos posteriores.

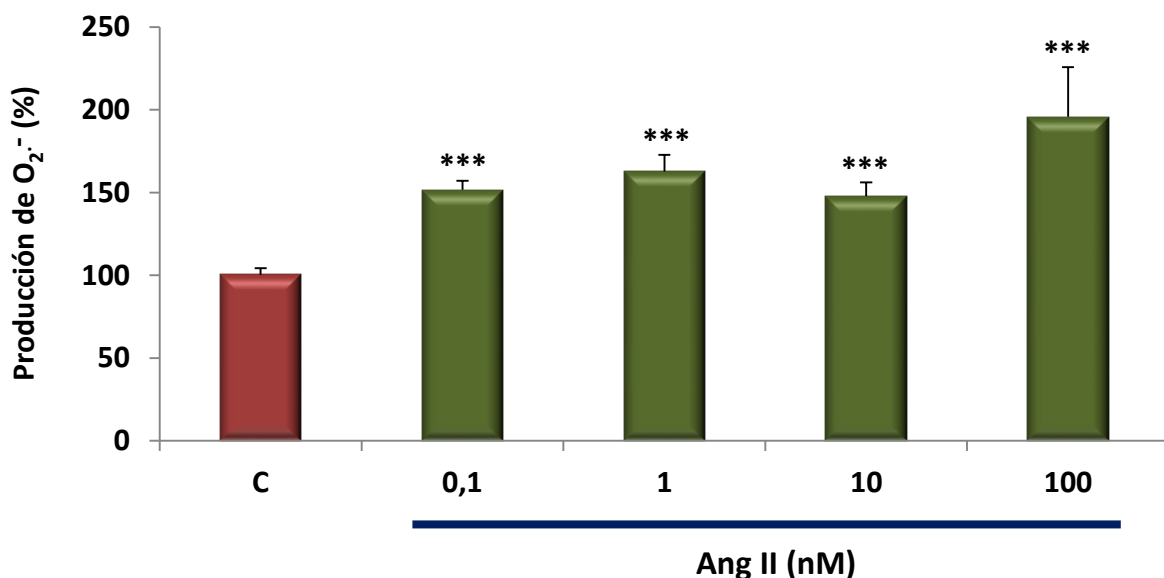


Figura 18: Inducción de la producción de anión superóxido (O₂^{·-}) por angiotensina II (Ang II): ensayo concentración-respuesta. Tiempo de incubación = 24 horas. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media ± error estándar de 4 experimentos independientes. Significación estadística: ***p<0,001 comparado con C.

1.1.2. ENSAYO TIEMPO-RESPUESTA PARA ANGIOTENSINA II

La máxima producción de anión superóxido, como consecuencia de la estimulación con Ang II 100 nM, tiene lugar a partir de 1 hora, manteniéndose constante hasta las 24 horas de estimulación (Figura 19). Por consiguiente, el tiempo de estimulación de 24 horas fue elegido para la realización de los experimentos posteriores, excepto en los casos indicados.

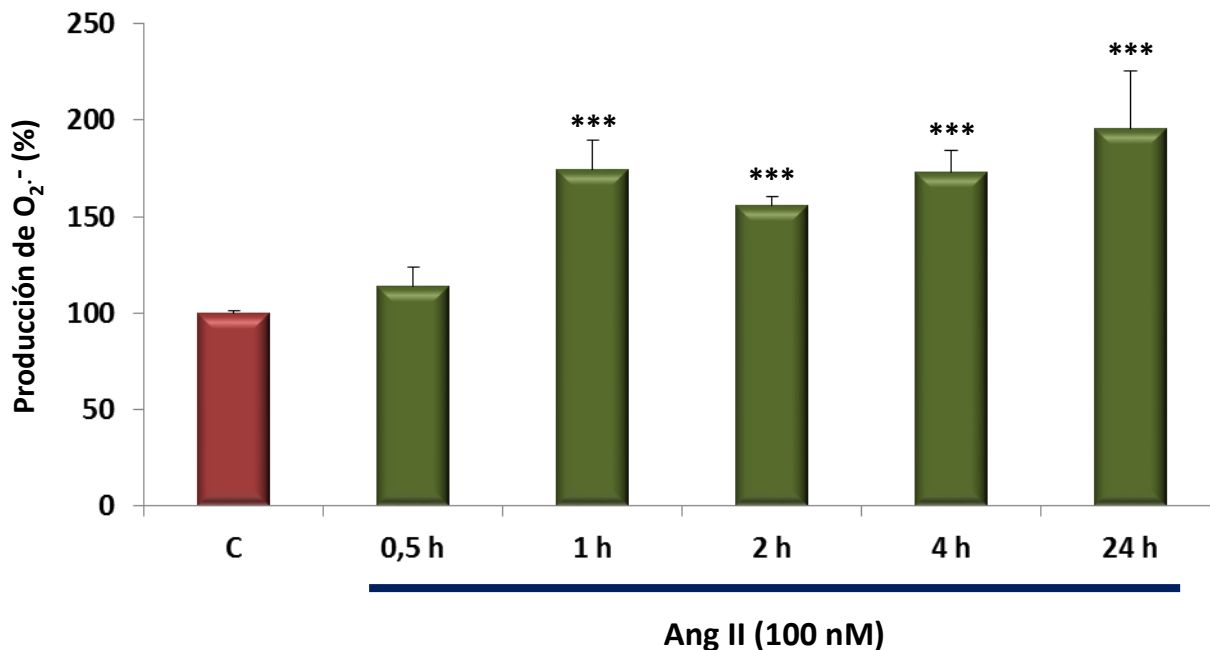


Figura 19: Inducción de la producción de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por angiotensina II (Ang II): ensayo tiempo-respuesta. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con C.

1.2. CARACTERIZACIÓN DE LA FUENTE DE PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO EN RESPUESTA A LA ANGIOTENSINA II

Para caracterizar la fuente enzimática de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en respuesta a la estimulación con Ang II, se analizó la generación de $O_2^{\cdot-}$ en células NRK-52E en presencia de diferentes inhibidores, tal y como se describe en el apartado 3.2.1. de la sección *Materiales y Métodos*. El tratamiento con DPI inhibió completamente el aumento en la

producción de $O_2^{\cdot-}$ inducido por Ang II, no así el oxipurinol y la rotenona, que fueron inefectivos (Figura 20). Por tanto, podemos identificar a la enzima NADPH oxidasa como fuente del anión superóxido formado en nuestras condiciones experimentales.

Por otro lado, la generación de $O_2^{\cdot-}$ inducida por Ang II en células NRK-52E fue completamente inhibida en presencia de SOD (Figura 20), lo que nos indica que el $O_2^{\cdot-}$ es la especie reactiva de oxígeno detectada por la lucigenina.

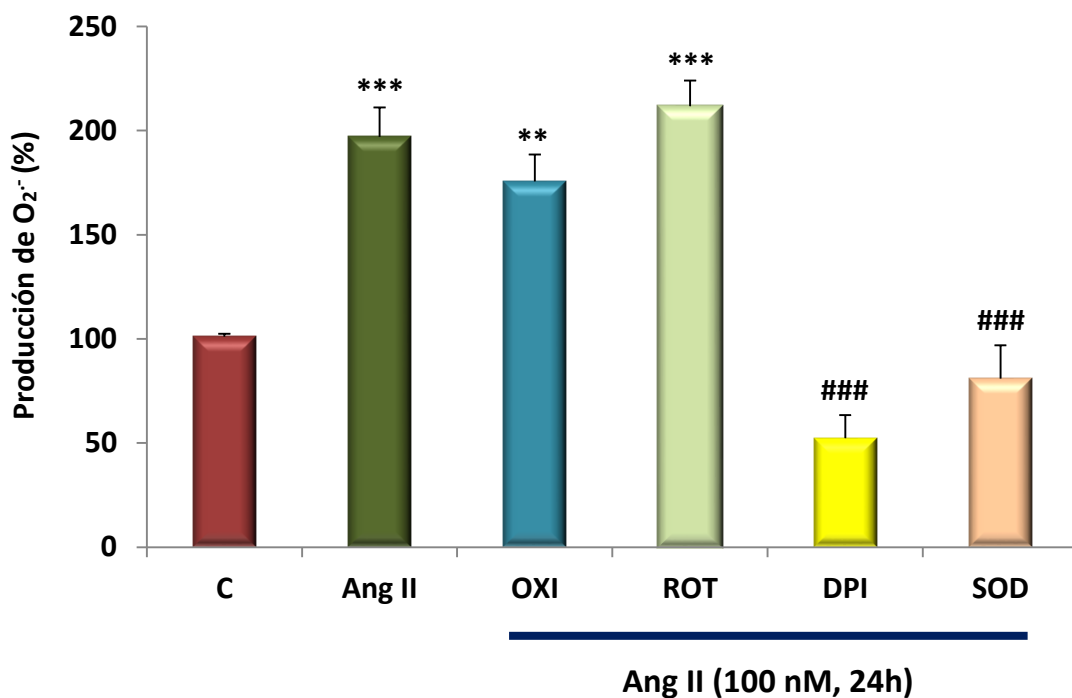


Figura 20: Caracterización de la fuente de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en células NRK-52E tratadas con angiotensina II (Ang II). Las células fueron tratadas con 100 nM de Ang II durante 24 horas, sola (Ang II) o en combinación con 0,1 mM de oxipurinol (OXI), rotenona (ROT), DPI (DPI), o 100 U/mL de enzima superóxido dismutasa (SOD). C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con C; ### $p < 0,001$ comparado con Ang II.

1.3. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE LA LÍNEA NRK-52E

Las células que fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de LC (0,5-100 mM) no mostraron diferencias significativas en la viabilidad celular con respecto a células sin tratar (Figura 21), indicando estos resultados que la LC no presenta toxicidad celular alguna a las concentraciones utilizadas en este estudio.

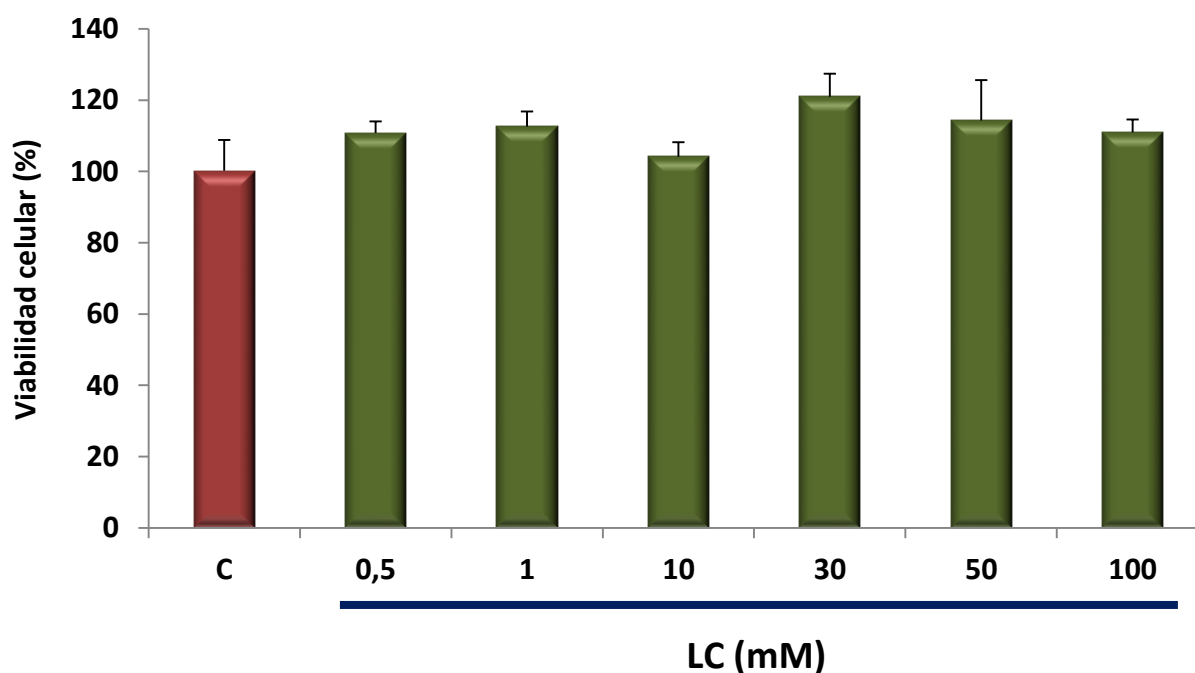


Figura 21: Ensayo concentración-viabilidad celular para L-carnitina (LC). Tiempo de incubación = 24 horas. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes.

1.4. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA

1.4.1. ENSAYO CONCENTRACIÓN-RESPUESTA PARA LA L-CARNITINA

Después de estimular las células NRK-52E con Ang II, observamos que la LC es capaz de reducir significativamente la producción de O_2^- a concentraciones iguales o superiores a 0,1 mM (Figura 22). La concentración 1 mM fue elegida para la realización de los experimentos posteriores.

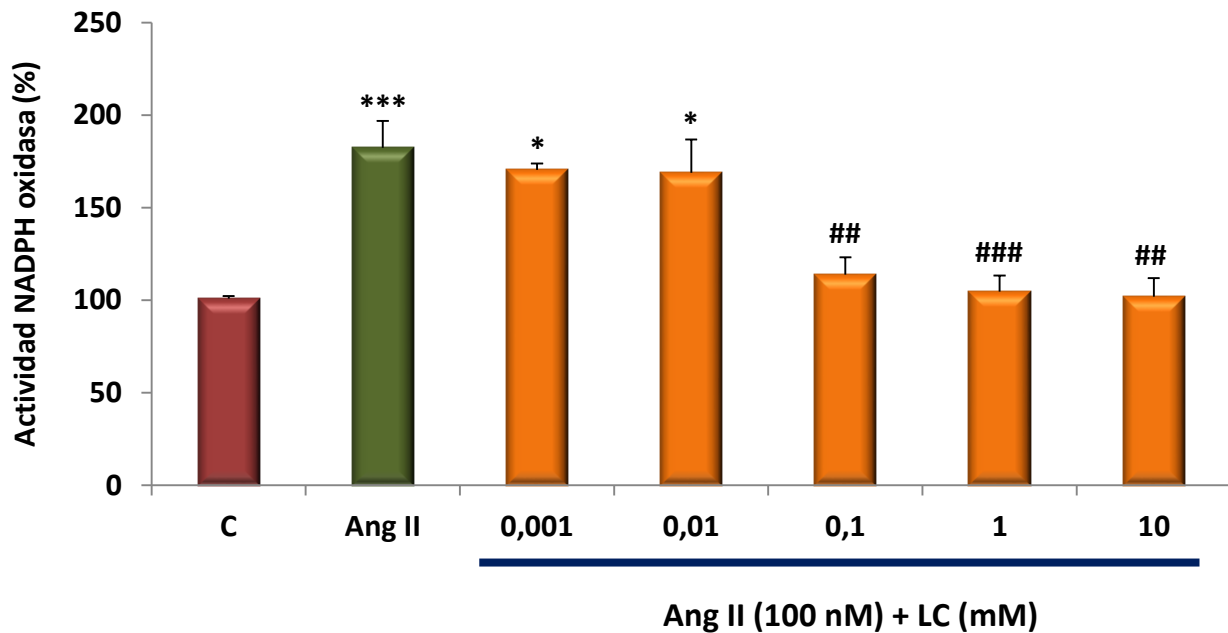


Figura 22: Concentración-respuesta para L-carnitina (LC) en células NRK-52E tratadas con angiotensina II (Ang II). Las células fueron tratadas con 100 nM de Ang II durante 1 hora, sola (Ang II) o en combinación con una preincubación de 30 minutos de LC a las concentraciones indicadas (0,001 – 10 mM). El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ comparado con C; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparado con Ang II.

1.4.2. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA ESTIMULADA POR ANGIOTENSINA II

La LC a una concentración de 1 mM fue capaz de reducir la actividad NADPH oxidasa (previamente incrementada por la administración de Ang II 100 nM durante 24 horas) hasta valores basales. También cabe mencionar que la administración de LC 1 mM a células controles no produjo ningún efecto (Figura 23), siendo ésta una característica que se mantendrá en prácticamente todos los parámetros determinados en este estudio.

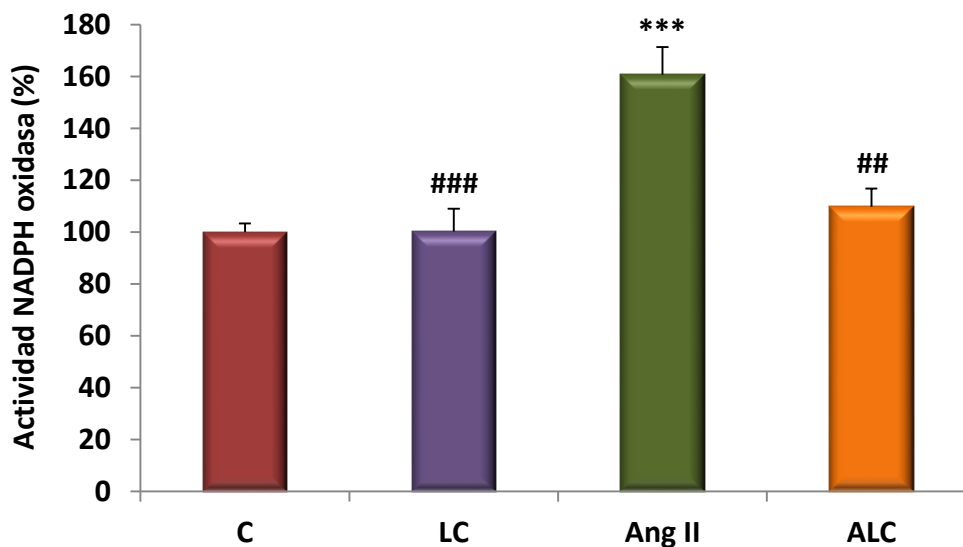


Figura 23: Efecto de la L-carnitina (LC) sobre la actividad NADPH oxidasa estimulada por angiotensina II (Ang II). Las células fueron tratadas durante 24 horas con 100 nM de Ang II (Ang II), 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con C; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparado con Ang II.

1.5. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II

En relación a la producción de peróxido de hidrógeno, la administración de Ang II durante 24 horas provocó un incremento significativo (1,7 veces) de la cantidad de peróxido de hidrógeno generado por las células. La LC fue capaz de restaurar las concentraciones de H_2O_2 hasta valores semejantes a los de las células no estimuladas (Figura 24).

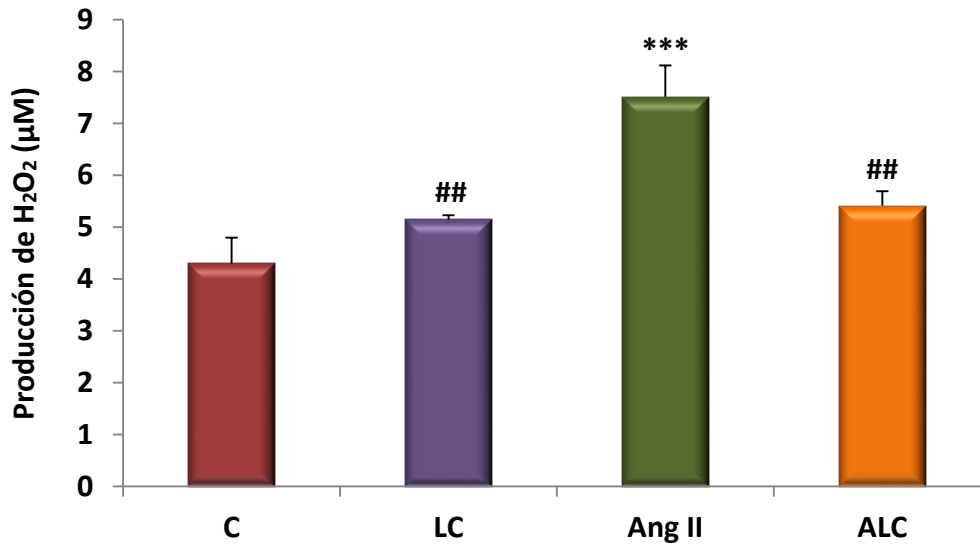


Figura 24: Efecto de la L-carnitina (LC) y angiotensina II (Ang II) en la producción de H₂O₂. Las células fueron tratadas durante 24 horas con 100 nM de Ang II (Ang II), 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media ± error estándar de 4 experimentos independientes. Significación estadística: ***p<0,001 comparado con C; ##p<0,01 comparado con Ang II.

1.6. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LOS NIVELES DE NITROSILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN CÉLULAS TRATADAS CON ANGIOTENSINA II

En la misma línea de resultados anteriores, la administración de Ang II causó un incremento (aproximadamente 1,5 veces) en los niveles de nitrotirosina (marcador de estrés oxidativo), revirtiendo la LC este efecto como se observa en la Figura 25.

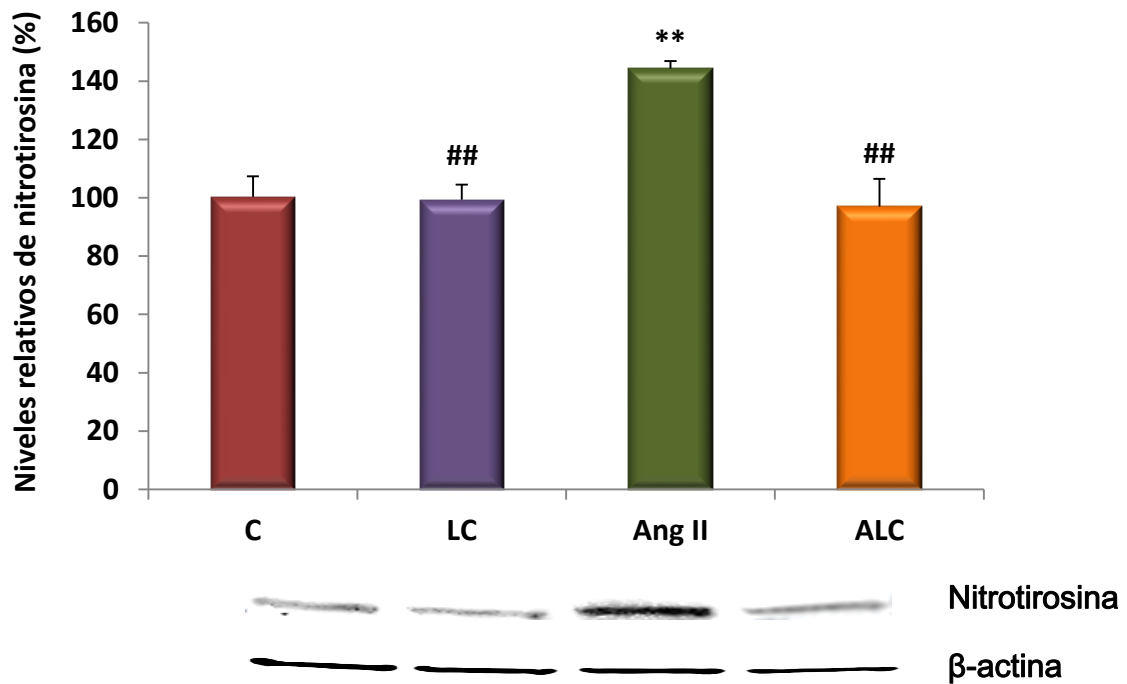
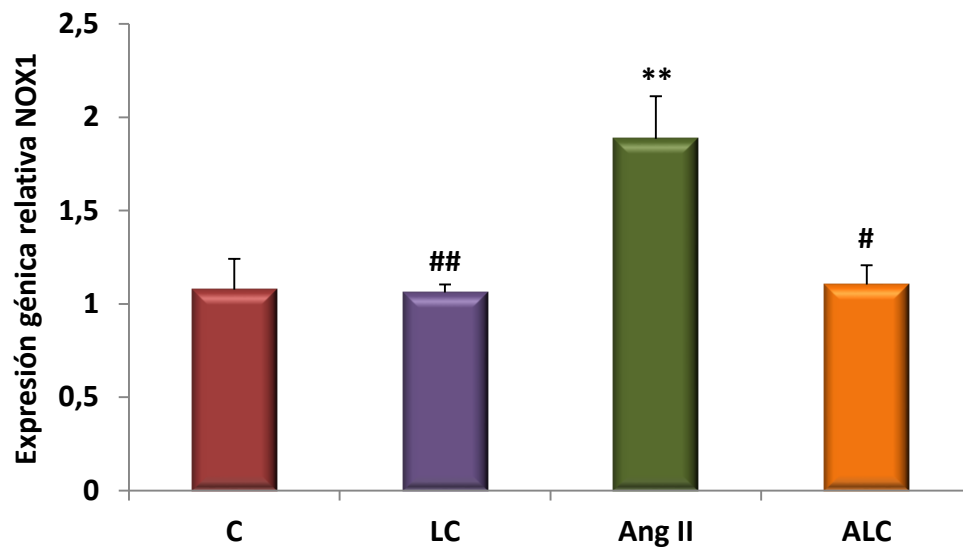


Figura 25: Efecto de la L-carnitina (LC) y angiotensina (Ang II) en los niveles de nitrosilación de las proteínas. Las células fueron tratadas durante 24 horas con 100 nM de Ang II (Ang II), 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: ** $p < 0,01$ comparado con C; ## $p < 0,01$ comparado con Ang II.

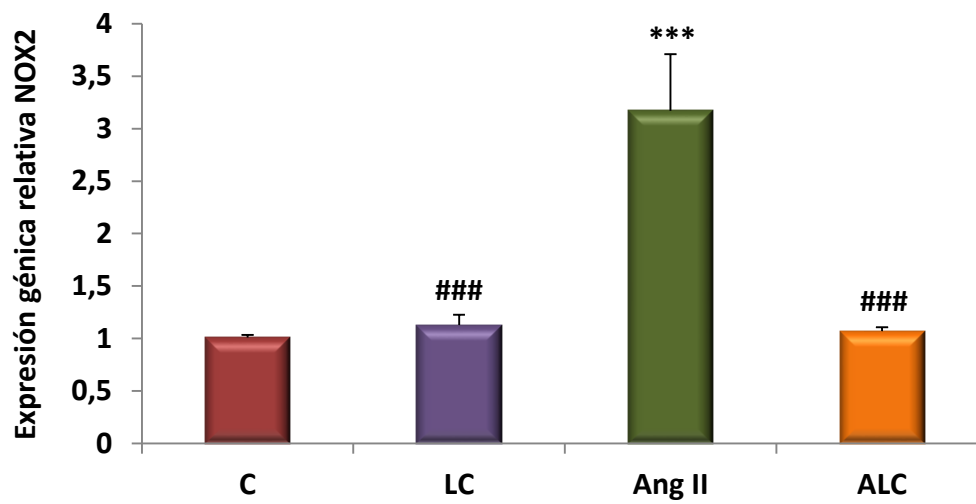
1.7. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS ISOFORMAS NOX1, NOX2 Y NOX4 DE LA NADPH OXIDASA EN CÉLULAS ESTIMULADAS CON ANGIOTENSINA II

La Ang II indujo un aumento en la expresión génica de NOX1 y NOX2 (2 y 3 veces, respectivamente), contrarrestando la LC este incremento en ambos casos (Figuras 26A y 26B). Por el contrario, la Ang II redujo a la mitad la expresión de la isoforma NOX4. Igualmente, la administración de LC llegó a restaurar estos valores hasta niveles controles (Figura 26C). En todos los casos, la administración de LC en células no tratadas no provocó ningún cambio en la expresión génica de las isoformas estudiadas (Figuras 26A, 26B y 26C).

A



B



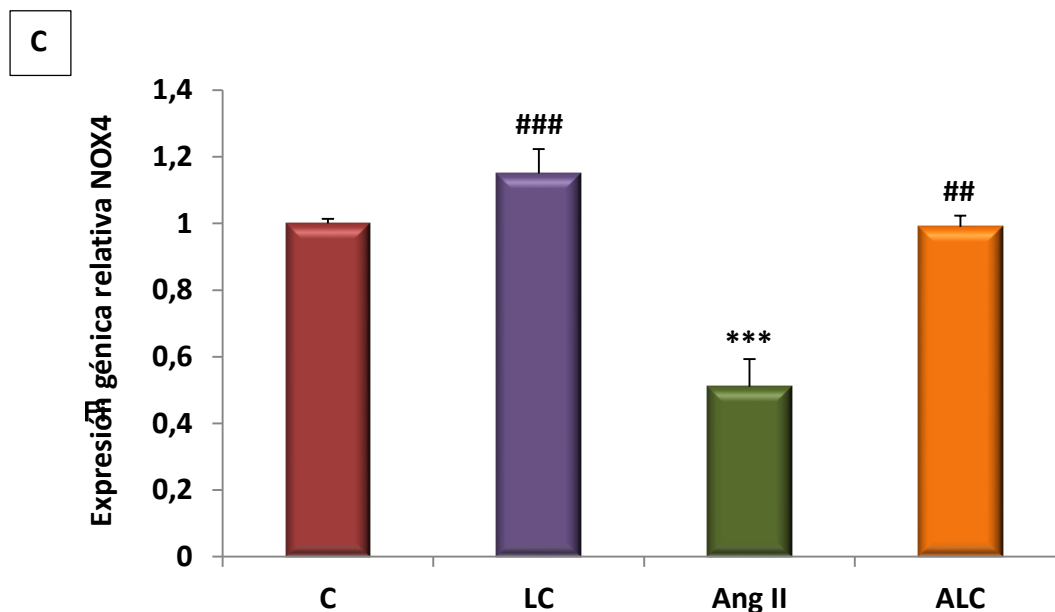
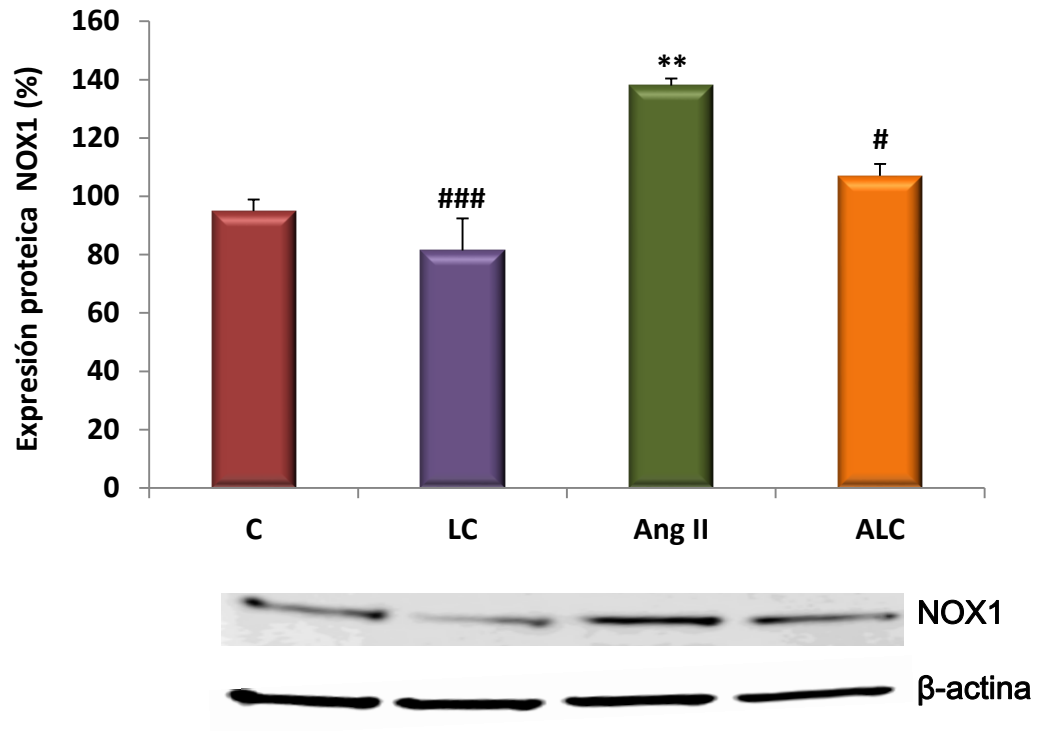


Figura 26: Efecto de la L-carnitina (LC) sobre la expresión génica de las isoformas NOX1 (A), NOX2 (B) y NOX4 (C) de la NADPH oxidasa en células tratadas con angiotensina II (Ang II). Las células fueron tratadas durante 24 horas con 100 nM de Ang II (Ang II), 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Significación estadística: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con C; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparado con Ang II.

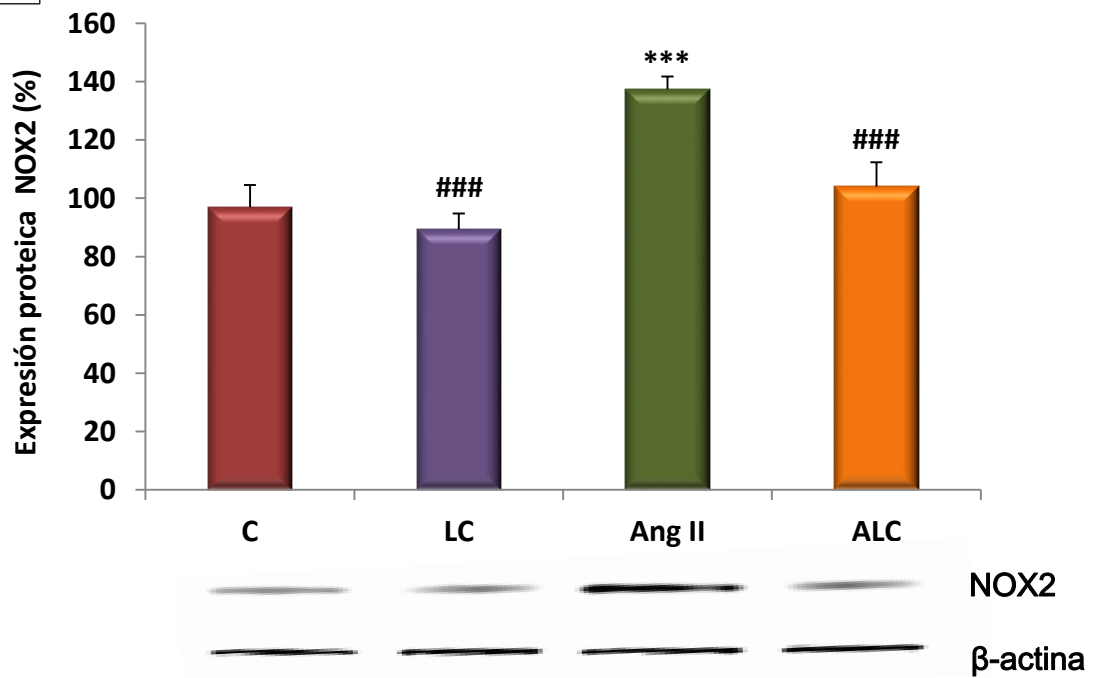
1.8. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE LAS ISOFORMAS NOX1, NOX2 Y NOX4 DE LA NADPH OXIDASA EN CÉLULAS ESTIMULADAS CON ANGIOTENSINA II

La LC atenuó el incremento en la expresión proteica de NOX1 y NOX2 provocado por la estimulación con Ang II durante 24 horas (Figuras 27A y 27B). Por otro lado, la LC también normalizó los niveles de expresión proteica de NOX4, que se encontraban disminuidos tras la incubación de las células con Ang II (Figuras 27C). En los 3 casos, la adición de LC en células controles no provocó cambio alguno en la expresión proteica (Figuras 27A, 27B y 27C).

A



B



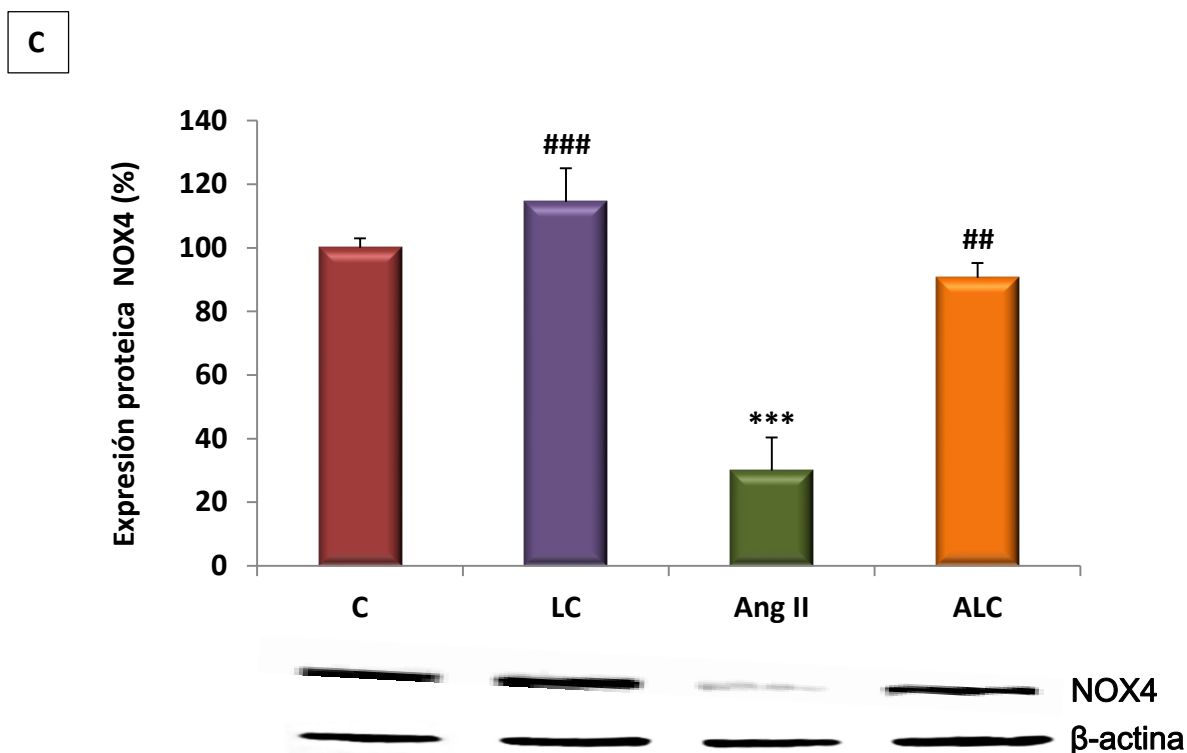


Figura 27: Efecto de la L-carnitina (LC) sobre la expresión proteica de las isoformas NOX1 (A), NOX2 (B) y NOX4 (C) de la NADPH oxidasa en células tratadas con angiotensina II (Ang II). Las células fueron tratadas durante 24 horas con 100 nM de Ang II (Ang II), 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Significación estadística: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con C; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparado con Ang II.

1.9. CARACTERIZACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE LA NADPH OXIDASA INVOLUCRADAS EN LA FORMACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO Y H_2O_2

Para analizar las isoformas de la NADPH oxidasa implicadas en el estrés oxidativo provocado por Ang II, así como en el efecto inhibitorio de la LC, hemos empleado inhibidores específicos de las diferentes isoformas de la NADPH oxidasa; asimismo, hemos realizado estudios de silenciamiento de genes, tal y como se detalla a continuación.

El uso del inhibidor específico de NOX2, gp91 ds-tat, produjo una disminución significativa en la producción celular de anión superóxido inducida por Ang II, al comparar estos valores con los obtenidos en células no estimuladas y con aquellas estimuladas con Ang II en ausencia del inhibidor. La producción de anión superóxido en células preincubadas con LC y tratadas con Ang II no se vio modificada por la presencia del inhibidor de NOX2 (Figura 28).

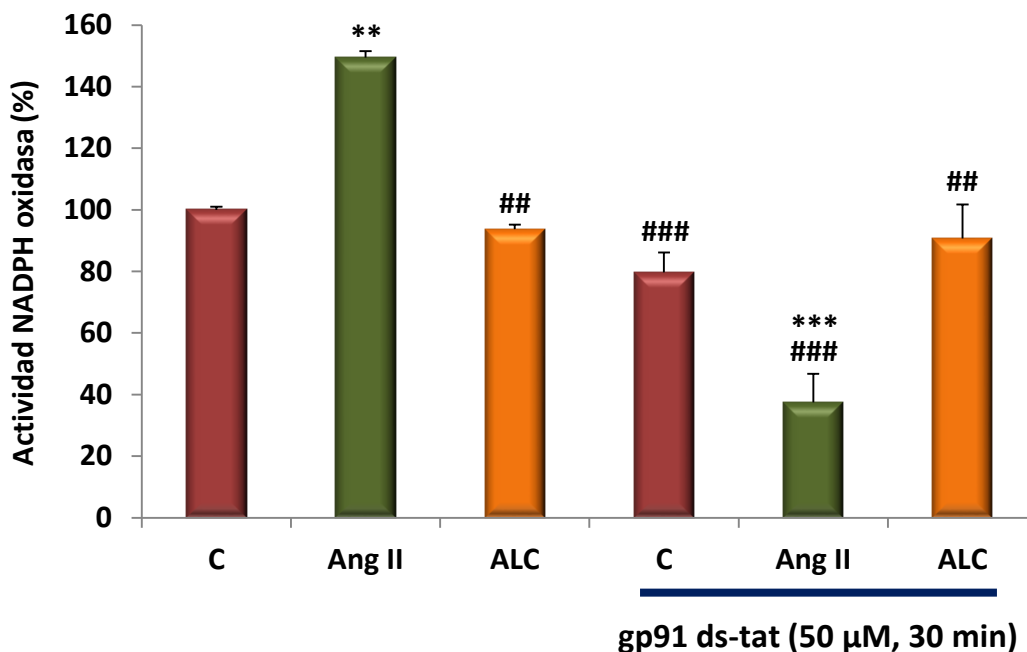
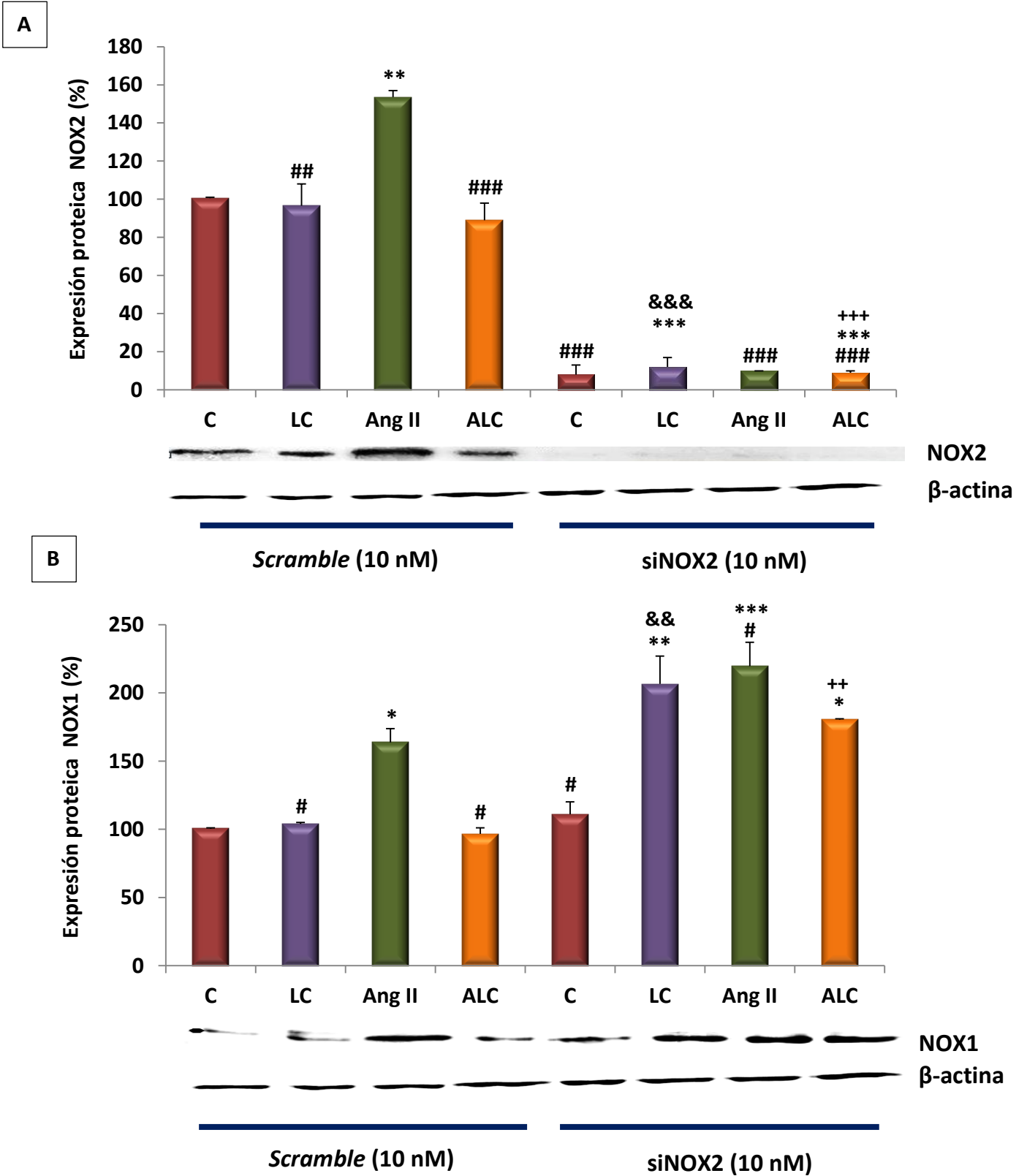


Figura 28: Efecto del inhibidor de NOX2 (gp91 ds-tat) sobre la actividad NADPH oxidasa en presencia de L-carnitina (LC) y angiotensina II (Ang II). Las células fueron tratadas durante 24 horas con 100 nM de Ang II (Ang II) o 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Significación estadística: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con C; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparado con Ang II.

El silenciamiento de la isoforma NOX2 produjo, como era de esperar, una reducción de aproximadamente el 90% en la expresión proteica de esta isoforma (Figura 29A). Sorprendentemente, la expresión proteica de NOX1 y NOX4 fue también modificada por esta manipulación de NOX2. Así, la expresión proteica de NOX1 aumentó en todos los grupos de células a excepción de las células controles (Figura 29B), mientras que la

expresión de NOX4 solo se vio aumentada en el grupo de células estimuladas por Ang II (comparando siempre con respecto al grupo celular equivalente sin silenciamiento) (Figura 29 C).



C

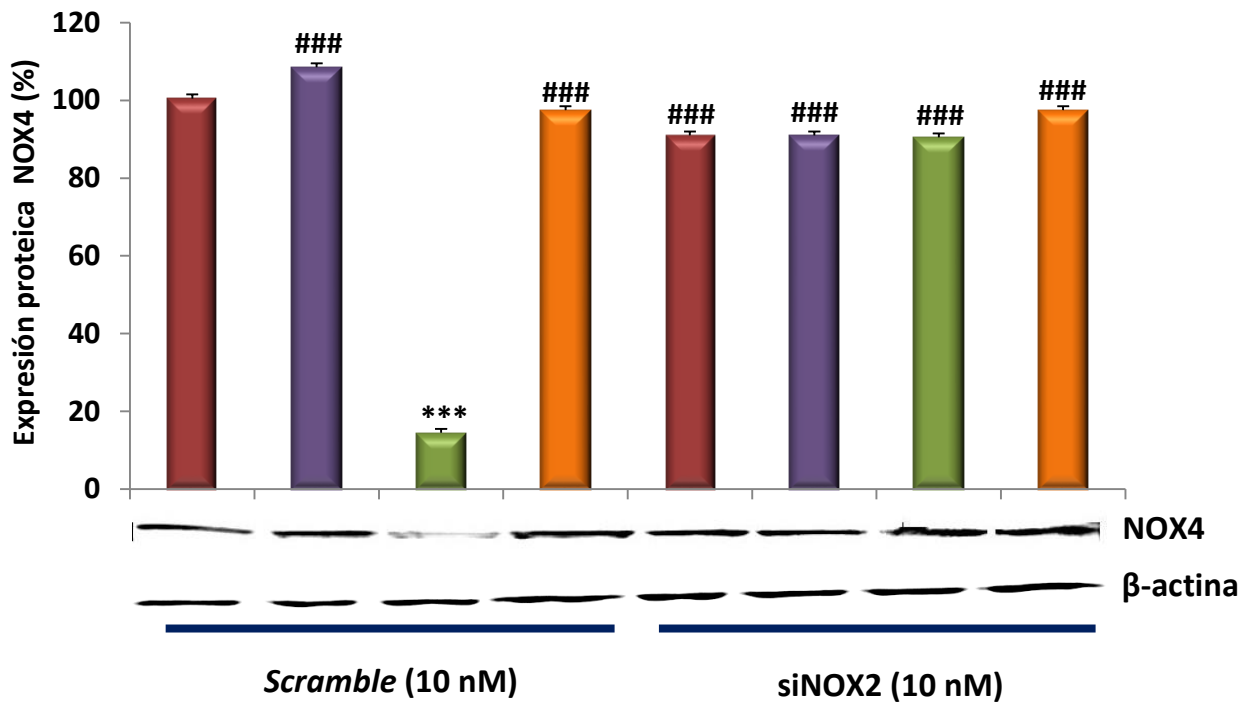


Figura 29: Efecto del silenciamiento de NOX2 sobre la expresión proteica de las isoformas NOX2 (A), NOX1 (B) y NOX4 (C) de la NADPH oxidasa. Las células fueron tratadas durante 24 horas con 100 nM de Ang II (Ang II), 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. Todas las condiciones se trataron con un *scramble* (Src) o con el siRNA de NOX2, según se detalla en el apartado 3.9 de la sección *Materiales y Métodos*. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con C+Src; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparado con Ang II+Src; & $p < 0,01$, && $p < 0,001$ comparado con LC+Src; ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ comparado con ALC+Src.

A continuación, determinamos el efecto del silenciamiento de NOX2 sobre la producción de anión superóxido. Los resultados mostraron que dicho silenciamiento produjo un aumento significativo en la producción de anión superóxido en todas las condiciones experimentales, a excepción de las células no tratadas (siempre comparando con los correspondientes grupos sin silenciamiento de la proteína) (Figura 30).

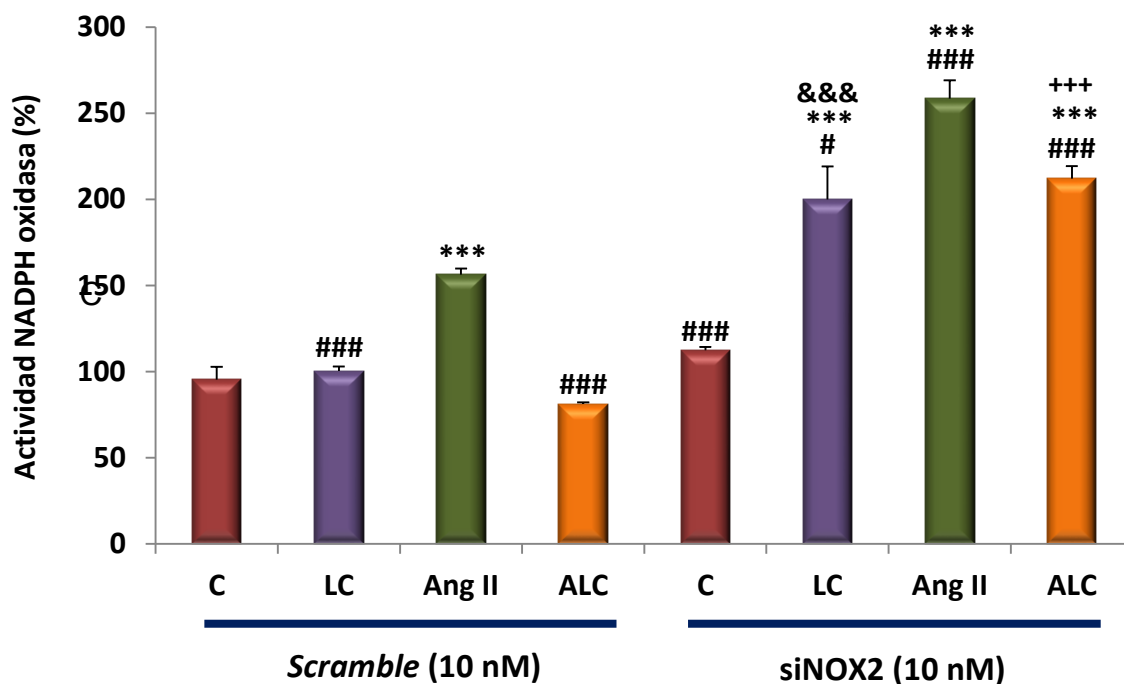


Figura 30: Efecto del silenciamiento de NOX2 sobre la actividad NADPH oxidasa. Las células fueron tratadas durante 24 horas con 100 nM de Ang II (Ang II), 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. Todas las condiciones se trataron con un *scramble* (Src) o con el siRNA de NOX2. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con C+Src; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ comparado con Ang II+Src; &&& $p < 0,001$ comparado con LC+Src; +++ $p < 0,001$ comparado con ALC+Src.

Con respecto a la producción de H_2O_2 , sólo las células tratadas con LC mostraron un aumento de este parámetro al comparar con su grupo sin silenciamiento (Figura 31).

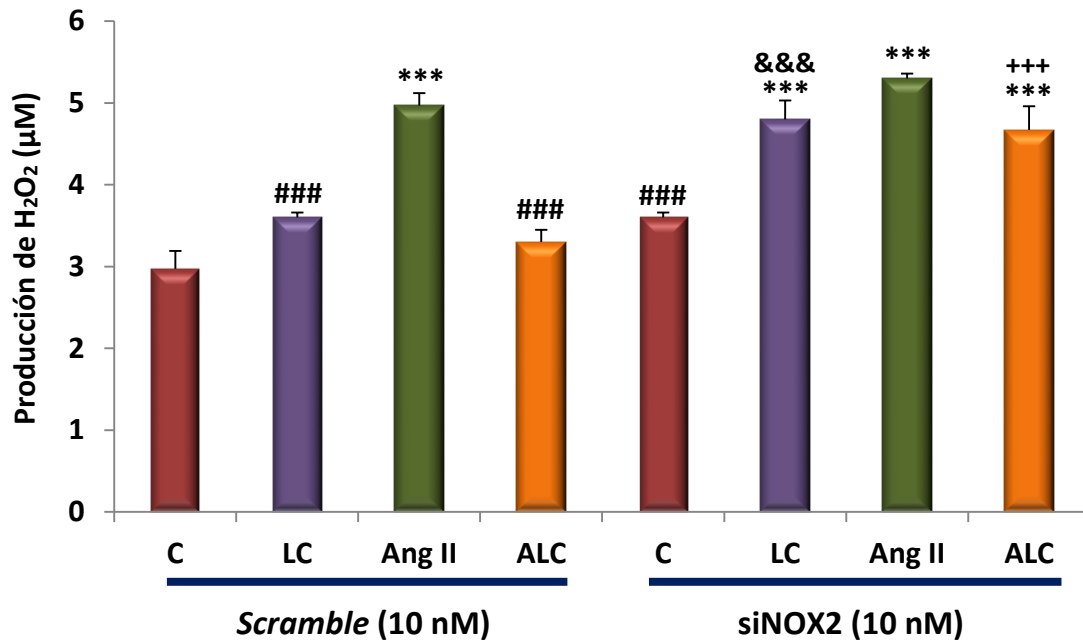


Figura 31: Efecto del silenciamiento de NOX2 sobre la producción de H_2O_2 . Las células fueron tratadas durante 24 horas con 100 nM de Ang II (Ang II), 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. Todas las condiciones se trataron con un *scramble* (Src) o con el siRNA de NOX2. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con C+Src; ### $p < 0,001$ comparado con Ang II+Src; &&& $p < 0,001$ comparado con LC+Src; +++ $p < 0,001$ comparado con ALC+Src.

Por lo que respecta al uso del inhibidor de NOX1 (2-acetilfenotiazina), éste sí disminuyó significativamente la producción de anión superóxido tanto en condiciones basales como tras la estimulación con Ang II en ausencia y en presencia de LC (Figura 32).

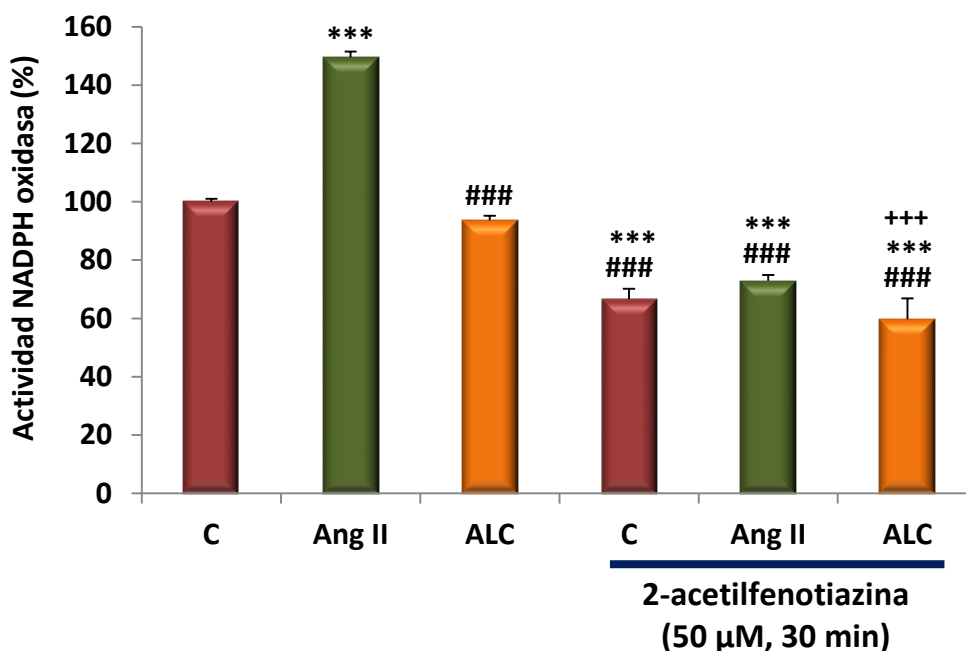
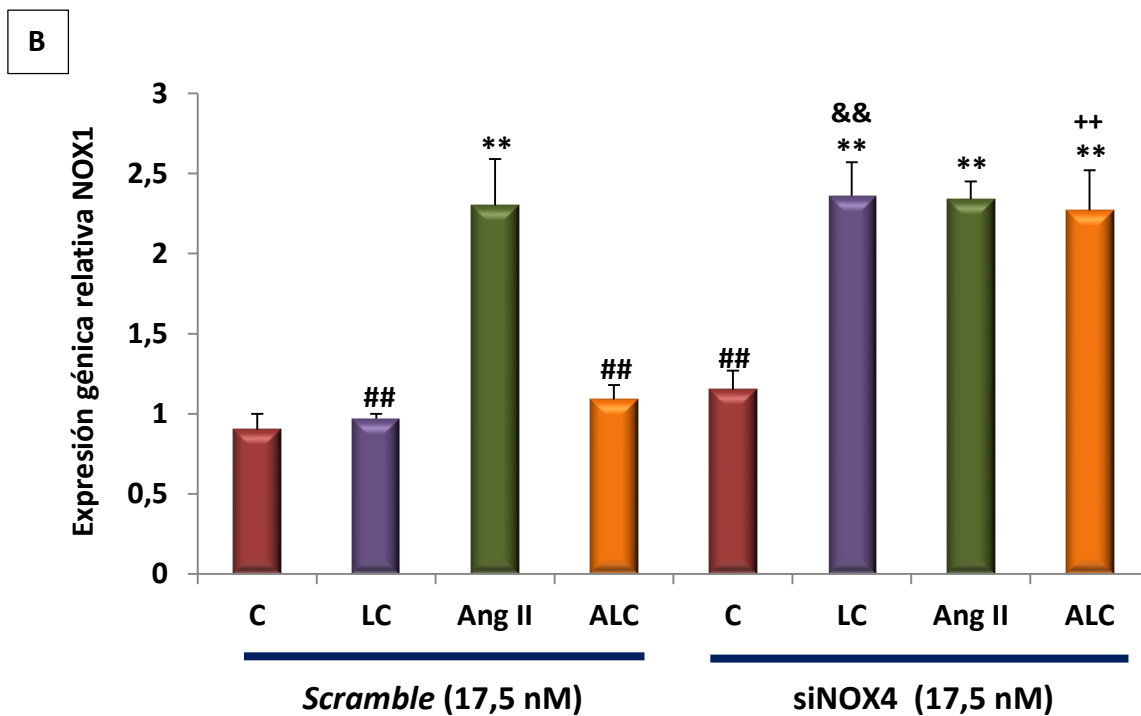
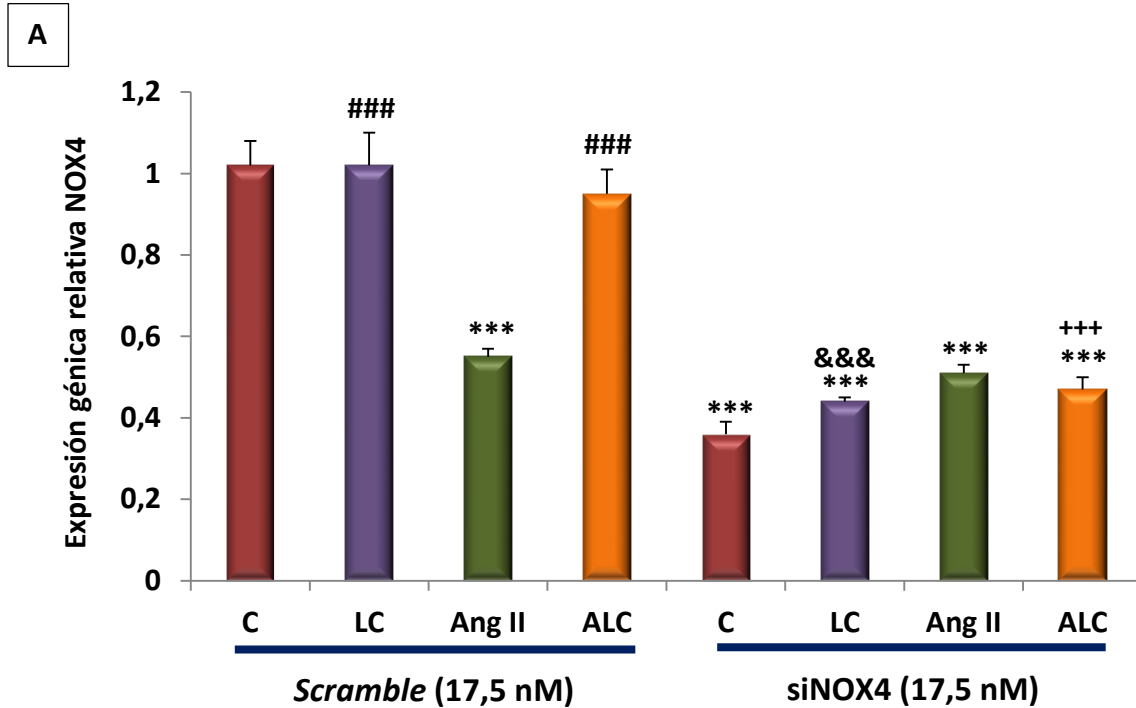


Figura 32: Efecto del inhibidor de NOX1 (2-acetilfenotiazina) sobre la actividad NADPH oxidasa en presencia L-carnitina (LC) y angiotensina II (Ang II). Las células fueron tratadas durante 24 horas con 100 nM de Ang II (Ang II) o 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Significación estadística: *** p <0,001 comparado con C; ### p <0,001 comparado con Ang II; +++ p <0,001 comparado con ALC.

El silenciamiento de NOX4 redujo la expresión génica de esta proteína aproximadamente un 50% en los cuatro grupos experimentales de células (Figura 33A), aumentando la expresión génica de NOX1 (Figura 33B) y NOX2 (Figura 33C) en los grupos tratados con LC.



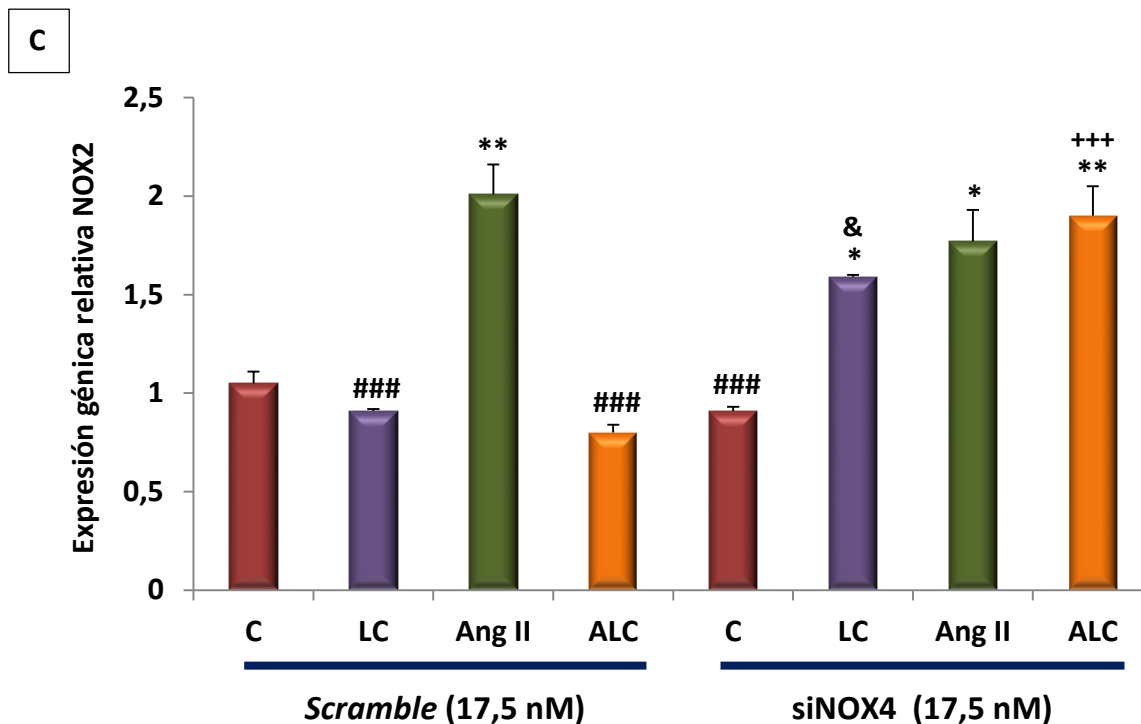


Figura 33: Efecto del silenciamiento de NOX4 sobre la expresión génica de las isoformas NOX4 (A), NOX1 (B) y NOX2 (C) de la NADPH oxidasa. Las células fueron tratadas durante 24 horas con 100 nM de Ang II (Ang II), 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. Todas las condiciones se trataron con un *scramble* (Src) o con el siRNA de NOX4, según se detalla en el apartado 3.9 de la sección *Materiales y Métodos*. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con C+Src; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparado con Ang II+Src; & $p < 0,05$, & $p < 0,01$, && $p < 0,001$ comparado con LC+Src; ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ comparado con ALC+Src.

Al realizar el silenciamiento de NOX4, y a diferencia de lo observado con el silenciamiento de NOX2 (Figura 30), observamos que no existían diferencias significativas en la producción de anión superóxido (al comparar los grupos sometidos a silenciamiento con respecto a sus respectivos grupos sin silenciar), excepto en el caso de células controles, grupo en el cual se produjo una disminución en la producción del anión superóxido tras el silenciamiento de NOX4 (Figura 34).

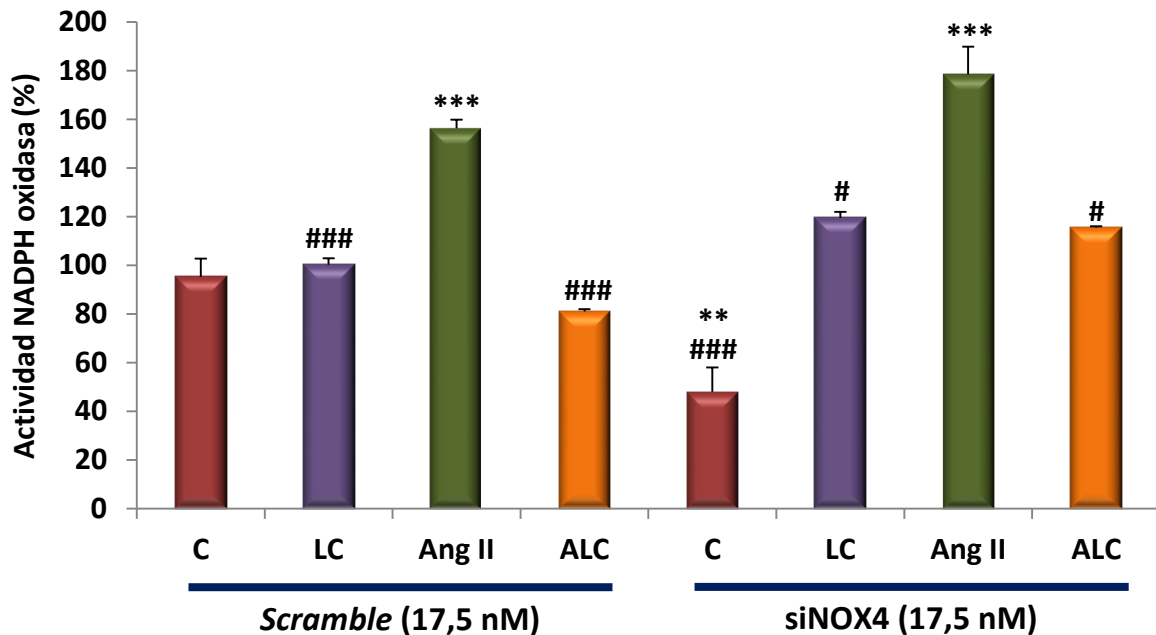


Figura 34: Efecto del silenciamiento de NOX4 sobre la actividad NADPH oxidasa. Las células fueron tratadas durante 24 horas con 100 nM de Ang II (Ang II), 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. Todas las condiciones se trataron con un *scramble* (Src) o con el siRNA de NOX4. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con C+Src; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparado con Ang II+Src.

Por otro lado, las células tratadas con siNOX4 y estimuladas con Ang II presentaron una disminución en la producción de H₂O₂ al comparar con su correspondiente grupo sin silenciamiento (Figura 35).

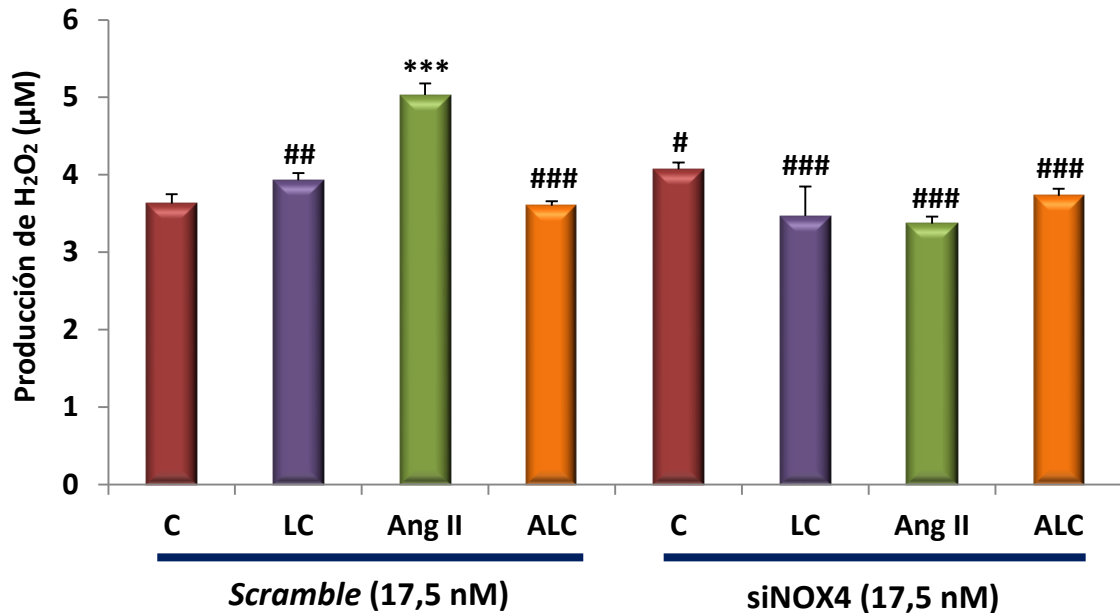


Figura 35: Efecto del silenciamiento de NOX4 sobre la producción de H₂O₂. Las células fueron tratadas durante 24 horas con 100 nM de Ang II (Ang II), 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. Todas las condiciones se trataron con un *scramble* (Src) o con el siRNA de NOX4. El histograma representa la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: ***p<0,001 comparado con C+Src; #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 comparado con Ang II+Src.

2. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR INVOLUCRADAS EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA POR L-CARNITINA

2.1. EFECTO DE LA WORTMANINA, SB203580, PD98059 Y BIS I SOBRE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA.

2.1.1. EFECTO DE LA WORTMANINA, SB203580, PD98059 Y BIS I SOBRE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II

Para determinar las vías de señalización intracelular implicadas en la activación de la NADPH oxidasa por Ang II, las células NRK-52E fueron preincubadas con wortmanina (inhibidor de la vía PI3K/Akt), SB203580 (inhibidor de p38 MAPK), PD98059 (inhibidor de ERK_{1/2}) y BIS I (inhibidor de la proteína quinasa C), durante 1 minuto justo antes de la estimulación con Ang II (apartado 3.2.2., sección *Material y Métodos*). Todos los inhibidores actuaron previniendo el incremento de la actividad NADPH oxidasa inducido por Ang II (Figura 36). Por ello, podemos concluir que la activación de la NADPH oxidasa inducida por Ang II es mediada por las vías PI3K/Akt, p38MAPK, ERK_{1/2} y PKC.

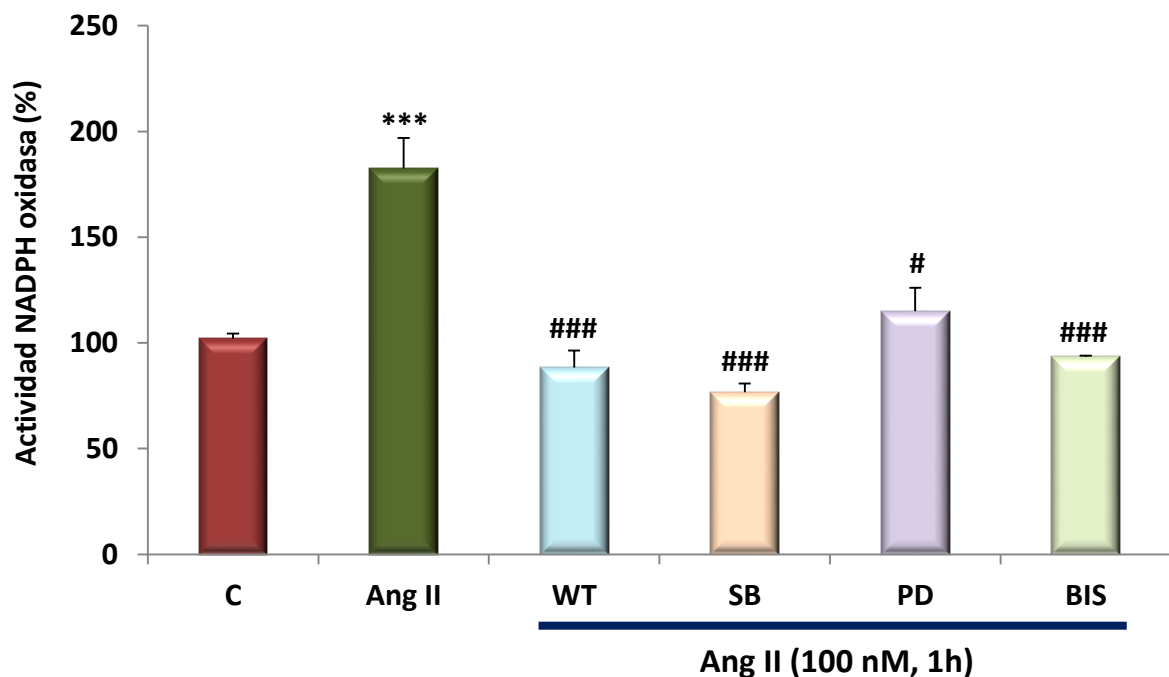


Figura 36: Efecto de la wortmanina, SB203580, PD98059 y BIS I sobre la actividad de la NADPH oxidasa estimulada por angiotensina II (Ang II). Las células fueron tratadas con 100 nM de Ang II durante 1 hora, sola (Ang II) o en combinación con 1 μ M de wortmanina (WT), SB203580 (SB), PD98059 (PD), o bisindolilmaleimida I (BIS I). C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con C; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ comparado con Ang II.

2.1.2. EFECTO DE LA WORTMANINA, SB203580, PD98059 Y BIS I SOBRE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA EN CÉLULAS TRATADAS CON ANGIOTENSINA II Y L-CARNITINA

Para estudiar las vías de señalización implicadas en el efecto de la LC sobre la actividad NADPH oxidasa inducida por Ang II, se diseñaron experimentos en los cuales las células tratadas con Ang II y LC (ALC) fueron a su vez sometidas a la incubación con los 4 inhibidores de las vías intracelulares mencionados en el apartado anterior. Los resultados indican que la presencia de SB203580 y PD98059 no modificó la actividad de la enzima con respecto a lo observado en el grupo ALC. Por el contrario, la preincubación con wortmanina y BIS I produjo una recuperación en la actividad de la enzima, obteniéndose valores muy similares a los observados en células incubadas con Ang II (Figura 37).

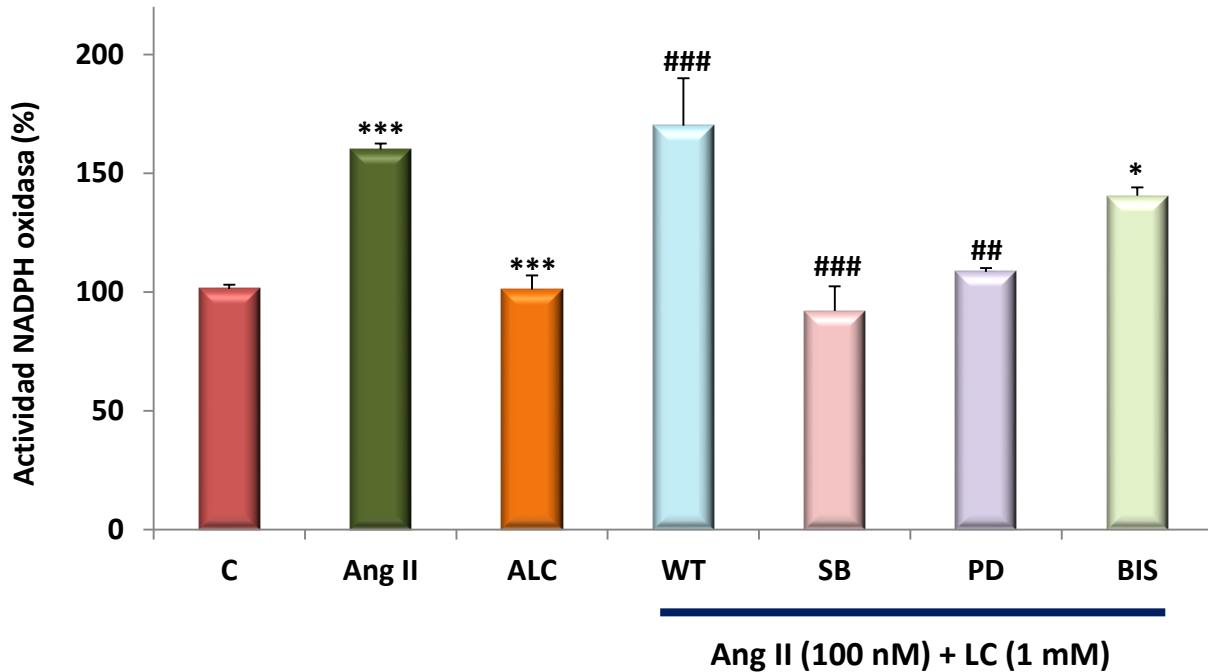


Figura 37: Efecto de la wortmanina, SB203580, PD98059 y BIS I sobre la actividad NADPH oxidasa en células tratadas con L-carnitina (LC) y angiotensina II (Ang II). Las células fueron tratadas durante 1 hora con 100 nM de Ang II (Ang II) o 100 nM de Ang II más 1 mM de LC, solas (ALC) o en combinación con 1 μ M de wortmanina (WT), SB203580 (SB), PD98059 (PD), o bisindolilmaleimida I (BIS I). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ comparado con C; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparado con Ang II.

2.2. EFECTO DE LA ANGIOTENSINA II Y LA L-CARNITINA SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LAS PROTEÍNAS AKT, p38 MAPK Y ERK_{1/2}

2.2.1. CINÉTICA DE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA AKT INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II

La incubación de las células NRK-52E con Ang II incrementó la fosforilación de la proteína Akt después de 15, 30 y 45 minutos de estimulación (Figura 38).

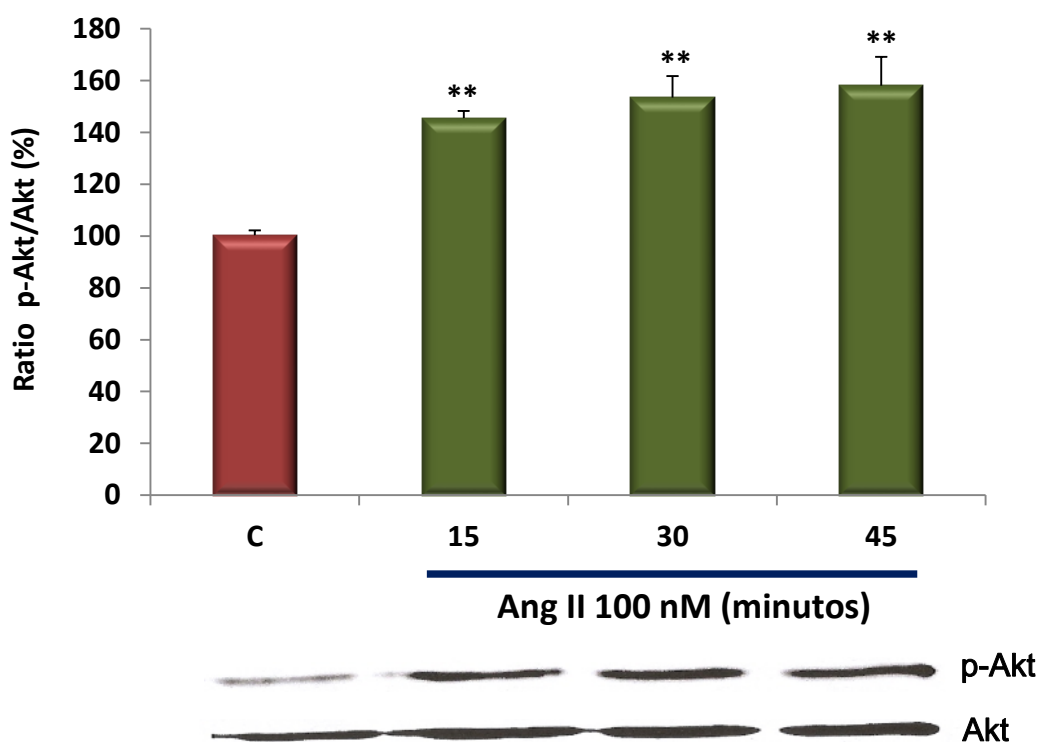


Figura 38: Fosforilación tiempo-dependiente de la proteína Akt inducida por angiotensina II (Ang II). C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: ** $p < 0,01$ comparado con C.

2.2.2. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA AKT EN CÉLULAS ESTIMULADAS CON ANGIOTENSINA II

Tras fijar el tiempo de incubación con Ang II (15 minutos) para obtener una fosforilación óptima de Akt, estimulamos las células NRK-52E en presencia y ausencia de LC. Como puede observarse en la Figura 39, la incubación con LC no produce una reducción en la fosforilación de Akt inducida por Ang II.

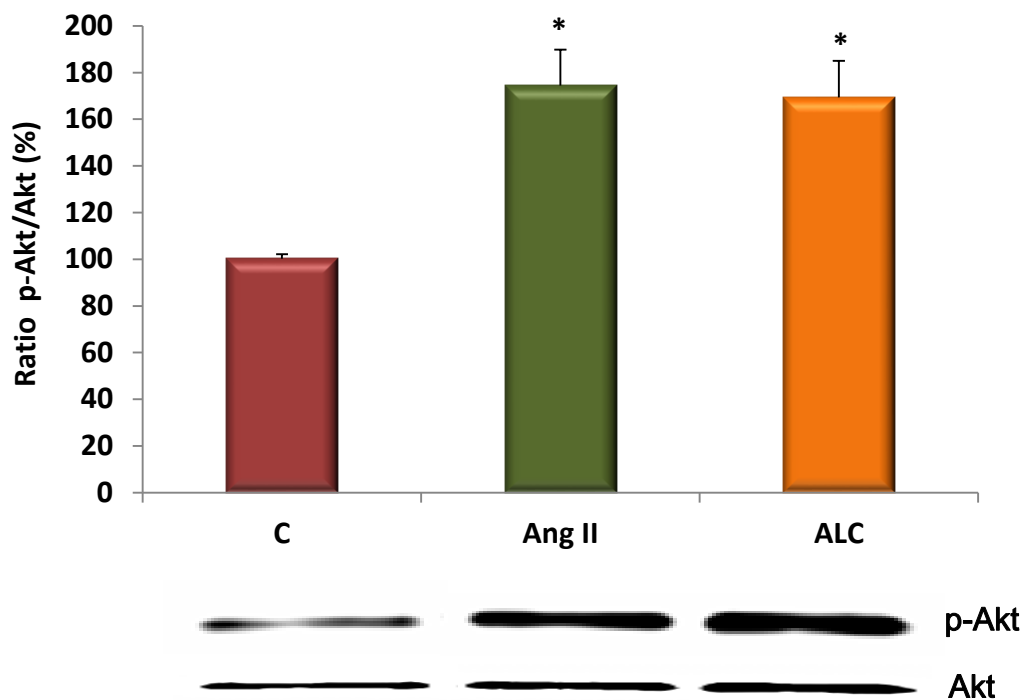


Figura 39: Efecto de la angiotensina II (Ang II) y de la L-carnitina (LC) sobre la fosforilación de la proteína Akt. Las células fueron tratadas durante 15 min con 100 nM de Ang II (Ang II) o 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: * $p < 0,05$ comparado con C.

Por otro lado, observamos cómo las células incubadas únicamente con LC también presentaron un aumento de la fosforilación de la proteína Akt, fosforilación que no fue inhibida en presencia de wortmanina (Figura 40).

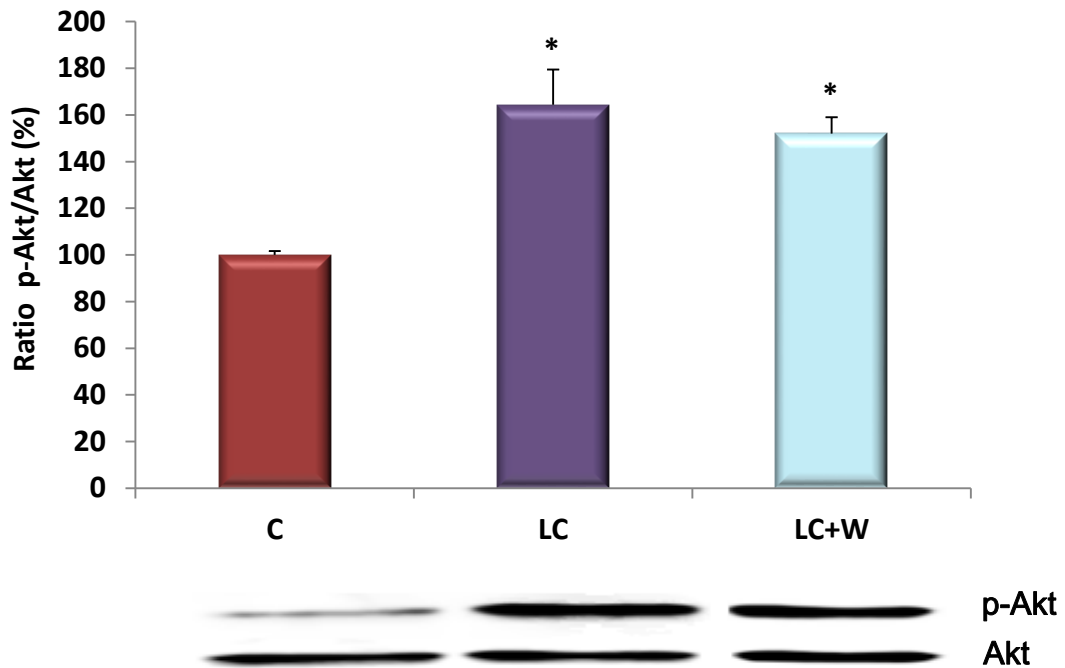


Figura 40: Efecto de la L-carnitina (LC) y de la wortmanina (W) sobre la fosforilación de la proteína Akt. Las células fueron tratadas con 1 mM de LC durante 15 minutos, sola (LC) o en combinación con 1 μ M de wortmanina (LC+W). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: * $p < 0,05$ comparado con C.

2.2.3. CINÉTICA DE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA p38 MAPK INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II

La incubación de las células NRK-52E con Ang II incrementó la fosforilación de la proteína p38 MAPK a los 15 minutos de estimulación. Pasado este tiempo, la proteína vuelve a desfosforilarse, como se demuestra en las mediciones realizadas a los 30 minutos y a los 45 de estimulación con Ang II (Figura 41).

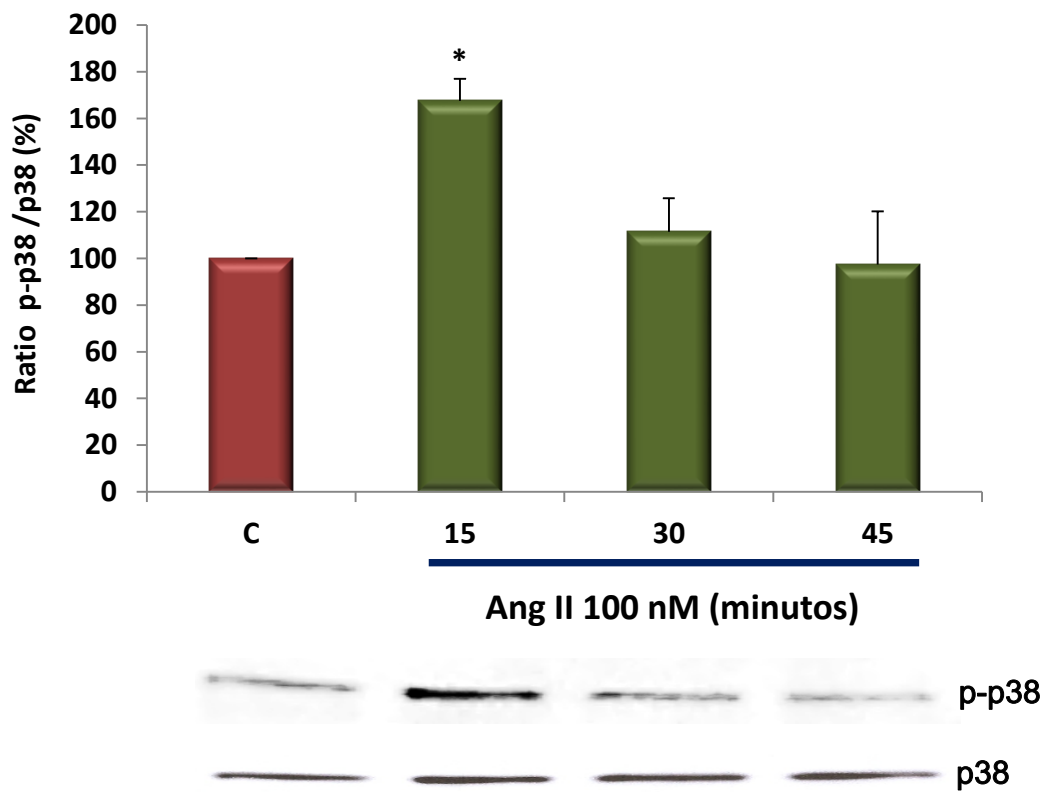


Figura 41: Fosforilación tiempo-dependiente de la proteína p38 MAPK inducida por angiotensina II (Ang II). C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: * $p < 0,05$ comparado con C.

2.2.4. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA p38 MAPK EN CÉLULAS TRATADAS CON ANGIOTENSINA II

Una vez definido el tiempo de incubación con Ang II (15 minutos) para obtener la máxima fosforilación de p38 MAPK, estimulamos las células NRK-52E en presencia y ausencia de LC, observándose que la incubación con LC no previno la fosforilación de p38 MAPK inducida por la Ang II (Figura 42).

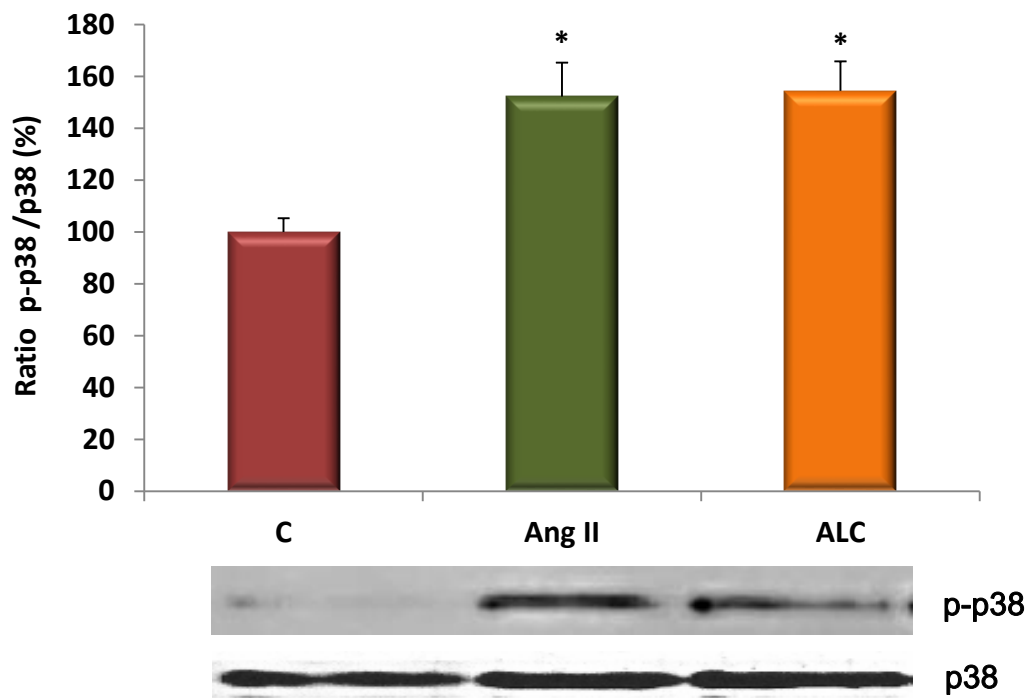


Figura 42: Efecto de la angiotensina II (Ang II) y de la L-carnitina (LC) sobre la fosforilación de la proteína p38 MAPK. Las células fueron tratadas durante 15 min con 100 nM de Ang II (Ang II) o 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: * $p < 0,05$ comparado con C.

2.2.5. CINÉTICA DE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA ERK_{1/2} INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II

La incubación de las células NRK-52E con Ang II incrementó la fosforilación de la proteína ERK_{1/2} tras 15 minutos de estimulación. Esta fosforilación fue aumentando con el tiempo, alcanzándose el máximo tras 45 minutos de estimulación (Figura 43).

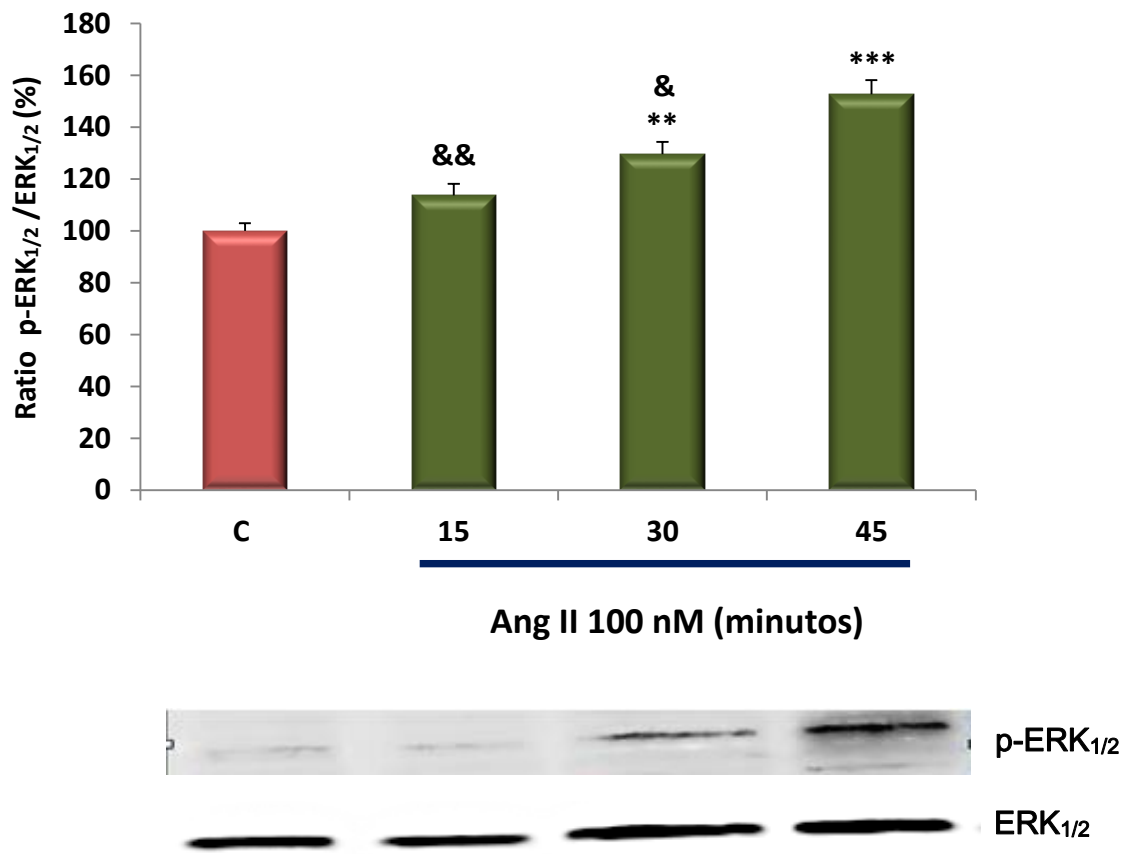


Figura 43: Fosforilación tiempo-dependiente de la proteína p-ERK_{1/2} por angiotensina II (Ang II). C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con C; & $p < 0,05$, && $p < 0,01$ comparado con Ang II 45 min.

2.2.6. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA ERK_{1/2} EN CÉLULAS TRATADAS CON ANGIOTENSINA II

Tras fijar en 45 minutos la exposición de las células a Ang II para la obtención de una máxima fosforilación de la proteína ERK_{1/2}, estimulamos las células NRK-52E en presencia y ausencia de LC. Al igual que en los casos anteriores (Figuras 39 y 42), la incubación con LC no modificó la fosforilación de ERK_{1/2} inducida por la Ang II (Figura 44).

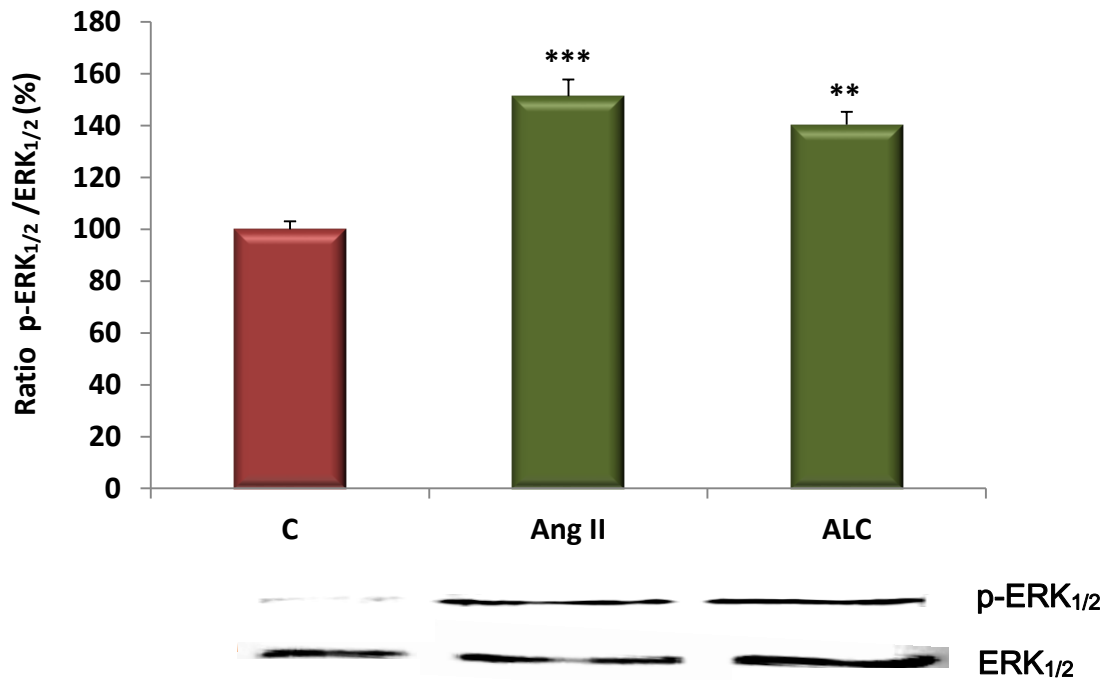


Figura 44: Efecto de la angiotensina II (Ang II) y de la L-carnitina (LC) sobre la fosforilación de la proteína ERK_{1/2}. Las células fueron tratadas durante 45 min con 100 nM de Ang II (Ang II) o 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con C.

2.3. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA QUINASA C (PKC) EN CÉLULAS ESTIMULADAS CON ANGIOTENSINA II

La adición de Ang II a la línea celular NRK-52E indujo un aumento (1,5 veces) de la actividad de la PKC con respecto a las células no estimuladas. El tratamiento con LC fue capaz de restaurar la actividad de esta proteína hasta valores similares a aquellos obtenidos en células no estimuladas. Las células tratadas únicamente con LC no mostraron cambio alguno en la actividad PKC con respecto a los valores basales observados en las células controles (Figura 45).

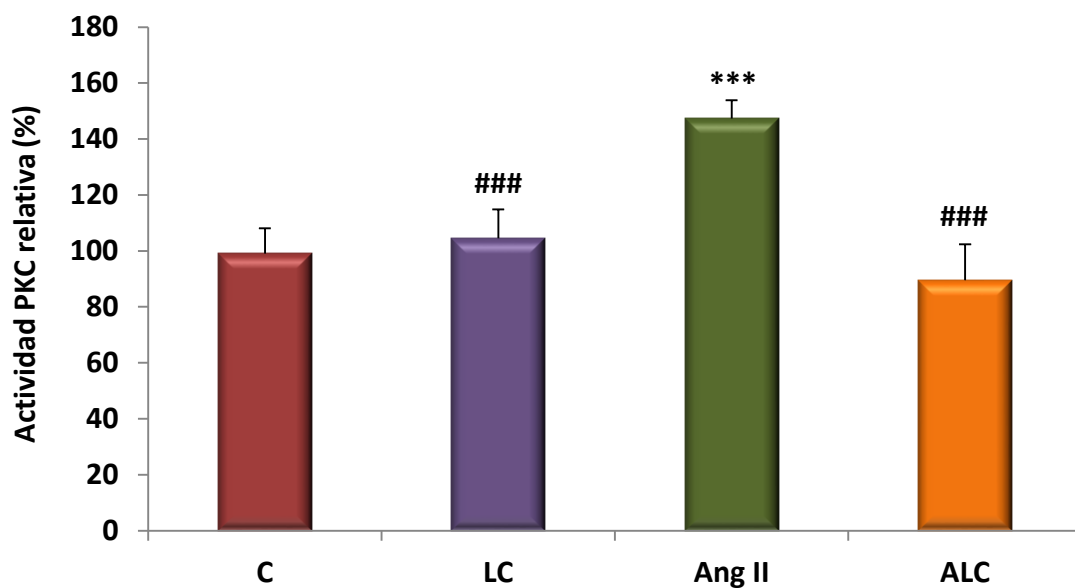


Figura 45: Efecto de la angiotensina II (Ang II) y de la L-carnitina (LC) sobre la actividad de la proteína PKC. Las células fueron tratadas durante 30 minutos con 100 nM de Ang II (Ang II), 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con C; ### $p < 0,001$ comparado con Ang II.

2.4. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA TRANSLOCACIÓN DEL NF-KB HACIA EL NÚCLEO

2.4.1. CINÉTICA DE LA TRANSLOCACIÓN DEL COMPLEJO NF-kB INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II

La presencia de Ang II en las células NRK-52E triplicó la tasa de translocación de la proteína NF-kB hacia el núcleo tras 40 minutos de exposición. La translocación también se estimula a los 20 minutos, si bien en menor medida. Pasados los 40 minutos de incubación, este aumento en la translocación de NF-kB desaparece (Figura 46).

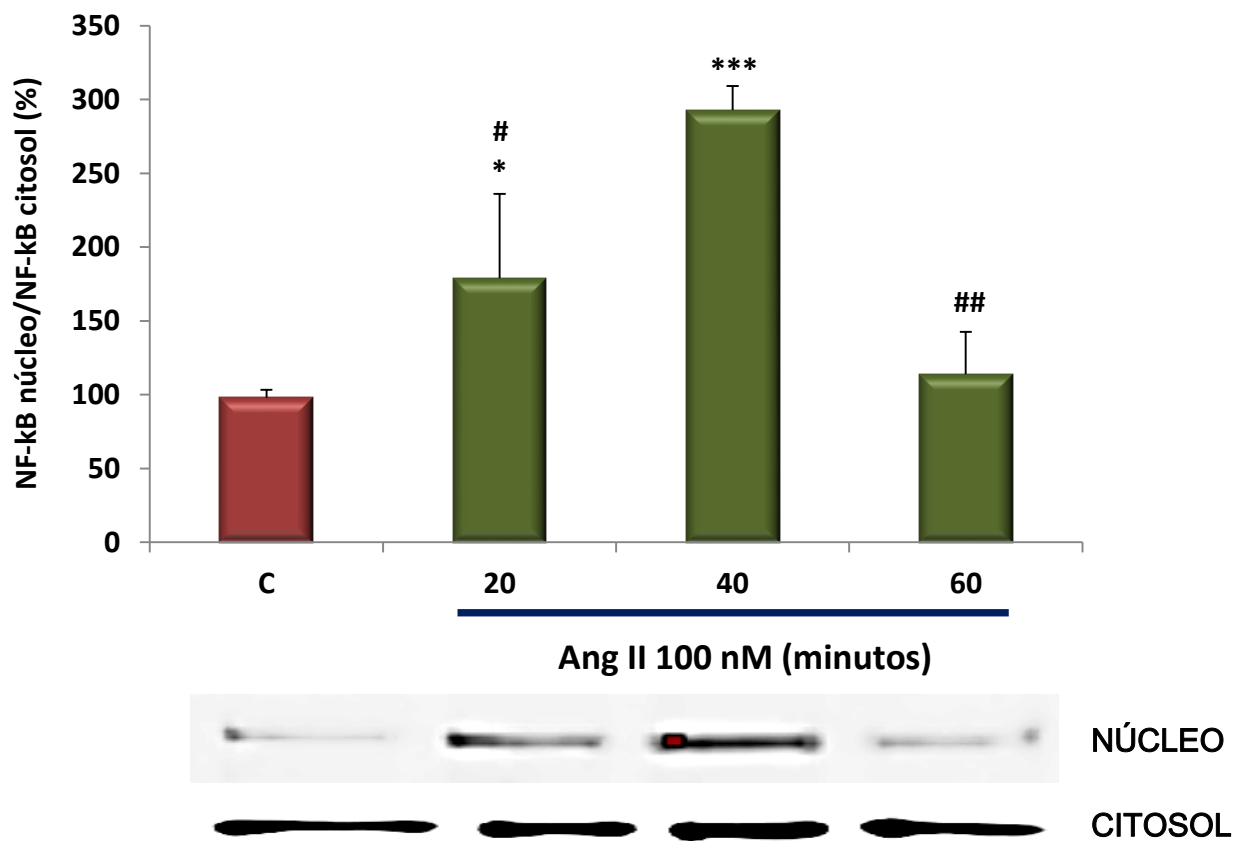


Figura 46: Translocación tiempo-dependiente de la proteína NF-kB inducida por angiotensina II (Ang II). C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ comparado con C; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ comparado con Ang II 40 min.

2.4.2. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA TRANSLOCACIÓN DEL COMPLEJO NF-KB HACIA EL NÚCLEO EN CÉLULAS TRATADAS CON ANGIOTENSINA II

En la Figura 47 se muestra cómo la LC es capaz de inhibir la translocación de la proteína NF-kB al interior inducida por Ang II. Por el contrario, la adición de LC a células controles no modifica la translocación de la proteína con respecto a los valores observados en las células sin estimular.

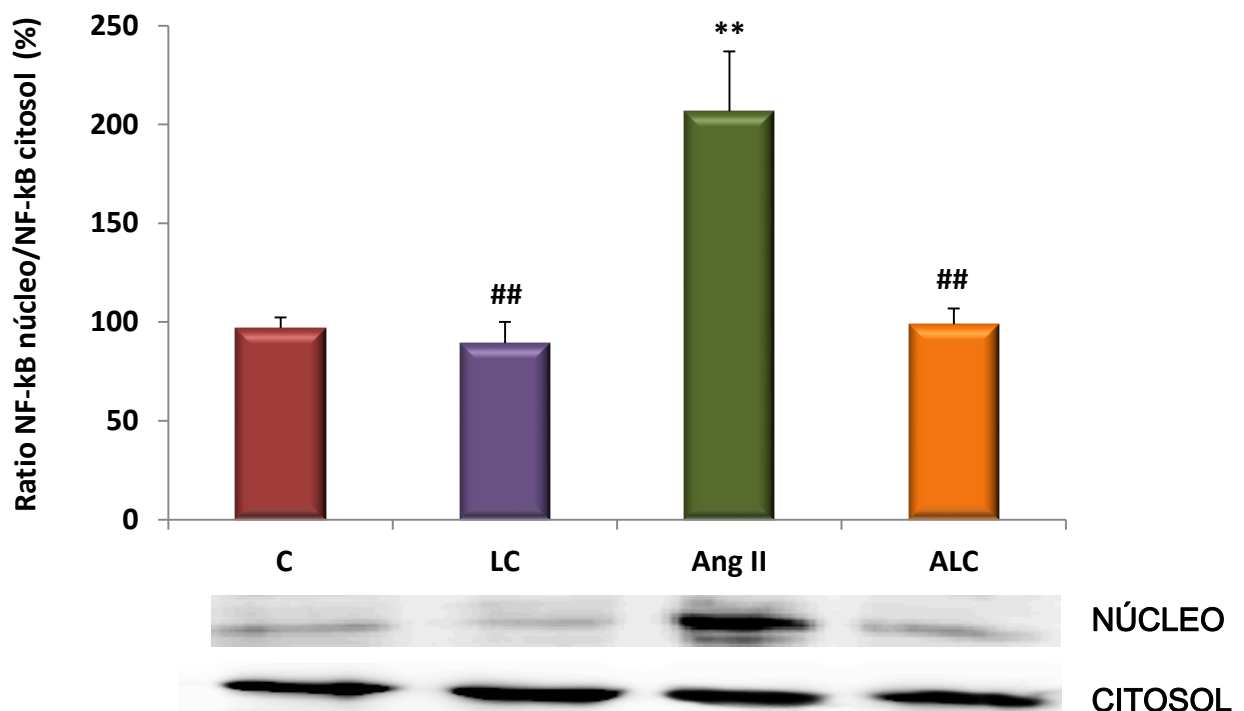


Figura 47: Efecto de la L-carnitina (LC) sobre la translocación del complejo NF-kB inducida por angiotensina II (Ang II). Las células fueron tratadas durante 40 minutos con 100 nM de Ang II (Ang II), 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. El histograma representa la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Significación estadística: ** $p < 0,01$ comparado con C; ## $p < 0,01$ comparado con Ang II.

2.4.3. EFECTO DE LA L-CARNITINA EN LA FOSFORILACIÓN DE α -I κ B INDUCIDA POR ANGIOTENSINA II

La Ang II provocó un aumento en la fosforilación de α -I κ B con respecto a las células controles. La incubación con LC fue capaz de revertir el efecto de la Ang II, y no ejerció efecto alguno en células controles no estimuladas con Ang II (Figura 48).

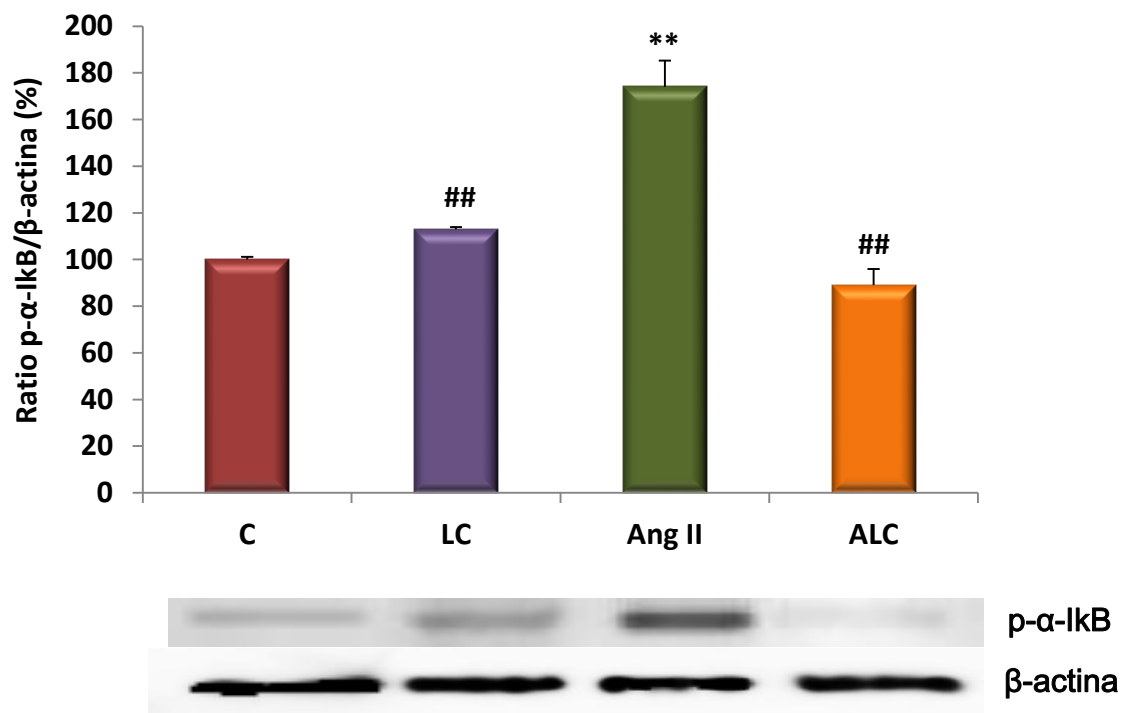


Figura 48: Efecto de la L-carnitina (LC) sobre la fosforilación de la proteína α -I κ B inducida por angiotensina II (Ang II). Las células fueron tratadas durante 40 minutos con 100 nM de Ang II (Ang II), 100 nM de Ang II más 1 mM de LC (ALC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: ** $p < 0,01$ comparado con C; ## $p < 0,01$ comparado con Ang II.

3. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LOS MECANISMOS FIBRÓTICOS INDUCIDOS POR TGF β . ESTUDIO DE LA NADPH OXIDASA, PROTEÍNAS SMAD Y METALOPROTEINASAS.

3.1. EFECTO DEL TGF β SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO. CARACTERIZACIÓN DE LA FUENTE DE O $_2^-$ EN RESPUESTA A TGF β .

Estudios realizados en células NRK-52E por Baltanas y cols.,¹⁴² mostraron un aumento en la producción de anión superóxido mediado por TGF β , siendo este aumento dependiente del tiempo de estimulación (máximo a 24 horas) y de la concentración de TGF β . Tomado este estudio como referencia, establecemos la concentración de TGF β en 10 ng/mL, y el tiempo de incubación en 24 horas para los experimentos a realizar.

Para determinar la fuente enzimática de O $_2^-$ en respuesta a la estimulación con TGF β , se analizó la generación de O $_2^-$ en células NRK-52E en presencia de oxipurinol, rotenona, difenil-eno-iodonio y superóxido dismutasa, de manera análoga a lo descrito en el apartado 1.2.

La incubación con DPI atenuó completamente el aumento en la producción de O $_2^-$ inducida por TGF β . En caso contrario, los tratamientos con oxipurinol y rotenona no tuvieron efecto alguno, identificándose por tanto a la NADPH oxidasa como fuente del O $_2^-$ generado. Además, la presencia de SOD inhibe la generación de O $_2^-$ inducida por TGF β en células NRK-52E (Figura 49), concluyendo que el O $_2^-$ es la especie reactiva de oxígeno detectada por la lucigenina.

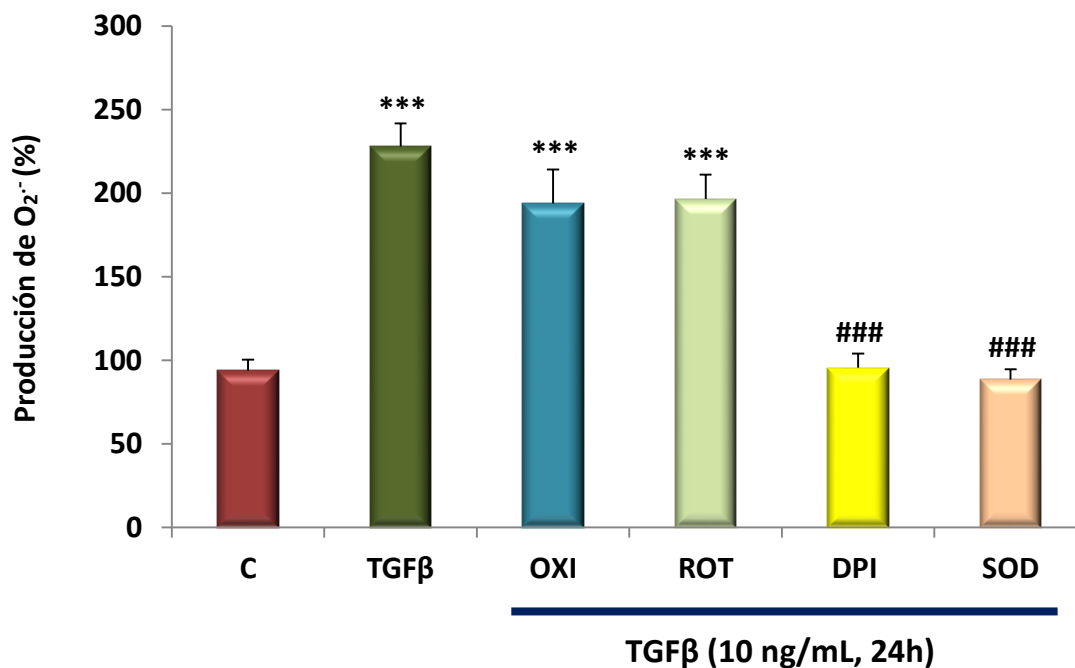


Figura 49: Caracterización de la fuente de O₂^{•-} en células NRK-52E tratadas con TGFβ durante. Las células fueron tratadas con 10 ng/mL de TGFβ durante 24 horas, solo (TGFβ) o en combinación con 0,1 mM de oxipurinol (OXI), rotenona (ROT), DPI (DPI), o 100 U/mL de enzima superóxido dismutasa (SOD). C = células controles sin estimular. El histograma representa la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: ***p<0,001 comparado con C; ###p<0,001 comparado con TGFβ.

3.2. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA EN CÉLULAS ESTIMULADAS CON TGFβ

3.2.1. ENSAYO CONCENTRACIÓN-RESPUESTA PARA LA L-CARNITINA

Tras incubar las células NRK-52E con TGFβ, se observó que la LC es capaz de atenuar la producción de O₂^{•-} a concentraciones iguales o superiores a 0,1 mM (Figura 50). La dosis 1 mM fue elegida para la realización de los experimentos subsiguientes.

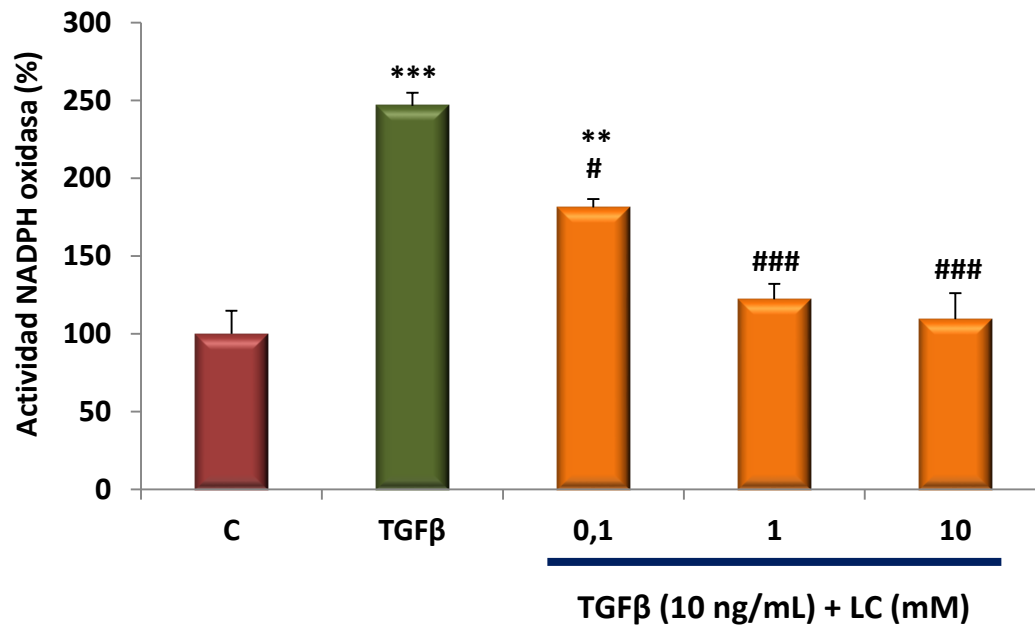


Figura 50: Ensayo concentración-respuesta para L-carnitina (LC) en células NRK-52E tratadas con TGFβ durante 24 horas. Las células fueron tratadas con 10 ng/mL de TGFβ durante 24 horas, solo (TGFβ) o en combinación con una preincubación de 30 minutos de LC a las concentraciones indicadas (0,001 – 10 mM). C = células controles sin estimular. El histograma representa la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con C; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ comparado con TGFβ.

3.2.2. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA ESTIMULADA POR TGFβ

La LC a concentración de 1 mM fue capaz de contrarrestar el efecto estimulador del TGFβ sobre la actividad de la enzima NADPH oxidasa. Sin embargo, la administración de LC a células controles no produjo ningún efecto en la actividad NADPH oxidasa (Figura 51).

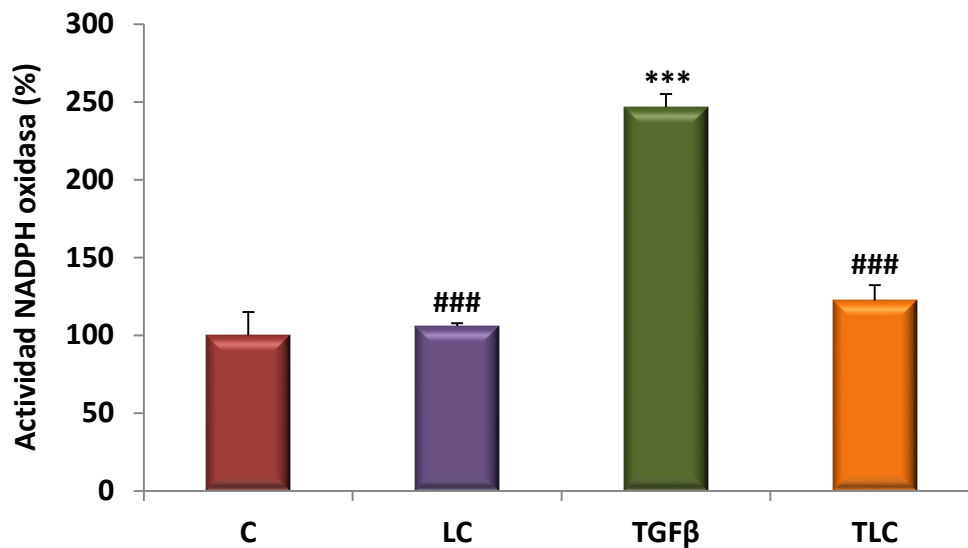
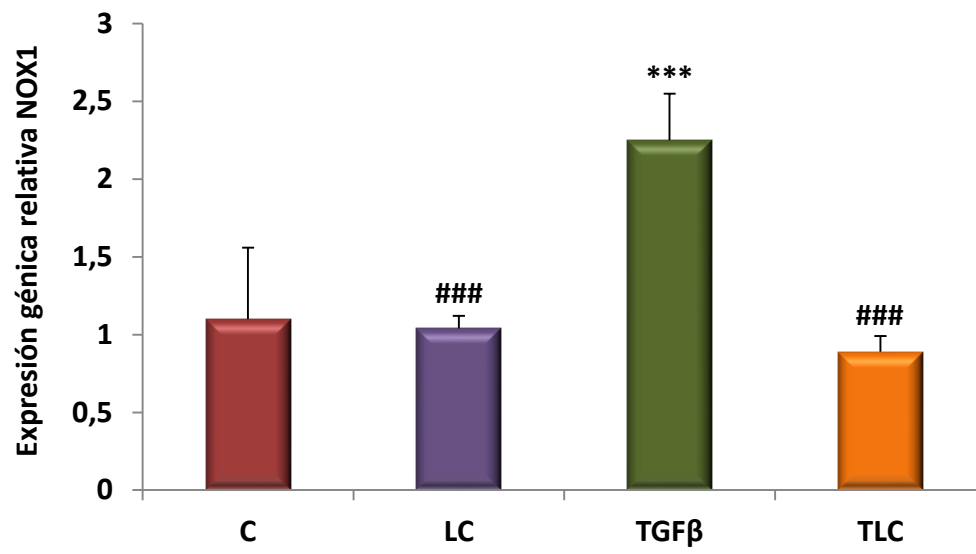


Figura 51: Efecto de la L-carnitina (LC) sobre la actividad NADPH oxidasa tras la estimulación con TGFβ 10 ng/mL durante 24 horas. Las células fueron tratadas durante 24 horas con 10 ng/mL de TGFβ (TGFβ), 10 ng/mL de TGFβ más 1 mM de LC (TLC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: ***p<0,001 comparado con C; ###p<0,001 comparado con TGFβ.

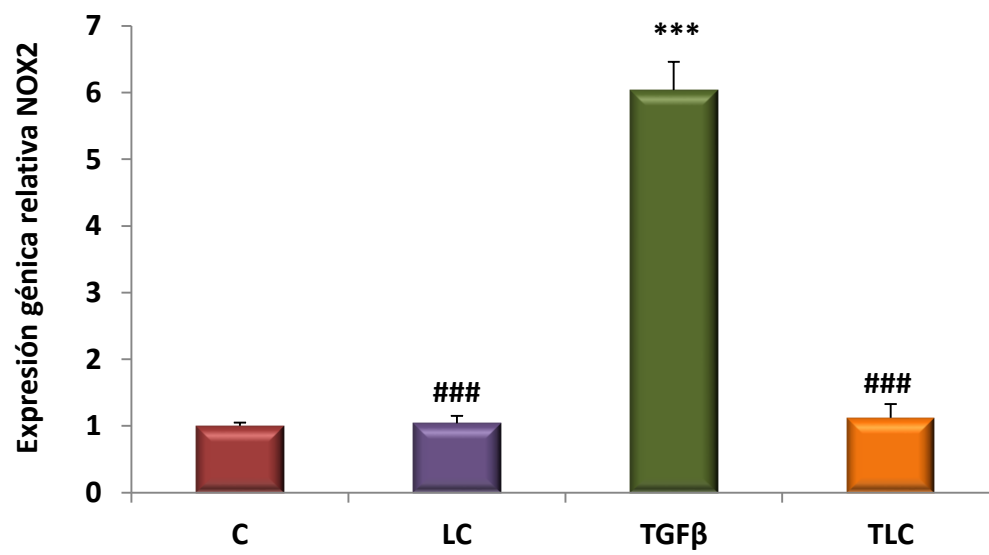
3.3. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS ISOFORMAS NOX1, NOX2 Y NOX4 DE LA NADPH OXIDASA

El tratamiento con TGFβ indujo la expresión génica de las isoformas NOX1, NOX2 y NOX4 de la NADPH oxidasa (2,2, 6 y 3 veces, respectivamente). La preincubación con LC restauró estos valores a niveles de células no tratadas. En todos los casos, la administración de LC en células controles no provocó ningún cambio en la expresión génica de las 3 isoformas estudiadas (Figuras 52A, 52B y 52C).

A



B



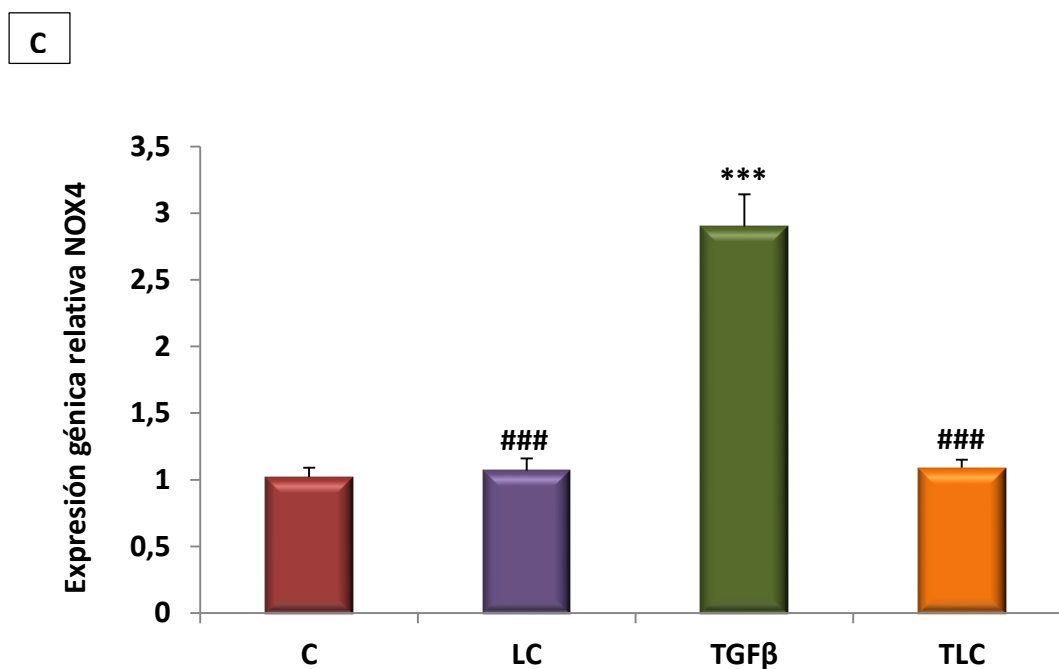


Figura 52: Efecto de la L-carnitina (LC) sobre la expresión génica de las isoformas NOX1 (A), NOX2 (B) y NOX4 (C) de la NADPH oxidasa en células tratadas con TGFβ. Las células fueron tratadas durante 24 horas con 10 ng/mL de TGFβ (TGFβ), 10 ng/mL de TGFβ más 1 mM de LC (TLC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. El histograma representa la media ± error estándar de 4 experimentos independientes. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con C; ### $p < 0,001$ comparado con TGFβ.

3.4. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE CTGF (MARCADOR DE FIBROSIS) INDUCIDA POR TGF β

El TGF β indujo la expresión génica de la proteína CTGF (factor de crecimiento de tejido conectivo), aumentándola casi 2 veces, confirmándose así que las células han adquirido un fenotipo fibrótico tras ser expuestas a TGF β (apartado 1.3.1 de la sección *Introducción*). La LC contrarrestó este incremento en la expresión de CTGF. Por otro lado, la administración de LC en células no tratadas no provocó ningún cambio en la expresión génica del marcador de fibrosis estudiado (Figura 53).

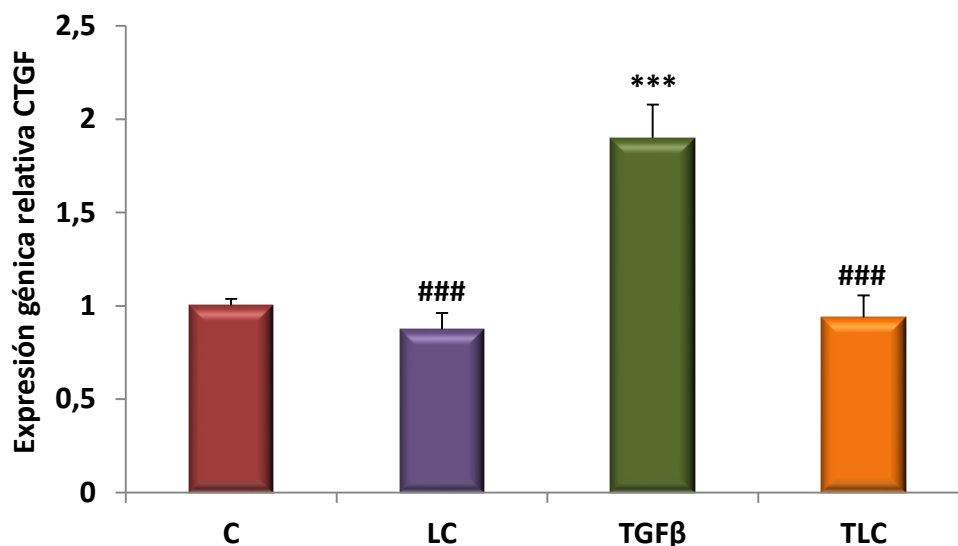


Figura 53: Efecto de la L-carnitina (LC) y TGF β en la expresión génica de CTGF. Las células fueron tratadas durante 24 horas con 10 ng/mL de TGF β (TGF β), 10 ng/mL de TGF β más 1 mM de LC (TLC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. El histograma representa la media \pm error estándar de 4 experimentos independientes. Significación estadística: *** p <0,001 comparado con C; ### p <0,001 comparado con TGF β .

3.5. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA SMAD2 INDUCIDA POR TGF β

Las células de la línea celular NRK-52E estimuladas con TGF β mostraron un aumento significativo de la fosforilación de la proteína Smad2 al compararlo con el grupo control, un efecto que fue inhibido mediante la preincubación con LC (Figura 54).

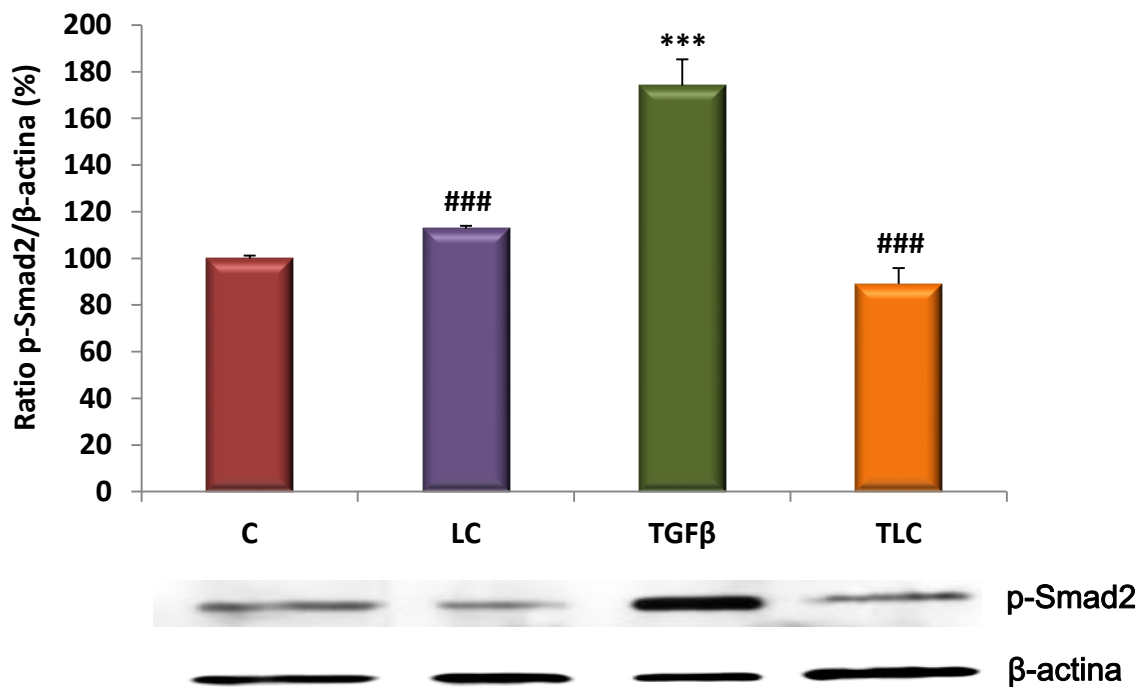


Figura 54: Efecto de la L-carnitina (LC) en la fosforilación de la proteína Smad2 inducida por TGF β . Las células fueron tratadas durante 24 horas con 10 ng/mL de TGF β (TGF β), 10 ng/mL de TGF β más 1 mM de LC (TLC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: *** p <0,001 comparado con C; ### p <0,001 comparado con TGF β .

3.6. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE EL SISTEMA DE DEGRADACIÓN DE COLÁGENO

3.6.1. ESTUDIOS IN VIVO

3.6.1.1. EFECTO DE LA L-CARNITINA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MMP-9 EN CORTEZA RENAL DE RATAS HIPERTENSAS

El tratamiento de los animales con L-NAME (sustancia inductora de hipertensión por depleción de óxido nítrico; apartado 2.1. de la sección *Materiales y Métodos*) redujo la expresión génica de la MMP-9 (apartado 1.3.3. de la sección *Introducción*) en un 60%, alteración que fue corregida en las ratas hipertensas tratadas con LC. La administración de LC a ratas controles no provocó ningún cambio en la expresión génica de esta metaloproteinasas de la matriz extracelular (Figura 55).

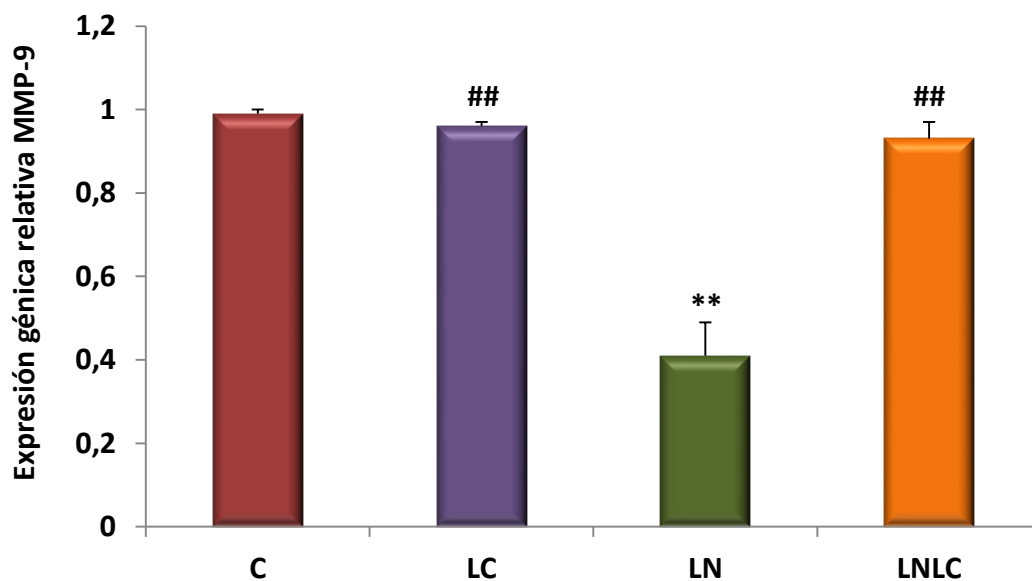


Figura 55: Efecto de la L-carnitina (LC) en la expresión génica de MMP-9 en corteza renal de ratas hipertensas. Las ratas fueron tratadas con 400 mg de LC /kg de peso/día (LC), con 25 mg de L-NAME /kg de peso/día (LN) o con L-NAME y LC (LNLC). C = ratas controles normotensas. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: ** $p < 0,01$ comparado con C; ## $p < 0,01$ comparado con LN.

3.6.1.2. EFECTO DE LA L-CARNITINA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE TIMP-1 EN CORTEZA RENAL DE RATAS HIPERTENSAS

La expresión de TIMP-1 (apartado 1.3.3. de la sección *Introducción*) se vio aumentada tras el tratamiento con L-NAME (1,8 veces); este aumento fue contrarrestado por la LC hasta llegar a los niveles de expresión propios de ratas controles. Como ocurrió anteriormente, la administración de LC a ratas controles no provocó ningún cambio en la expresión génica de TIMP-1 (Figura 56).

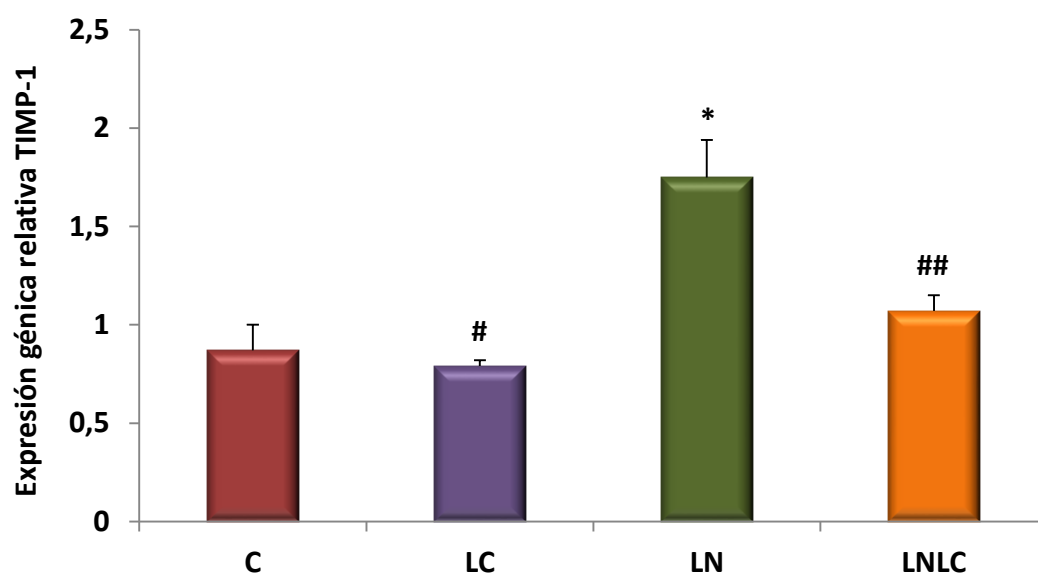


Figura 56: Efecto de la L-carnitina (LC) en la expresión génica de TIMP-1 en corteza renal de ratas hipertensas. Las ratas fueron tratadas con 400 mg de LC /kg de peso/día (LC), con 25 mg de L-NAME /kg de peso/día (LN) o con L-NAME y LC (LNLC). C = ratas controles normotensas. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: * $p < 0,05$ comparado con C; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ comparado con LN.

3.6.1.3. EFECTO DE LA L-CARNITINA EN EL RATIO MMP-9/TIMP-1 EN CORTEZA RENAL DE RATAS HIPERTENSAS.

A nivel de corteza renal el tratamiento con L-NAME en ratas produjo una disminución en la relación MMP-9/TIMP-1. El tratamiento con LC revierte este descenso, alcanzándose valores semejantes a muestras controles (Figura 57).

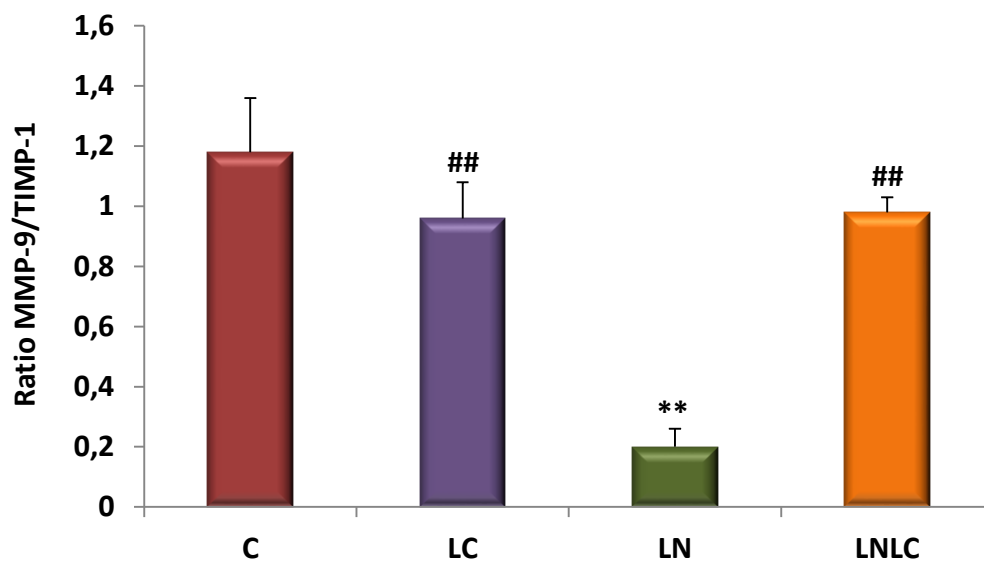


Figura 57: Efecto de la L-carnitina (LC) sobre el ratio MMP-9/TIMP-1 de corteza renal de ratas hipertensas. Las ratas fueron tratadas con 400 mg de LC /kg de peso/día (LC), con 25 mg de L-NAME /kg de peso/día (LN) o con L-NAME y LC (LNLC). C = ratas controles normotensas. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: ** $p < 0,01$ comparado con C; ## $p < 0,01$ comparado con LN.

3.6.2. ESTUDIOS IN VITRO

3.6.2.1. EFECTO DE LA L-CARNITINA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE MMP9 EN CÉLULAS NRK-52E

El tratamiento con TGF β no modificó la expresión génica de MMP-9. Sin embargo, las células que fueron tratadas con LC en presencia o ausencia de TGF β , sí mostraron una disminución significativa de la expresión génica de esta proteína (Figura 58).

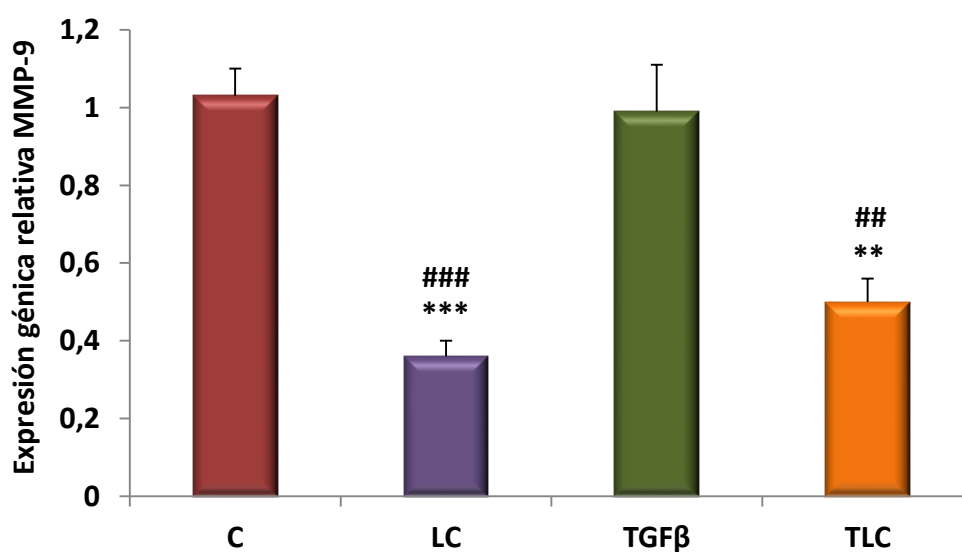


Figura 58: Efecto de la L-carnitina (LC) sobre la expresión génica de MMP-9 en células tratadas con TGF β . Las células fueron tratadas durante 24 horas con 10 ng/mL de TGF β (TGF β), 10 ng/mL de TGF β más 1 mM de LC (TLC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: **p<0,01, ***p<0,001 comparado con C; ##p<0,01, ###p<0,001 comparado con TGF β .

3.6.2.2. EFECTO DE LA L-CARNITINA EN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE TIMP-1 EN CÉLULAS NRK-52E

El tratamiento con TGF β aumentó la expresión génica de TIMP-1. Por el contrario, las células que fueron tratadas con LC, ya fuese en presencia o ausencia de TGF β , mostraron una disminución de la expresión génica de este inhibidor (Figura 59).

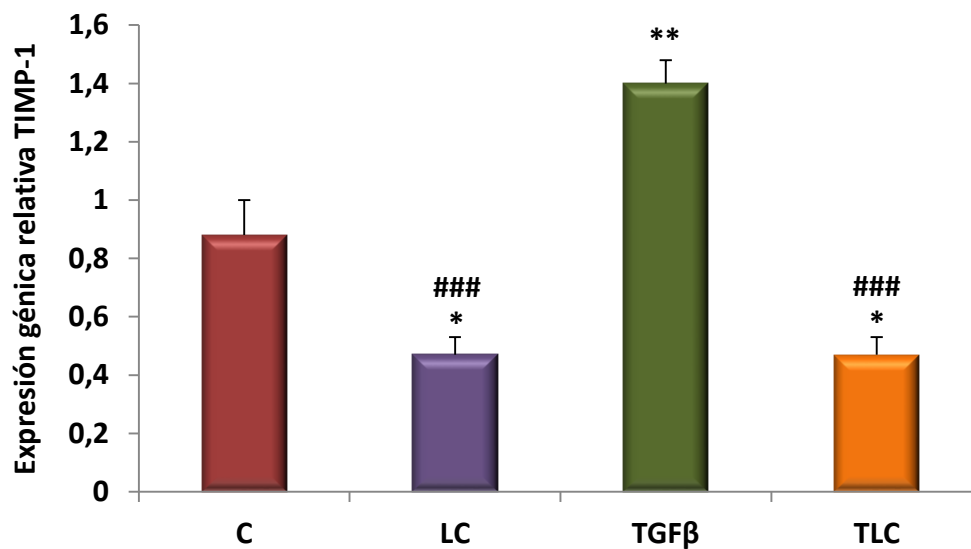


Figura 59: Efecto de la L-carnitina (LC) sobre la expresión génica de TIMP-1 en células tratadas con TGF β . Las células fueron tratadas durante 24 horas con 10 ng/mL de TGF β (TGF β), 10 ng/mL de TGF β más 1 mM de LC (TLC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: *p < 0,05, **p < 0,01 comparado con C; ###p < 0,001 comparado con TGF β .

3.6.2.3. EFECTO DE LA L-CARNITINA EN EL RATIO MMP-9/TIMP-1 EN CÉLULAS NRK-52E

En la línea celular NRK-52E, el tratamiento con TGF β produjo una disminución en el cociente MMP-9/TIMP-1. El tratamiento con LC revierte este descenso, alcanzándose valores semejantes a los obtenidos en condiciones controles (Figura 60).

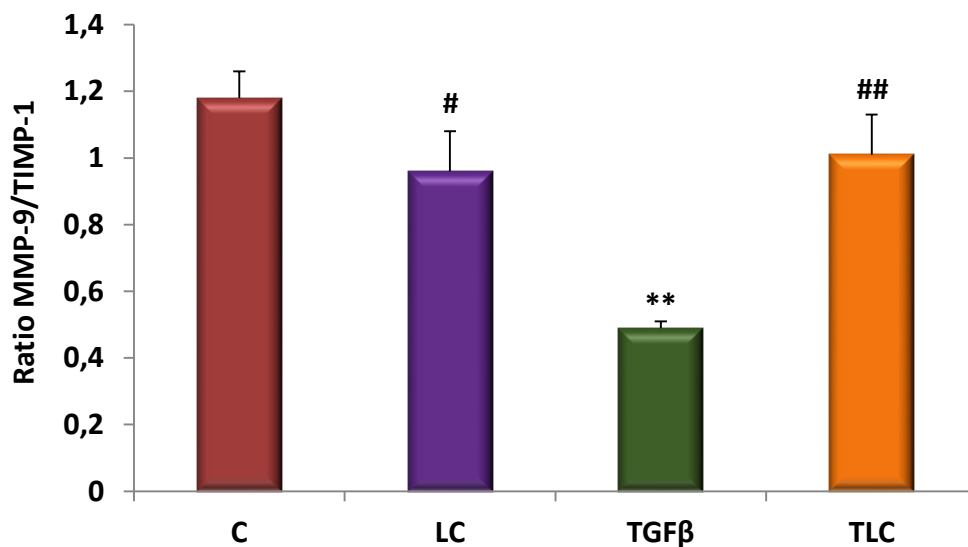


Figura 60: Efecto de la L-carnitina (LC) y del TGF β sobre el ratio MMP-9/TIMP-1 en la línea celular NRK-52E. Las células fueron tratadas durante 24 horas con 10 ng/mL de TGF β (TGF β), 10 ng/mL de TGF β más 1 mM de LC (TLC) o 1 mM de LC (LC). En aquellas células tratadas con LC, se realizó adicionalmente una preincubación de 30 minutos con la misma. C = células controles sin estimular. El histograma representa la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. Significación estadística: **p<0,01 comparado con C; #p<0,05, ##p<0,01 comparado con TGF β .

A decorative graphic consisting of a solid green horizontal bar at the top, and a grey horizontal bar below it that is partially offset to the right. The word "DISCUSIÓN" is centered in the grey bar.

DISCUSIÓN

1. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO GENERADO POR ANGIOTENSINA II A TRAVÉS DE LA NADPH OXIDASA: RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS

1.1 EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO GENERADO POR ANGIOTENSINA II A TRAVÉS DE LA NADPH OXIDASA

El estrés oxidativo juega un papel importante en la fisiopatología de muchas enfermedades renales, a través de mecanismos relacionados con la activación del sistema renina-angiotensina. Numerosos estudios muestran que la angiotensina II (Ang II) tiene un papel fundamental en el daño estructural y funcional del riñón derivado de la enfermedad cardiovascular, ya que genera estrés oxidativo a través del receptor AT1; de este modo, se activa la enzima NADPH oxidasa y se genera anión superóxido.^{9,34}

A raíz de estos antecedentes, y teniendo en cuenta la actividad antioxidante e hipotensora de la L-carnitina (LC) demostrada en nuestro laboratorio en los últimos años¹¹⁶, este trabajo se planteó para estudiar el efecto de la LC frente al estrés oxidativo generado por la Ang II en la línea celular NRK-52E, así como para determinar las posibles vías de señalización implicadas en tal efecto. Así, nuestros resultados sugieren que la LC inhibe el estrés oxidativo inducido por Ang II regulando la actividad y la expresión de la enzima NADPH oxidasa, pudiendo estar involucradas las vías de señalización de las proteínas Akt y PKC, y las del complejo NF- κ B.

En nuestros estudios realizados en la línea celular NRK-52E, la Ang II promueve un aumento en la producción de anión superóxido, siendo este incremento dependiente de tiempo y concentración, como ya ha sido descrito en otros tipos celulares¹⁴³⁻¹⁴⁵. Además, este aumento de anión superóxido provocado por Ang II es insensible al tratamiento con rotenona y oxipurinol, pero sí se inhibe completamente en presencia de DPI; esto sugiere que el anión superóxido formado procedería de la enzima NADPH oxidasa, tal y como ya se ha descrito anteriormente^{52,146}. Además, la Ang II no solo induce la actividad NADPH oxidasa, generándose más anión superóxido, sino que también aumenta los niveles de peróxido de hidrógeno y el grado de nitrosilación de proteínas (marcador de estrés

oxidativo); este incremento de peróxido de hidrógeno y nitrotirosina promovido por la Ang II ya había sido descrito en trabajos anteriores.¹⁴⁷⁻¹⁴⁹

La Ang II, además de modular la actividad de la enzima NADPH oxidasa, también modifica la expresión génica y proteica de dicha enzima. En nuestro caso, la Ang II aumenta la expresión génica y proteica de las isoformas NOX1 y NOX2, coincidiendo con estudios previos,¹⁴⁸⁻¹⁵¹ y reduce la expresión de NOX4, como ya se publicó en un estudio realizado en células de músculo liso por Dikalov y cols.¹⁴⁸ No obstante, hay que señalar que existe en la literatura una gran controversia respecto al efecto de la Ang II sobre la expresión de NOX4; así, existen estudios *in vitro* (en células de músculo liso vascular) e *in vivo* (en tejidos de aorta, riñón y corazón de animales hipertensos) que muestran un incremento de NOX4^{116,121,152-156}, mientras que otros autores no observan cambios en la expresión de la isoforma tras la exposición a Ang II.¹⁵⁴

Podemos concluir, pues, que el papel de NOX4 en la fisiopatología cardiovascular es contradictorio en la actualidad, ya que se han descrito tanto efectos adversos como protectores de esta isoforma.¹⁵⁷ Muchas investigaciones recientes muestran que NOX4 genera principalmente peróxido de hidrógeno en lugar de anión superóxido, en contraste con NOX1 y NOX2, que sí producen anión superóxido.¹⁴⁸ Esta característica apoyaría el efecto protector de NOX4 en la hipertensión arterial (HTA), ya que el peróxido de hidrógeno podría actuar como vasodilatador y compensar los efectos vasoconstrictores deletéreos del anión superóxido.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹

Nuestra molécula en estudio, la LC, ya había demostrado una acción antioxidante en modelos animales de hipertensión utilizados en el seno de nuestro grupo de investigación^{116,118}; en el caso que nos ocupa, la LC también ha demostrado poseer efectos antioxidantes beneficiosos *in vitro* sobre la línea celular NRK-52E. Además de contrarrestar la sobreproducción de anión superóxido procedente de la NADPH oxidasa - resultado ya descrito por otros autores en fibroblastos cardiacos-¹⁴⁰ la LC también neutraliza el incremento de peróxido de hidrógeno y nitrosilación de proteínas, atenuando de esta forma el estrés oxidativo inducido por la presencia de Ang II.

La LC no solo corrige la sobreproducción de radicales libres reduciendo la actividad de la NADPH oxidasa, sino que también normaliza la expresión génica y proteica de la

enzima. En concreto, la LC contrarresta el aumento producido por la Ang II en la expresión génica y proteica tanto de NOX1 como NOX2, así como el descenso de la isoforma NOX4. Este efecto de la LC puede apoyar la idea del papel protector de NOX4 mencionada anteriormente; de este modo, entre los efectos de la LC para reducir este estrés oxidativo no solo se encuentra una disminución de NOX1 y NOX2 (isoformas que generan anión superóxido y contribuyen pues al aumento del estrés oxidativo), sino también un aumento de NOX4 para contrarrestar el estrés oxidativo generado. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los cambios observados en la expresión de NOX4 no van acompañados por cambios en el mismo sentido en cuanto a la producción de peróxido de hidrógeno; este hecho sugiere, que el peróxido de hidrógeno medido en nuestro estudio proviene en mayor medida de la dismutación del anión superóxido, más que de la generación directa de H_2O_2 por parte de la isoforma NOX4.

Con el objetivo de profundizar en detalle en el efecto de la Ang II y LC sobre el estrés oxidativo derivado de la enzima NADPH oxidasa, estudiamos el papel de NOX1, NOX2 y NOX4 (que son las isoformas de esta enzima que se expresan en la línea celular NRK-52E) en la generación de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 , utilizando inhibidores específicos y técnicas de silenciamiento génico.

La inhibición de la producción de $O_2^{\cdot-}$ dependiente de NOX2 por gp91 ds-tat (inhibidor de NOX2) ya ha sido descrita en algunos estudios realizados en células NRK-52E tratadas con TGF β ¹⁴², y en plaquetas tratadas con colágeno ¹⁶⁰. En el estudio realizado con esta tesis, la producción de anión superóxido inducida por la Ang II se inhibe considerablemente en presencia de gp91 ds-tat, lo que sugiere que NOX2 está involucrada en el aumento de la producción de $O_2^{\cdot-}$ provocado por Ang II. El papel de NOX2 en el aumento de la producción de $O_2^{\cdot-}$ dependiente de Ang II también ha sido puesto de manifiesto en anillos de aorta de ratón y fibroblastos por Rey y cols. ¹⁶¹, y en cultivos primarios de neuronas procedentes de ratas Wistar-Kyoto (WKY), donde el aumento en la actividad NADPH oxidasa dependiente de Ang II fue también inhibido en presencia de gp91 ds-tat ¹⁶². Por otro lado, el hecho de que gp91 ds-tat no modifique la producción de $O_2^{\cdot-}$ en células NRK-52E no estimuladas (es decir, sin exposición a Ang II), podría indicar que NOX2 no está involucrada en la producción basal de superóxido. Resultados similares han sido obtenidos por Sun y cols. en neuronas ¹⁶².

Además de inhibir NOX2 con su inhibidor específico, gp91 ds-tat, también se han analizado las consecuencias del silenciamiento artificial de NOX2 mediante el uso de un siRNA específico de esta isoforma. A diferencia de los resultados obtenidos con gp91 ds-tat, cuando silenciamos NOX2 la producción de $O_2^{\cdot-}$ inducida por Ang II no solo no disminuye, sino que aumenta (a pesar de alcanzarse un grado de silenciamiento superior al 90%). Aunque aparentemente puedan parecer resultados contradictorios, este efecto podría explicarse mediante un cambio en las expresiones proteicas de NOX1 y NOX4, que se ven modificadas cuando las células son silenciadas y tratadas con Ang II. De hecho, está descrito que el uso de siRNA puede dar lugar a que se produzcan compensaciones en respuesta a la delección de los genes ¹⁶³.

En nuestro caso, la expresión de NOX1 aumenta en las células tratadas con siNOX2 y Ang II no solo con respecto a las células controles, sino también respecto de las células estimuladas con Ang II y con el gen NOX2 intacto. Además, la expresión de NOX4 también se modifica en las células sometidas a silenciamiento de NOX2, de forma que la reducción observada en la expresión de NOX4 en células tratadas con Ang II se recupera hasta los niveles de las células controles (con o sin silenciamiento de NOX2). En otros estudios en células endoteliales pulmonares y cardíacas en condiciones de hipoxia (situación bajo la cual aparece un aumento en la generación de ERO), se observó también un aumento en la expresión de NOX4 tras el silenciamiento de NOX2 ¹⁶⁴. Con respecto a la formación de H_2O_2 , el silenciamiento de NOX2 no provocó cambios en las células tratadas con Ang II.

En la misma línea que NOX2, la isoforma NOX1 parece estar también implicada en la sobreproducción de $O_2^{\cdot-}$ inducida por Ang II, ya que el inhibidor de NOX1, 2-acetilfenotiazina, disminuye de manera significativa la actividad de la enzima NADPH oxidasa. En consonancia con nuestros resultados, investigaciones realizadas en células de músculo liso vascular (VSMCs) mostraron que la inhibición de NOX1 (en este caso mediante la utilización de un siRNA específico) inhibió el incremento en la actividad NADPH oxidasa producido por la exposición a Ang II ¹⁶⁵. Por otro lado, y a diferencia de los resultados observados con el inhibidor específico de NOX2, la presencia del inhibidor de NOX1 reduce también la generación de $O_2^{\cdot-}$ en las células controles (esto es, no tratadas con Ang II). Este efecto ya había sido descrito en VSMCs ¹⁶⁵, y recientemente en

plaquetas ¹⁶⁶, sugiriendo los autores de estas investigaciones que dicha observación respondería a una posible implicación de NOX1 en la generación basal de O_2^- en estas células.

Al tratar las células de la línea NRK-52E con siNOX4, se obtiene un grado de silenciamiento del 50%. En este caso, a diferencia del silenciamiento de NOX2, el tratamiento con siNOX4 no modifica la expresión de NOX1 y NOX2 en células estimuladas con Ang II. Además, el silenciamiento de NOX4 no modifica la producción de O_2^- estimulada por Ang II; esto indicaría que posiblemente NOX4 no es la isoforma de la NADPH oxidasa responsable de la generación de O_2^- inducible por Ang II, estando únicamente involucradas en el aumento de anión superóxido las isoformas NOX1 y NOX2, como sugerimos anteriormente. De hecho, estudios realizados con el inhibidor de NOX1/NOX4, GKT36801, en VSMCs estimuladas con Ang II, mostraron que NOX4 no participaba en el aumento de la actividad de la NADPH oxidasa provocado por Ang II ¹⁶⁵. De la misma forma, el silenciamiento de NOX4 en células de músculo liso de aorta de rata (RASMCs) demostró que esta isoforma no participaba en la sobreproducción de O_2^- inducida por Ang II ¹⁴⁸. Por otro lado, tal y como ocurre con el inhibidor de NOX1, el tratamiento con siNOX4 provoca una disminución en la producción de O_2^- en células no tratadas, indicando este resultado un posible papel de NOX4, junto con NOX1, en la generación basal de O_2^- .

Aunque el silenciamiento de NOX4 no altera el efecto estimulador de la Ang II sobre la generación de O_2^- , sí se produce una reducción en los niveles de H_2O_2 , alcanzándose valores similares a las células no tratadas) Estos resultados concuerdan con investigaciones realizadas en RASMCs ¹⁴⁸, lo que reafirma el papel de NOX4 en la generación de H_2O_2 , como mencionamos con anterioridad.

Por otro lado, los estudios con inhibidores y técnicas de silenciamiento génico también fueron utilizados para determinar qué mecanismos podría estar utilizando la LC para modular la producción de anión superóxido dependiente de la NADPH oxidasa. Al utilizar el inhibidor de NOX2, observamos que éste no tiene ningún efecto sobre el grupo tratado con Ang II y LC (grupo ALC) respecto del grupo equivalente sin inhibidor. Estos resultados podrían sugerir que la LC no actúe directamente a través de NOX2. Exactamente igual ocurre cuando se silencia NOX4, situación que tampoco altera los

niveles de superóxido registrados en el grupo ALC no sometido al silenciamiento de esta isoforma. Con respecto a NOX1, aunque sí se observa en todos los grupos una disminución en la producción de O_2^- tras la incubación con su inhibidor específico, esta bajada es debida posiblemente al papel de NOX1 en la generación basal de O_2^- .

Estos resultados parecen, pues, indicar que la LC no actuaría de forma directa sobre las isoformas de la enzima NADPH oxidasa, sino que podría existir un mecanismo de acción de la LC frente al estrés oxidativo que, de manera indirecta, regulase la actividad y expresión de dicha enzima. De hecho, en la bibliografía existente hay estudios que afirman que el mecanismo de acción de la LC frente al estrés oxidativo se lleva a cabo a través de su capacidad de actuar como neutralizante (*scavenger*) de ERO. En concreto, Gulçin describió a la LC como una molécula con actividad *scavenger* frente al O_2^- y H_2O_2 ¹¹². También otros autores realizaron un estudio demostrando el efecto protector de la LC frente a las ERO generadas por la exposición a radiaciones ionizantes, protección que al menos en parte fue mediada por la capacidad *scavenger* de la LC¹⁶⁷. Además, relacionadas con nuestro estudio, existen investigaciones realizadas en la línea celular HK-2 (células humanas de túbulo proximal renal) que mostraron un efecto nefroprotector de la LC, efecto que es mediado a través de su capacidad de actuar como *scavenger* de ERO, del fortalecimiento del sistema de defensa y de la prevención de la oxidación de lípidos¹¹⁵. Por lo tanto, cabría la posibilidad de que esta actividad *scavenger* de la LC pudiese ser la causante de todos los efectos que tiene la LC sobre la actividad y expresión de la enzima NADPH oxidasa.

Hay que señalar, no obstante, que los resultados obtenidos en nuestros experimentos de silenciamiento génico no coinciden del todo con los derivados del empleo de inhibidores específicos de las isoformas NOX. Así, en células tratadas con LC (en presencia o ausencia de Ang II) y expuestas al siRNA de NOX2, se produjo un aumento en la producción de O_2^- y H_2O_2 . Sin embargo, el silenciamiento de NOX4 no modifica la producción de ninguna de estas ERO en las células tratadas con LC, ya sea en ausencia o presencia de Ang II. Este efecto parece responder a las modificaciones observadas en la expresión de las otras isoformas como consecuencia del silenciamiento de una de ellas, poniéndose en marcha un mecanismo de compensación de la propia célula en respuesta a la delección sufrida¹⁶³, como ya describimos anteriormente.

En resumen, la LC reduce el estrés oxidativo inducido por la Ang II a través de la activación de la enzima NADPH oxidasa, modulando la expresión y actividad de dicha enzima y reduciendo los niveles de nitrosilación de proteínas y la cantidad de H₂O₂ generado. El aumento en la producción de O₂⁻ inducido por Ang II es mediado por NOX1 y NOX2. NOX4 podría generar parte del H₂O₂ detectado, aunque la mayoría provendría de la dismutación del O₂⁻ previamente generado por las otras isoformas. Por otro lado, el efecto antioxidante de la LC no se debería a una acción directa sobre las isoformas de la NADPH oxidasa presentes en las células NRK-52E, sino que este compuesto ejercería más bien su efecto actuando como *scavenger* de ERO.

1.2 RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN EL EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO GENERADO POR ANGIOTENSINA II A TRAVÉS DE LA NADPH OXIDASA

En relación con los mecanismos de activación de la NADPH oxidasa, la Ang II activa a esta enzima a través de diferentes vías de señalización. En consonancia con la bibliografía existente ^{77,81}, los experimentos realizados en la línea celular NRK-52E sugieren que las vías de señalización de las quinasas PI3K/Akt, p38 MAPK, ERK_{1/2}, PKC y el complejo NF-κB están involucrados en la estimulación de la NADPH oxidasa por Ang II. Existen estudios, realizados en VSMCs, en los cuales la Ang II induce la fosforilación de la proteína Akt mediada por cPLA2, siendo este proceso dependiente de calcio ⁸⁸. La Ang II también es capaz de provocar la hipertrofia de VSMCs (marcador de desórdenes vasculares como la HTA) a través de la fosforilación de las proteínas Akt, p38 MAPK y ERK_{1/2} ¹⁶⁸. Por otro lado, estudios realizados en VSMCs ⁵² y en el asa de Henle ¹⁶⁹, muestran que la Ang II es capaz de estimular a la NADPH oxidasa a través de la activación de la PKC. También, en relación a la activación del sistema NF-κB por Ang II, hay varios estudios realizados en VSMCs que muestran un aumento en la fosforilación de α-IκB y en la translocación de la subunidad p65 tras ser tratadas con Ang II ¹⁷⁰⁻¹⁷³.

En cuanto a la LC, los ensayos de actividad NADPH oxidasa muestran que la reducción en dicha actividad inducida por LC fue significativamente revertida por

wortmanina y BIS I, no produciéndose cambios en presencia de los inhibidores SB283580 y PD95059. Nuestros datos sugieren, pues, un posible papel de las vías PI3K/Akt y PKC en el efecto atenuante de la LC sobre la actividad NADPH oxidasa. Adicionalmente, la LC inhibe completamente la translocación del complejo NF- κ B hacia el núcleo inducida por Ang II. Para ratificar estas observaciones, medimos el grado de fosforilación de las proteínas Akt, p38 MAPK y ERK_{1/2}, así como la actividad de la proteína PKC. La incubación con LC no modifica la fosforilación inducida por Ang II de las proteínas Akt, p38 MAPK y ERK_{1/2}, pero sí restaura la actividad de la proteína PKC hasta valores similares a los del grupo control.

Diferentes trabajos han descrito las vías de señalización que podrían ser moduladas por la LC (o sus ésteres) para efectuar sus efectos beneficiosos frente a diversas enfermedades. Así, estudios realizados con acetil-L-carnitina describen un efecto protector de ésta frente a la neurotoxicidad inducida por HNE (4-hidroxi-2-nonenal), mediante la activación de las vías PI3K/Akt y ERK_{1/2} ¹³⁶. La LC también bloqueó la resistencia a insulina inducida por TNF α actuando sobre la fosforilación de Akt y ERK_{1/2} ¹³⁷. Por otro lado, la LC induce senescencia en células de glioblastoma por activación de la vía de la proteína p38 MAPK ¹³⁹, y activa la señalización de PI3K/Akt en células de músculo esquelético de rata ¹⁷⁴. Análogamente, la propionil-L-carnitina estimula la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) por activación de la vía PI3K/Akt ¹³⁸. En los experimentos realizados en nuestro estudio en la línea celular NRK-52E, la LC no atenúa la fosforilación de la proteína Akt inducida por Ang II, como hemos señalado. Sin embargo, la LC fue capaz de inducir la fosforilación de Akt en ausencia de Ang II; el hecho de que este efecto fue insensible al tratamiento con wortmanina, sugiere que la fosforilación de Akt inducida por la LC es independiente de la proteína PI3K. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Zhang y cols. en mioblastos de rata, donde la proteína Akt fue fosforilada por la acetil-L-carnitina mediante un mecanismo no dependiente de PI3K ¹³⁷.

Como se indicó anteriormente, la proteína PKC es clave en la activación de la NADPH oxidasa ⁷⁸. Nuestros resultados indican que la LC es capaz de reducir la actividad de dicha proteína hasta valores propios de células controles, sugiriendo una inhibición en la fosforilación de la proteína p47phox y, por tanto, una inactivación de la actividad NADPH oxidasa. También, la LC inhibe la translocación del complejo NF- κ B al núcleo, lo cual

podría deberse a una inhibición de la quinasa c-Src, como se ha puesto de manifiesto previamente ¹⁷⁵. Además, nuestros resultados muestran una reducción en la fosforilación del inhibidor α -I κ B tras el tratamiento simultáneo con LC y Ang II, acción que refuerza la inhibición de la translocación nuclear del sistema NF- κ B.

Se puede concluir, por tanto, que el incremento de la actividad NADPH oxidasa inducida por Ang II en la línea celular NRK-52E, parece estar mediado por las vías de señalización de PI3K/Akt, p38 MAPK, ERK_{1/2}, PKC y el complejo NF- κ B. Por otro lado, el efecto inhibitorio de la actividad NADPH oxidasa por parte de la LC se llevaría a cabo mediante la modulación de las quinasas Akt y PKC, y del complejo NF- κ B.

2. EFECTO DE LA L-CARNITINA SOBRE EL ESTADO FIBRÓTICO INDUCIDO POR TGF β

La progresión de muchas enfermedades crónicas en órganos como el riñón, corazón y otros, está asociada a un proceso fibrótico. En concreto, la fibrosis renal se caracteriza por una serie de procesos como la glomerulosclerosis, fibrosis túbulo-intersticial, infiltración inflamatoria y pérdida de parénquima renal, llegando a producir en última instancia un fallo del órgano ^{89,90}. La proteína TGF β es un mediador esencial para la generación y movilización de fibroblastos, dos procesos esenciales en el proceso fibrótico, así como en la transformación de células epiteliales en fibroblastos a través del mecanismo denominado transición epitelio-mesénquima, igualmente mediado por TGF β (apartado 1.3. de la sección *Introducción*). Además, investigaciones recientes sugieren que la enzima NADPH oxidasa está involucrada en las respuestas fibróticas mediadas por TGF β ⁹².

Los estudios realizados en la línea celular NRK-52E muestran un efecto inhibitorio de la LC frente a la generación de estrés oxidativo derivado del aumento en la actividad/expresión de la NADPH oxidasa inducido por TGF β . Además, la LC previene la activación de la vía de señalización de las proteínas Smad (por inhibición de la fosforilación de Smad2), así como previene el aumento de la expresión del marcador de fibrosis CTGF, procesos ambos inducidos por TGF β . Finalmente, la LC también muestra

un efecto beneficioso en condiciones patológicas en las que existe un desbalance en el sistema de degradación de colágeno; este último efecto lo hemos estudiado tanto en ratas con hipertensión inducida por L-NAME (*in vivo*), como en células de la línea NRK-52E tratadas con TGF β (*in vitro*).

Inicialmente, el factor profibrótico TGF β utilizado en este estudio provoca un aumento de la producción de O $_2^{\cdot-}$; al igual que ocurre con la Ang II, este superóxido procede de la enzima NADPH oxidasa, como desvela la inhibición de dicha producción con DPI, y la exposición inefectiva frente a inhibidores de la xantina oxidasa (oxipurinol) y de la cadena respiratoria de electrones (rotenona). Estudios similares realizados en hepatocitos de feto de rata ¹⁷⁶ y en células de la línea celular NRK-52E ^{142,177} mostraron también un aumento en la actividad de la NADPH oxidasa en presencia de TGF β . Además, el TGF β no solo estimula actividad de la NADPH oxidasa, sino que también aumenta la expresión de las isoformas NOX1, NOX2 y NOX4 de la enzima, un efecto ya descrito por otros autores tanto en células estrelladas hepáticas de ratón, como en la línea celular NRK-52E ^{142,178}. En paralelo a estos efectos provocados por TGF β (aunque de forma contrapuesta), la LC atenúa no solo la actividad, sino también la expresión de las tres isoformas de la NADPH oxidasa analizadas en este estudio. Este efecto de la LC sobre la actividad y expresión génica de la NADPH oxidasa ha sido previamente descrito a nivel cardiaco y renal en animales hipertensos con fibrosis establecida y niveles elevados de TGF β ^{121,123}.

Por otro lado, en este estudio hemos analizado la expresión del factor profibrótico CTGF y la fosforilación de la proteína Smad2, procesos involucrados en el mecanismo fibrótico (apartado 1.3 de la sección *Introducción*). Estudios realizados en la línea celular NRK-52E ^{121,142} y en células epiteliales tubulares proximales humanas (línea celular HK-2) ¹⁷⁹, coinciden con el aumento de la proteína CTGF tras la estimulación con TGF β observado en nuestro estudio. Además, experimentos realizados en ratas tratadas con L-NAME que desarrollaron hipertensión y fibrosis, y cuya expresión de TGF β se encontraba aumentada, también mostraron un aumento en la expresión de CTGF tanto a nivel cardiaco como renal ^{116,121}. Igualmente, hemos observado un aumento en la fosforilación de la proteína Smad2 tras la exposición a TGF β , coincidiendo con los resultados previamente observados en varios tipos celulares: NRK-52E ^{142,177}, HK-2 ^{179,180} y hepatocitos ¹⁷⁶.

La LC es capaz de revertir los incrementos en la expresión de CTGF y en la fosforilación de la proteína Smad2 inducidos por TGF β en la línea celular NRK-52E. Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron igualmente el efecto antifibrótico beneficioso de la LC *in vivo*, tanto en riñón como en el corazón, utilizando modelos animales con hipertensión arterial y fibrosis ^{121,123}.

Para determinar los mecanismos por los cuales la LC ejerce su efecto antifibrótico, decidimos estudiar, en el modelo animal (corteza renal) y en los cultivos celulares, algunas proteínas implicadas en el sistema de degradación del colágeno. En el modelo celular NRK-52E, el TGF β no provocó ningún cambio en la expresión génica de MMP-9. En la literatura, el papel del TGF β en la regulación de MMP-9 no está bien definido, existiendo resultados contradictorios. Así, la estimulación de monocitos con TGF β no provocó cambios en la expresión génica de MMP-9 ¹⁸¹, en línea con nuestros resultados. Sin embargo, también existen estudios realizados en las líneas cancerosas MDA-MB-231 (cáncer de mama) ¹⁸² y HT1080 (células invasivas de fibrosarcoma humano) ¹⁸³ que muestran una inducción en la expresión de MMP-9 en presencia de TGF β ; similares resultados se obtuvieron en células epiteliales de córnea humana estimuladas con TGF β ¹⁸⁴.

En las ratas con HTA y fibrosis inducidas por L-NAME (modelo animal utilizado previamente en nuestro laboratorio, como hemos señalado), la expresión de MMP-9 sí aparece reducida, coincidiendo nuestros resultados con un estudio previo realizado en ratas SHR tratadas con L-NAME ¹⁸⁵.

A diferencia de MMP-9, TIMP-1 sigue el mismo patrón de expresión en los tratamientos con TGF β (*in vitro*) o L-NAME (*in vivo*), aumentando en ambos casos la expresión de dicha proteína. En relación con estos resultados, investigaciones previas realizadas en la línea celular HT1080 ¹⁸³ y en cultivos primarios de fibroblastos pulmonares de cáncer de pulmón ¹⁸⁶, mostraron un aumento de TIMP-1 en respuesta a TGF β . También existe un estudio que describe un aumento en la expresión de TIMP-1 en ratas de la cepa Wistar tratadas con L-NAME. ¹⁸⁷

Pese a los diferentes patrones de expresión de MMP-9 en nuestros modelos animal y celular, el cociente MMP-9/TIMP-1 disminuye tanto en las ratas tratadas con L-

NAME como en las células tratadas con TGF β , lo que sugiere una menor capacidad en cualquier caso para degradar el colágeno. Hay estudios que muestran resultados semejantes en ratas SHR con fibrosis, en donde la relación MMP/TIMP también aparecía disminuida ¹⁴².

Estudios realizados previamente en nuestro laboratorio, utilizando animales hipertensos con desarrollo de fibrosis, pusieron de manifiesto el efecto antifibrótico de la LC, reduciendo la acumulación de colágeno tanto a nivel cardiaco como renal ^{121,123}. Estos resultados pueden equipararse con los obtenidos en esta memoria, tanto en el modelo animal como en la línea celular, ya que en ambos casos la LC favorece la degradación de colágeno, previniendo la reducción del cociente MMP-9/TIMP-1 inducida por L-NAME y TGF β , respectivamente (aunque en el modelo *in vitro* se observa una reducción de ambos parámetros en las células tratadas con TGF β y preincubadas con LC, la disminución es más marcada en el caso de TIMP-1). Resultados similares se encontraron en ratas Sprague-Dawley tratadas con cisplatino, molécula que induce nefrotoxicidad ¹²⁶. Los autores de este trabajo sugirieron entonces que la LC modulaba la relación MMP/TIMP alterada por el cisplatino, por lo cual cabe pensar que la LC regula la capacidad de degradación del colágeno impidiendo su acumulación excesiva.

En resumen, el TGF β genera un fenotipo profibrótico caracterizado por un aumento del estrés oxidativo generado por la NADPH oxidasa y por un aumento en la activación de la vía de las proteínas Smad. Además, tanto en el modelo *in vivo* como *in vitro*, la inducción del fenotipo fibrótico con L-NAME o TGF β , respectivamente, reduce la capacidad de degradar colágeno, favoreciendo la aparición de fibrosis. Nuestra molécula en estudio, la LC, reduce el estrés oxidativo generado por la NADPH oxidasa, modulando también la vía de las proteínas Smad. En la misma línea, es capaz de normalizar el balance entre las proteínas MMP y TIMP, evitando de este modo la acumulación de colágeno y el desarrollo de fibrosis.

Nuestro estudio, por tanto, desvela algunos de los mecanismos de acción de la LC que podrían ser responsables de sus acciones beneficiosas frente a la nefropatía hipertensiva. De este modo, la L-carnitina protege al riñón del daño estructural y funcional derivado del exceso de estrés oxidativo y fibrosis, a través de diversos mecanismos que consiguen regular la expresión y actividad de la enzima NADPH oxidasa.



CONCLUSIONES

La realización del presente estudio permite extraer las siguientes conclusiones:

1. La LC reduce el estrés oxidativo inducido por la angiotensina II (Ang II) a través de la NADPH oxidasa, modulando la actividad y expresión de dicha enzima, y normalizando los niveles de nitrosilación de proteínas y la cantidad de H_2O_2 generado.
2. La Ang II induce un aumento de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a través de las isoformas NOX1 y NOX2 de la NADPH oxidasa. Sin embargo, la isoforma NOX4 no parece estar implicada en este efecto.
3. Los estudios de silenciamiento de NOX4 muestran que esta isoforma de la NADPH oxidasa podría estar involucrada en la generación de H_2O_2 . No obstante, el H_2O_2 parece proceder en su mayor parte de la dismutación del $O_2^{\cdot-}$.
5. El efecto antioxidante de la LC no parece ser debido a una acción directa sobre las isoformas de la NADPH oxidasa presentes en la línea celular NRK-52E, sino que más bien parece ejercer su efecto de forma indirecta, actuando como *scavenger* de ERO.
6. La Ang II activa a la NADPH oxidasa a través de las vías PI3K/Akt, p38 MAPK, ERK_{1/2} y PKC, así como a través del complejo NF- κ B.
7. La LC inhibe la actividad NADPH oxidasa reduciendo la actividad de la PKC, inhibiendo la translocación al núcleo del sistema NF- κ B, e induciendo la fosforilación de Akt a través de un mecanismo no dependiente de PI3K.
8. La LC restaura el aumento de la actividad y expresión génica de la NADPH oxidasa inducido por TGF β . Además, inhibe la expresión de CTGF, la activación de la vía de las Smad, y restaura el sistema de degradación de colágeno (tanto en modelo animal como celular), factores todos ellos de vital importancia en la generación de fibrosis.



BIBLIOGRAFÍA

1. Sarafidis PA, Li S, Chen SC, et al. Hypertension awareness, treatment, and control in chronic kidney disease. *Am J Med.* 2008;121(4):332-340.
2. Ritz E. Hypertension and kidney disease. *Clin Nephrol.* 2010;74 Suppl 1:S39-43.
3. Ritz E, Bakris G, World Kidney Day Organising Committee. World kidney day: Hypertension and chronic kidney disease. *Lancet.* 2009;373(9670):1157-1158.
4. Bakris GL, Ritz E, World Kidney Day Steering Committee. The message for world kidney day 2009: Hypertension and kidney disease--a marriage that should be prevented. *J Hypertens.* 2009;27(3):666-669.
5. Romero R, Bonet J. Nefropatía hipertensiva: ¿la hipertensión arterial esencial es una causa importante de insuficiencia renal crónica?. *Medicina Clínica.* 2001;117(4).
6. Kes P, Basic-Jukic N, Ljusic D, Brunetta-Gavranic B. The role of arterial hypertension in development of chronic renal failure. *Acta Med Croatica.* 2011;65 Suppl 3:78-84.
7. Tian D, Ling S, Chen G, et al. Hypertensive nephropathy treatment by heart-protecting musk pill: A study of anti-inflammatory therapy for target organ damage of hypertension. *Int J Gen Med.* 2011;4:131-139.
8. Kuchta A, Pacanis A, Kortas-Stempak B, et al. Estimation of oxidative stress markers in chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res.* 2011;34(1):12-19.
9. Agarwal R, Campbell RC, Warnock DG. Oxidative stress in hypertension and chronic kidney disease: Role of angiotensin II. *Semin Nephrol.* 2004;24(2):101-114.
10. Galle J. Oxidative stress in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16(11):2135-2137.
11. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 2008;31 Suppl 2:S170-80.
12. Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol Rev.* 2009;89(1):27-71.

13. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000;408(6809):239-247.
14. 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.
15. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95.
16. Oliveira-Sales EB, Dugaich AP, Carillo BA, et al. Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. *Am J Hypertens*. 2008;21(1):98-104.
17. Brown DI, Griendling KK. NOX proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(9):1239-1253.
18. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now? *Free Radic Biol Med*. 2002;33(6):774-797.
19. Puddu P, Puddu GM, Cravero E, Rosati M, Muscari A. The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. *Blood Press*. 2008;17(2):70-77.
20. Cachofeiro V, Goicochea M, de Vinuesa SG, Oubina P, Lahera V, Luno J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl*. 2008;(111):S4-9. doi(111):S4-9.
21. Tamargo J, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Vaquero M, Delpón E. Efectos del óxido nítrico sobre la función cardíaca. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2006;6:3A-20A.
22. 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.
23. Al Ghoulé 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.
24. Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, et al. Mitochondrial superoxide: Production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(6):755-767.

25. Seliskar M, Rozman D. Mammalian cytochromes P450--importance of tissue specificity. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1770(3):458-466.
26. De Silva TM, Faraci FM. Effects of angiotensin II on the cerebral circulation: Role of oxidative stress. *Front Physiol*. 2012;3:484.
27. Wright J, Bastian N, Davis TA, et al. Structural characterization of the isoenzymatic forms of human myeloperoxidase: Evaluation of the iron-containing prosthetic group. *Blood*. 1990;75(1):238-241.
28. Sachse A, Wolf G. Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(9):2439-2446.
29. de Dios ST, Sobey CG, Drummond GR. Oxidative stress and endothelial dysfunction. *Endothelial dysfunction and inflammation progress in inflammation research*. 2010:37-64.
30. Lin KT, Xue JY, Sun FF, Wong PY. Reactive oxygen species participate in peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;230(1):115-119.
31. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 1991;288(2):481-487.
32. Van der Vliet A, Smith D, O'Neill CA, et al. Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: Oxidative damage and antioxidant depletion. *Biochem J*. 1994;303 (Pt 1)(Pt 1):295-301.
33. 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.
34. Ozbek E. Induction of oxidative stress in kidney. *Int J Nephrol*. 2012;2012:465897.
35. Gill PS, Wilcox CS. NADPH oxidases in the kidney. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(9-10):1597-1607.
36. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87(1):245-313.

37. Sedeek M, Nasrallah R, Touyz RM, Hebert RL. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: Friend and foe. *J Am Soc Nephrol*. 2013.
38. Jones RD, Hancock JT, Morice AH. NADPH oxidase: A universal oxygen sensor? *Free Radic Biol Med*. 2000;29(5):416-424.
39. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(3):181-189.
40. Taylor-Fishwick DA. NOX, NOX who is there? the contribution of NADPH oxidase one to beta cell dysfunction. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:40.
41. Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, et al. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*. 1999;401(6748):79-82.
42. Lassegue B, Griendling KK. NADPH oxidases: Functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(4):653-661.
43. Banfi B, Malgrange B, Knisz J, Steger K, Dubois-Dauphin M, Krause KH. NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem*. 2004;279(44):46065-46072.
44. 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.
45. von Lohneysen K, Noack D, Wood MR, Friedman JS, Knaus UG. Structural insights into Nox4 and Nox2: Motifs involved in function and cellular localization. *Mol Cell Biol*. 2010;30(4):961-975.
46. Banfi B, Molnar G, Maturana A, et al. A ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem*. 2001;276(40):37594-37601.
47. BelAiba RS, Djordjevic T, Petry A, et al. NOX5 variants are functionally active in endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2007;42(4):446-459.
48. Fulton DJ. Nox5 and the regulation of cellular function. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(10):2443-2452.

49. Serrander L, Jaquet V, Bedard K, et al. NOX5 is expressed at the plasma membrane and generates superoxide in response to protein kinase C activation. *Biochimie*. 2007;89(9):1159-1167.
50. Kleniewska P, Piechota A, Skibska B, Goraca A. The NADPH oxidase family and its inhibitors. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2012;60(4):277-294.
51. Lassegue B, San Martin A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res*. 2012;110(10):1364-1390.
52. 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.
53. Bokoch GM, Diebold BA. Current molecular models for NADPH oxidase regulation by rac GTPase. *Blood*. 2002;100(8):2692-2696.
54. Hordijk PL. Regulation of NADPH oxidases: The role of rac proteins. *Circ Res*. 2006;98(4):453-462.
55. Nauseef WM. Detection of superoxide anion and hydrogen peroxide production by cellular NADPH oxidases. *Biochim Biophys Acta*. 2013.
56. Van Heerebeek L, Meischl C, Stoker W, Meijer CJ, Niessen HW, Roos D. NADPH oxidase(s): New source(s) of reactive oxygen species in the vascular system? *J Clin Pathol*. 2002;55(8):561-568.
57. Geiszt M. NADPH oxidases: New kids on the block. *Cardiovasc Res*. 2006;71(2):289-299.
58. Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(6):453-471.
59. Katsuyama M, Matsuno K, Yabe-Nishimura C. Physiological roles of NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme. *J Clin Biochem Nutr*. 2012;50(1):9-22.

60. Cheng G, Ritsick D, Lambeth JD. Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. *J Biol Chem.* 2004;279(33):34250-34255.
61. Ueno N, Takeya R, Miyano K, Kikuchi H, Sumimoto H. The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: Its regulation by oxidase organizers and activators. *J Biol Chem.* 2005;280(24):23328-23339.
62. Ueyama T, Geiszt M, Leto TL. Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Mol Cell Biol.* 2006;26(6):2160-2174.
63. Touyz RM, Montezano AC. Vascular Nox4: A multifarious NADPH oxidase. *Circ Res.* 2012;110(9):1159-1161.
64. 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.
65. Chen F, Haigh S, Barman S, Fulton DJ. From form to function: The role of Nox4 in the cardiovascular system. *Front Physiol.* 2012;3:412.
66. Brandes RP, Takac I, Schroder K. No superoxide--no stress?: Nox4, the good NADPH oxidase! *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(6):1255-1257.
67. Todd NW, Luzina IG, Atamas SP. Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2012;5(1):11-1536-5-11.
68. Montezano AC, Touyz RM. Oxidative stress, noxs, and hypertension: Experimental evidence and clinical controversies. *Ann Med.* 2012;44 Suppl 1:S2-16.
69. Forteza R, Salathe M, Miot F, Forteza R, Conner GE. Regulated hydrogen peroxide production by duox in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32(5):462-469.
70. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 2000;86(5):494-501.
71. Maghzal GJ, Krause KH, Stocker R, Jaquet V. Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med.* 2012;53(10):1903-1918.

72. Baillet A, Xu R, Grichine A, Berthier S, Morel F, Paclet MH. Coupling of 6-phosphogluconate dehydrogenase with NADPH oxidase in neutrophils: Nox2 activity regulation by NADPH availability. *FASEB J.* 2011;25(7):2333-2343.
73. Sorescu D, Somers MJ, Lassegue B, Grant S, Harrison DG, Griendling KK. Electron spin resonance characterization of the NAD(P)H oxidase in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med.* 2001;30(6):603-612.
74. Pendyala S, Usatyuk PV, Gorshkova IA, Garcia JG, Natarajan V. Regulation of NADPH oxidase in vascular endothelium: The role of phospholipases, protein kinases, and cytoskeletal proteins. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(4):841-860.
75. Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res.* 2005;65(1):16-27.
76. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: A family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68(2):320-344.
77. Hazan-Halevy I, Levy T, Wolak T, Lubarsky I, Levy R, Paran E. Stimulation of NADPH oxidase by angiotensin II in human neutrophils is mediated by ERK, p38 MAP-kinase and cytosolic phospholipase A2. *J Hypertens.* 2005;23(6):1183-1190.
78. Yamamori T, Inanami O, Nagahata H, Cui Y, Kuwabara M. Roles of p38 MAPK, PKC and PI3-K in the signaling pathways of NADPH oxidase activation and phagocytosis in bovine polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Lett.* 2000;467(2-3):253-258.
79. Queisser N, Fazeli G, Schupp N. Superoxide anion and hydrogen peroxide-induced signaling and damage in angiotensin II and aldosterone action. *Biol Chem.* 2010;391(11):1265-1279.
80. 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.
81. Luengo-Blanco M, Prando C, Bustamante J, et al. Essential role of nuclear factor-kappaB for NADPH oxidase activity in normal and anhidrotic ectodermal dysplasia leukocytes. *Blood.* 2008;112(4):1453-1460.

82. Gauss KA, Nelson-Overton LK, Siemsen DW, Gao Y, DeLeo FR, Quinn MT. Role of NF-kappaB in transcriptional regulation of the phagocyte NADPH oxidase by tumor necrosis factor-alpha. *J Leukoc Biol.* 2007;82(3):729-741.
83. Barakat DJ, Dvorianchikova G, Ivanov D, Shestopalov VI. Astroglial NF-kappaB mediates oxidative stress by regulation of NADPH oxidase in a model of retinal ischemia reperfusion injury. *J Neurochem.* 2012;120(4):586-597.
84. Rabêlo LA, Nunes de Souza V, Sá da Fonseca, Lucas José, O. Sampaio W. Desbalance redox: NADPH oxidasa como un objetivo terapéutico en el manejo cardiovascular. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94(5):666-675.
85. Garrido AM, Griendling KK. NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;302(2):148-158.
86. Schramm A, Matusik P, Osmenda G, Guzik TJ. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology. *Vascul Pharmacol.* 2012;56(5-6):216-231.
87. Hoyal CR, Gutierrez A, Young BM, et al. Modulation of p47PHOX activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(9):5130-5135.
88. Li F, Malik KU. Angiotensin II-induced akt activation is mediated by metabolites of arachidonic acid generated by CaMKII-stimulated Ca²⁺(+)-dependent phospholipase A2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288(5):H2306-16.
89. Liu Y. Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int.* 2006;69(2):213-217.
90. 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.
91. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 2004;18(7):816-827.
92. Jiang F, Liu GS, Dusting GJ, Chan EC. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF-beta-mediated fibrotic responses. *Redox Biol.* 2014;2:267-272.

93. Sosa-Garrocho M, Macías-Silva M. El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β): Funciones y vías de transducción. *REB*. 2004;23:3-11.
94. Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGF β , angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res*. 2010;106(11):1675-1680.
95. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor- β and fibrosis. *World J Gastroenterol*. 2007;13:3056-3052.
96. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*. 2003;425(6958):577-584.
97. Chan EC, Peshavariya HM, Liu GS, Jiang F, Lim SY, Dusting GJ. Nox4 modulates collagen production stimulated by transforming growth factor beta1 in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;430(3):918-925.
98. 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.
99. Nlandu Khodo S, Dizin E, Sossauer G, et al. NADPH-oxidase 4 protects against kidney fibrosis during chronic renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(12):1967-1976.
100. Chan EC, Jiang F, Peshavariya HM, Dusting GJ. Regulation of cell proliferation by NADPH oxidase-mediated signaling: Potential roles in tissue repair, regenerative medicine and tissue engineering. *Pharmacol Ther*. 2009;122(2):97-108.
101. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol*. 2007;46:955-975.
102. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ Res*. 2003;92(8):827-839.
103. Nee LE, McMorrow T, Campbell E, Slattery C, Ryan MP. TNF- α and IL-1 β -mediated regulation of MMP-9 and TIMP-1 in renal proximal tubular cells. *Kidney Int*. 2004;66(4):1376-1386.

104. Hultstrom M, Leh S, Skogstrand T, Iversen BM. Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteases-1 (TIMP-1) and procollagen-N-peptidase in hypertension-induced renal damage. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(3):896-903.
105. Laquerriere P, Grandjean-Laquerriere A, Addadi-Rebbah S, et al. MMP-2, MMP-9 and their inhibitors TIMP-2 and TIMP-1 production by human monocytes in vitro in the presence of different forms of hydroxyapatite particles. *Biomaterials*. 2004;25(13):2515-2524.
106. Rebouche CJ, Seim H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Annu Rev Nutr*. 1998;18:39-61.
107. Sharma S, Black SM. Carnitine homeostasis, mitochondrial function, and cardiovascular disease. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2009;6(1-4):e31-e39.
108. Stephens FB, Constantin-Teodosiu D, Laithwaite D, Simpson EJ, Greenhaff PL. Insulin stimulates L-carnitine accumulation in human skeletal muscle. *FASEB J*. 2006;20(2):377-379.
109. Vaz FM, Wanders RJ. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J*. 2002;361(Pt 3):417-429.
110. Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J, Willcox MD, Garrett Q. Role of carnitine in disease. *Nutr Metab (Lond)*. 2010;7:30-7075-7-30.
111. 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.
112. Gulcin I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci*. 2006;78(8):803-811.
113. Calo LA, Pagnin E, Davis PA, et al. Antioxidant effect of L-carnitine and its short chain esters: Relevance for the protection from oxidative stress related cardiovascular damage. *Int J Cardiol*. 2006;107(1):54-60.
114. Ribas GS, Vargas CR, Wajner M. L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders. *Gene*. 2014;533(2):469-476.

115. Ye J, Li J, Yu Y, Wei Q, Deng W, Yu L. L-carnitine attenuates oxidant injury in HK-2 cells via ROS-mitochondria pathway. *Regul Pept.* 2010;161(1-3):58-66.
116. 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.* 2013;52(6):1649-1659.
117. Augustyniak A, Skrzydlewska E. The influence of L-carnitine supplementation on the antioxidative abilities of serum and the central nervous system of ethanol-induced rats. *Metab Brain Dis.* 2010;25(4):381-389.
118. 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.
119. Sethumadhavan S, Chinnakannu P. Carnitine and lipoic acid alleviates protein oxidation in heart mitochondria during aging process. *Biogerontology.* 2006;7(2):101-109.
120. Thangasamy T, Jeyakumar P, Sittadjody S, Joyee AG, Chinnakannu P. L-carnitine mediates protection against DNA damage in lymphocytes of aged rats. *Biogerontology.* 2009;10(2):163-172.
121. Zambrano S, Blanca AJ, Ruiz-Armenta MV, et al. L-carnitine attenuates the development of kidney fibrosis in hypertensive rats by upregulating PPAR-gamma. *Am J Hypertens.* 2014;27(3):460-470.
122. Xiang Y, Piao SG, Zou HB, et al. L-carnitine protects against cyclosporine-induced pancreatic and renal injury in rats. *Transplant Proc.* 2013;45(8):3127-3134.
123. 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.
124. 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.

125. Demiroren K, Dogan Y, Kocamaz H, et al. Protective effects of L-carnitine, N-acetylcysteine and genistein in an experimental model of liver fibrosis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2014;38(1):63-72.
126. Martinez G, Costantino G, Clementi A, et al. Cisplatin-induced kidney injury in the rat: L-carnitine modulates the relationship between MMP-9 and TIMP-3. *Exp Toxicol Pathol*. 2009;61(3):183-188.
127. Mingrone G. Carnitine in type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1033:99-107.
128. Mingorance C, Rodriguez-Rodriguez R, Justo ML, Herrera MD, de Sotomayor MA. Pharmacological effects and clinical applications of propionyl-L-carnitine. *Nutr Rev*. 2011;69(5):279-290.
129. Cruciani RA, Dvorkin E, Homel P, et al. L-carnitine supplementation for the treatment of fatigue and depressed mood in cancer patients with carnitine deficiency: A preliminary analysis. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1033:168-176.
130. Virmani A, Gaetani F, Imam S, Binienda Z, Ali S. The protective role of L-carnitine against neurotoxicity evoked by drug of abuse, methamphetamine, could be related to mitochondrial dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;965:225-232.
131. Gavrilova SI, Kalyn I, Kolykhalov IV, Roshchina IF, Selezneva ND. Acetyl-L-carnitine (carnicetine) in the treatment of early stages of alzheimer's disease and vascular dementia. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*. 2011;111(9):16-22.
132. Cao Y, Hao C, Wang C, et al. Urinary excretion of L-carnitine, acetyl-L-carnitine, propionyl-L-carnitine and their antioxidant activities after single dose administration of L-carnitine in healthy subjects. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;49.
133. Patrick L. Nutrients and HIV: Part three - N-acetylcysteine, alpha-lipoic acid, L-glutamine, and L-carnitine. *Altern Med Rev*. 2000;5(4):290-305.
134. Vescovo G, Ravara B, Gobbo V, et al. L-carnitine: A potential treatment for blocking apoptosis and preventing skeletal muscle myopathy in heart failure. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283(3):C802-10.

135. Reznick AZ, Kagan VE, Ramsey R, et al. Antiradical effects in L-propionyl carnitine protection of the heart against ischemia-reperfusion injury: The possible role of iron chelation. *Arch Biochem Biophys*. 1992;296(2):394-401.
136. Abdul HM, Butterfield DA. Involvement of PI3K/PKG/ERK1/2 signaling pathways in cortical neurons to trigger protection by cotreatment of acetyl-L-carnitine and alpha-lipoic acid against HNE-mediated oxidative stress and neurotoxicity: Implications for alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*. 2007;42(3):371-384.
137. Zhang Z, Zhao M, Li Q, Zhao H, Wang J, Li Y. Acetyl-L-carnitine inhibits TNF-alpha-induced insulin resistance via AMPK pathway in rat skeletal muscle cells. *FEBS Lett*. 2009;583(2):470-474.
138. Ning WH, Zhao K. Propionyl-L-carnitine induces eNOS activation and nitric oxide synthesis in endothelial cells via PI3 and akt kinases. *Vascul Pharmacol*. 2013;59(3-4):76-82.
139. Yamada S, Matsuda R, Nishimura F, et al. Carnitine-induced senescence in glioblastoma cells. *Exp Ther Med*. 2012;4(1):21-25.
140. 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.
141. 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.
142. Baltanas A, Miguel-Carrasco JL, San Jose G, et al. A synthetic peptide from transforming growth factor-beta(1) type III receptor inhibits NADPH oxidase and prevents oxidative stress in the kidney of spontaneously hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(14):1607-1618.
143. Nakagami H, Takemoto M, Liao JK. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35(7):851-859.

144. Wei Y, Sowers JR, Nistala R, et al. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 2006;281(46):35137-35146.
145. Luo Z, Teerlink T, Griendling K, Aslam S, Welch WJ, Wilcox CS. Angiotensin II and NADPH oxidase increase ADMA in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 2010;56(3):498-504.
146. Fu Y, Zhang R, Lu D, et al. NOX2 is the primary source of angiotensin II-induced superoxide in the macula densa. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;298(3):R707-12.
147. Guo W, Adachi T, Matsui R, et al. Quantitative assessment of tyrosine nitration of manganese superoxide dismutase in angiotensin II-infused rat kidney. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(4):H1396-403.
148. Dikalov SI, Dikalova AE, Bikineyeva AT, Schmidt HH, Harrison DG, Griendling KK. Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(9):1340-1351.
149. Imanishi T, Kobayashi K, Kuroi A, Ikejima H, Akasaka T. Pioglitazone inhibits angiotensin II-induced senescence of endothelial progenitor cell. *Hypertens Res.* 2008;31(4):757-765.
150. Qin J, Xie YY, Huang L, et al. Fluorofenidone inhibits nicotinamide adeninedinucleotide phosphate oxidase via PI3K/akt pathway in the pathogenesis of renal interstitial fibrosis. *Nephrology (Carlton).* 2013;18(10):690-699.
151. Valente AJ, Yoshida T, Murthy SN, et al. Angiotensin II enhances AT1-Nox1 binding and stimulates arterial smooth muscle cell migration and proliferation through AT1, Nox1, and interleukin-18. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;303(3):H282-96.
152. Peng ZZ, Hu GY, Shen H, et al. Fluorofenidone attenuates collagen I and transforming growth factor-beta1 expression through a nicotinamide adenine dinucleotide

- phosphate oxidase-dependent way in NRK-52E cells. *Nephrology (Carlton)*. 2009;14(6):565-572.
153. Wingler K, Wunsch S, Kreutz R, Rothermund L, Paul M, Schmidt HH. Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(11):1456-1464.
154. Wosniak J, Jr, Santos CX, Kowaltowski AJ, Laurindo FR. Cross-talk between mitochondria and NADPH oxidase: Effects of mild mitochondrial dysfunction on angiotensin II-mediated increase in nox isoform expression and activity in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(6):1265-1278.
155. Bayorh MA, Rollins-Hairston A, Adiyiah J, Lyn D, Eatman D. Eplerenone suppresses aldosterone/ salt-induced expression of NOX-4. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2011;12(3):195-201.
156. Yamagishi S, Nakamura K, Ueda S, Kato S, Imaizumi T. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) blocks angiotensin II signaling in endothelial cells via suppression of NADPH oxidase: A novel anti-oxidative mechanism of PEDF. *Cell Tissue Res*. 2005;320(3):437-445.
157. Ray R, Murdoch CE, Wang M, et al. Endothelial Nox4 NADPH oxidase enhances vasodilatation and reduces blood pressure in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(6):1368-1376.
158. Edwards DH, Li Y, Griffith TM. Hydrogen peroxide potentiates the EDHF phenomenon by promoting endothelial Ca²⁺ mobilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(10):1774-1781.
159. Morawietz H. Endothelial NADPH oxidases: Friends or foes? *Basic Res Cardiol*. 2011;106(4):521-525.
160. Krotz F, Sohn HY, Gloe T, et al. NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood*. 2002;100(3):917-924.
161. Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ. Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂(⁻) and systolic blood pressure in mice. *Circ Res*. 2001;89(5):408-414.

162. Sun C, Sellers KW, Sumners C, Raizada MK. NAD(P)H oxidase inhibition attenuates neuronal chronotropic actions of angiotensin II. *Circ Res.* 2005;96(6):659-666.
163. Gianni D, Taulet N, Zhang H, et al. A novel and specific NADPH oxidase-1 (Nox1) small-molecule inhibitor blocks the formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. *ACS Chem Biol.* 2010;5(10):981-993.
164. Pendyala S, Gorshkova IA, Usatyuk PV, et al. Role of Nox4 and Nox2 in hyperoxia-induced reactive oxygen species generation and migration of human lung endothelial cells. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(4):747-764.
165. Briones AM, Tabet F, Callera GE, et al. Differential regulation of Nox1, Nox2 and Nox4 in vascular smooth muscle cells from WKY and SHR. *J Am Soc Hypertens.* 2011;5(3):137-153.
166. Walsh TG, Berndt MC, Carrim N, Cowman J, Kenny D, Metharom P. The role of Nox1 and Nox2 in GPVI-dependent platelet activation and thrombus formation. *Redox Biol.* 2014;2:178-186.
167. Dokmeci D, Akpolat M, Aydogdu N, Uzal C, Doganay L, Turan FN. The protective effect of L-carnitine on ionizing radiation-induced free oxygen radicals. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science.* 2006;33(2):75-83.
168. Haider UG, Sorescu D, Griendling KK, Vollmar AM, Dirsch VM. Resveratrol suppresses angiotensin II-induced akt/protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation and subsequent hypertrophy in rat aortic smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* 2002;62(4):772-777.
169. Herrera M, Silva GB, Garvin JL. Angiotensin II stimulates thick ascending limb superoxide production via protein kinase C(alpha)-dependent NADPH oxidase activation. *J Biol Chem.* 2010;285(28):21323-21328.
170. Wu L, Iwai M, Li Z, Li JM, Mogi M, Horiuchi M. Nifedipine inhibited angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein 1 expression: Involvement of inhibitor of nuclear factor kappa B kinase and nuclear factor kappa B-inducing kinase. *J Hypertens.* 2006;24(1):123-130.

171. Zahradka P, Werner JP, Buhay S, Litchie B, Helwer G, Thomas S. NF-kappaB activation is essential for angiotensin II-dependent proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(12):1609-1621.
172. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Konig S, Wittig B, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: Molecular mechanisms. *Circ Res.* 2000;86(12):1266-1272.
173. Zhang L, Ma Y, Zhang J, Cheng J, Du J. A new cellular signaling mechanism for angiotensin II activation of NF-kappaB: An IkappaB-independent, RSK-mediated phosphorylation of p65. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(6):1148-1153.
174. Keller J, Couturier A, Haferkamp M, Most E, Eder K. Supplementation of carnitine leads to an activation of the IGF-1/PI3K/akt signalling pathway and down regulates the E3 ligase MuRF1 in skeletal muscle of rats. *Nutr Metab (Lond).* 2013;10(1):28-7075-10-28.
175. Baek JE, Yang WS, Chang JW, et al. Fatty acid-bearing albumin induces VCAM-1 expression through c-src kinase-AP-1/NF-kB pathways: Effect of L-carnitine. *Kidney Blood Press Res.* 2010;33(1):72-84.
176. Carmona-Cuenca I, Herrera B, Ventura JJ, Roncero C, Fernandez M, Fabregat I. EGF blocks NADPH oxidase activation by TGF-beta in fetal rat hepatocytes, impairing oxidative stress, and cell death. *J Cell Physiol.* 2006;207(2):322-330.
177. Rhyu DY, Yang Y, Ha H, et al. Role of reactive oxygen species in TGF-beta1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(3):667-675.
178. Sancho P, Mainez J, Crosas-Molist E, et al. NADPH oxidase NOX4 mediates stellate cell activation and hepatocyte cell death during liver fibrosis development. *PLoS One.* 2012;7(9):e45285.
179. Yuan Q, Wang L, Zhang F, et al. Fluorofenidone suppresses epithelial-mesenchymal transition and the expression of connective tissue growth factor via inhibiting TGF-beta/smads signaling in human proximal tubular epithelial cells. *Pharmazie.* 2011;66(12):961-967.

180. Li R, Wang Y, Liu Y, et al. Curcumin inhibits transforming growth factor-beta1-induced EMT via PPARgamma pathway, not smad pathway in renal tubular epithelial cells. *PLoS One*. 2013;8(3):e58848.
181. Vaday GG, Schor H, Rahat MA, Lahat N, Lider O. Transforming growth factor-beta suppresses tumor necrosis factor alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in monocytes. *J Leukoc Biol*. 2001;69(4):613-621.
182. Gomes LR, Terra LF, Wailemann RA, Labriola L, Sogayar MC. TGF-beta1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2012;12:26-2407-12-26.
183. Kwak HJ, Park MJ, Cho H, et al. Transforming growth factor-beta1 induces tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression via activation of extracellular signal-regulated kinase and Sp1 in human fibrosarcoma cells. *Mol Cancer Res*. 2006;4(3):209-220.
184. Kim HS, Luo L, Pflugfelder SC, Li DQ. Doxycycline inhibits TGF-beta1-induced MMP-9 via smad and MAPK pathways in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(3):840-848.
185. Yang YL, Liu DD, Hsieh NK, Chen HI. Endothelin and gelatinases in renal changes following blockade of nitric oxide synthase in hypertensive rats. *Chin J Physiol*. 2008;51(3):186-195.
186. Eickelberg O, Kohler E, Reichenberger F, et al. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGF-beta1 and TGF-beta3. *Am J Physiol*. 1999;276(5 Pt 1):L814-24.
187. Gonzalez W, Fontaine V, Pueyo ME, et al. Molecular plasticity of vascular wall during N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension: Modulation of proinflammatory signals. *Hypertension*. 2000;36(1):103-109.