



ALFONSO MATE BARRERO, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Sevilla y CARMEN MARÍA V ÁZQUEZ CUETO, Catedrática del Departamento de Fisiología de la Universidad de Sevilla,

INFORMAN

Que la Tesis titulada *ACCIÓN PROTECTORA DE LA L-CARNITINA EN LA NEFROPATÍA HIPERTENSIVA*, presentada por la Lda. SONIA ZAMBRANO SEVILLA para optar al grado de octor 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 3 de Septiembre de 2013.

Fdo.: Dra. Carmen María Vázquez Cueto

Fdo.: Dr. Alfonso Mate Barrero

ÍNDICE

ABREVIATURAS	v
LISTADO DE REACTIVOS Y ANTICUERPOS	vii
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE TABLAS	xii
INTRODUCCIÓN	1
1. Nefropatía hipertensiva	3
1.1. Alteraciones estructurales y funcionales en la nefropatía hipertensiva	4
1.2. Diagnóstico y factores de riesgo en la nefropatía hipertensiva.....	5
1.3. Estrés oxidativo en la nefropatía hipertensiva	6
1.3.1. Definición, daño celular y fuentes	6
1.3.2. Balance entre el estrés oxidativo y el sistema antioxidante	8
1.3.3. Desacople de la óxido nítrico sintasa (NOS).....	9
1.3.4. NADPH oxidasa	10
1.4. Procesos inflamatorios en la nefropatía hipertensiva	18
1.5. Fibrosis en la nefropatía hipertensiva	19
1.5.1. Progresión de la fibrogénesis renal	20
1.5.2. Factor de crecimiento transformante tipo β (TGF- β)	21
2. L-carnitina	25
2.1. Biosíntesis y metabolismo	25
2.2. Funciones fisiológicas	26
2.3. Deficiencias	28
2.4. Aplicaciones terapéuticas.....	28
2.5. L-carnitina en la nefropatía hipertensiva	30
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	33
MATERIAL Y MÉTODOS	37
1. Diseño experimental y determinaciones generales.....	39
1.1. Animales y tratamientos	39
1.2. Determinación de la presión arterial y obtención de orina	39
1.3. Procesado de los tejidos	40
1.4. Determinación de la tasa de filtración glomerular	41
2. Análisis en homogeneizados de corteza renal y estudios de expresión génica y proteica	42
2.1. Homogeneización de tejidos	42

2.2. Determinación de la concentración de proteínas	42
2.3. Determinación de la peroxidación lipídica en corteza renal	43
2.4. Determinación de óxido nítrico	45
2.5. Determinación de la actividad NADPH oxidasa y de la cantidad de anión superoxido en corteza renal	46
2.6. Determinación de la actividad glutatión reductasa (GR).....	48
2.7. Determinación de la actividad glutatión peroxidasa (GPx)	49
2.8. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD)	51
2.9. Estudio de la expresión génica en corteza renal	53
2.9.1. Extracción de ARNm	53
2.9.2. Retrotranscripción (RT).....	55
2.9.3. PCR en tiempo real	56
2.10. Estudio de la expresión proteica en corteza renal	59
2.10.1 Fundamento del Western blotting	59
2.10.2. Preparación de las muestras.....	59
2.10.3. Electroforesis.....	60
2.10.4. Transferencia	62
2.10.5. Inmunodetección.....	64
3. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos.....	65
3.1. Procesado de los tejidos	65
3.1.1. Fijación	65
3.1.2. Deshidratación	66
3.1.3. Inclusión en parafina y formación de bloques	66
3.1.4 Tinción	68
3.1.4.1. Tinción con hematoxilina – eosina.....	68
3.1.4.2. Tinción de Masson-Goldner (Tricrómico de Masson)	69
3.1.4.3. Cuantificación de colágeno. Tinción de Rojo Sirio	70
3.2. Inmunohistoquímica.....	71
4. Estudios en cultivos celulares	76
4.1. Línea celular	76
4.2. Mantenimiento del cultivo celular.....	76
4.3. Estudio del efecto antifibrótico de L-carnitina in vitro.....	78
4.4. Implicación de la vía PPARγ en el efecto antifibrótico de L-carnitina.....	80

5. Análisis estadísticos	81
RESULTADOS	83
1. Estudios en animales de experimentación	85
1.1. Características generales	85
1.2. Función renal	86
1.3. Capacidad antioxidante de L-carnitina en el riñón	88
1.3.1 Grado de peroxidación lipídica en corteza renal.....	88
1.3.2. Niveles de NO en corteza renal	89
1.3.3 Actividad NADPH oxidasa en corteza renal	90
1.3.4. Actividades y expresión génica y proteica de las enzimas antioxidantes.....	95
1.3.5. Expresión génica del factor de transcripción Nrf-2	98
1.4. Capacidad antiinflamatoria de la L-carnitina en riñón	99
1.4.1. Expresión génica de marcadores inflamatorios	99
1.4.2. Expresión génica del factor de transcripción NF-κB	101
1.5. Capacidad antifibrótica de la L-carnitina en riñón	102
1.5.1. Estudio morfológico de la corteza renal	102
1.5.2. Estudio morfométrico del grado de fibrosis renal.....	103
1.5.3. Expresión génica de colágeno	108
1.5.4. Expresión génica de marcadores profibróticos.....	109
1.5.5. Estudio inmunohistoquímico de TGF-β1.....	110
1.6. Implicación del sistema renina angiotensina	111
1.7. Implicación de los factores de transcripción PPARα y PPARγ	112
1.7.1. Expresión génica de PPARα y PPARγ	112
1.7.2. Expresión proteica de PPARγ	113
1.8. Expresión génica del transportador de L-carnitina OCTN2 y del gen BBOX-1 en corteza renal	114
2. Estudios en cultivos celulares	115
2.1. Concentración de L-carnitina necesaria para revertir el efecto profibrótico de TGF-β1	115
2.2. Participación de PPARγ en la acción antifibrótica de la L-carnitina	116
DISCUSIÓN	117
1. Modelos experimentales	119
1.1. Modelo animal	119

1.2. Modelo celular	121
2. Capacidad antioxidante de la L-carnitina en la nefropatía hipertensiva	122
3. Capacidad antiinflamatoria de la L-carnitina en la nefropatía hipertensiva	125
4. Capacidad antifibrótica de la L-carnitina en la nefropatía hipertensiva.....	126
5. Implicación del sistema renina angiotensina en el efecto mediado por la L-carnitina	127
6. Papel de la familia PPAR en el efecto mediado por la L-carnitina.....	127
CONCLUSIONES	128
BIBLIOGRAFÍA.....	128

ABREVIATURAS

Ang II: angiotensina II	IECA: inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina
AP-1: proteína activadora 1	IL: interleukina
AT1: receptor tipo 1 de la angiotensina II	ILK-1: integrina 1
ATB: ácido tiobarbitúrico	Keap-1: <i>kelch-like ECH-associated protein 1</i>
ATP: adenosina trifosfato	LAP: proteína asociada a latencia
BH₄: tetrahidrobiopterina	LC: L-carnitina
BHT: butilhidroxitolueno	L-NAME: N ω -nitro-L-arginina metil éster
CACT: translocasa de acilcarnitina/carnitina	LOX: receptor de lipoproteínas oxidadas
CAPS: ácido <i>N</i> -cyclohexyl-3-aminopropanosulfónico	LTBP ½: proteína de latencia asociada a TGF
CAT: carnitina acetil transferasa	MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos
CoA: coenzima A	MDA: malondialdehído
Col: colágeno	MEC: matriz extracelular
CPT: carnitina palmitoil transferasa	MMP: metaloproteinasas de la matriz
CTGF: factor de crecimiento de tejido conectivo	NADPH: nicotinamín adenín dinucleótido fosfato
DEPC: dietilpirocarbonato	NEDDC: N-1-naftiletilenodiamida dihidrocloro
DPI: difenil-eno-iodonio	NF-κB: factor de activación nuclear κ B
ECA: enzima convertidora de angiotensina	NH: nefropatía hipertensiva
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	NO: óxido nítrico
ERK: proteína quinasa reguladora de señal	NOS: óxido nítrico sintetasa
G6P: glucosa-6-fosfato	Nrf-2: factor nuclear relacionado con el factor eritroide 2
G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	OCTN: <i>organic cation transporter novel</i>
GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	OXI: oxipurinol
GPx: glutatión peroxidasa	PA: presión arterial
GR: glutatión reductasa	PAD: presión arterial diastólica
GSH: glutatión reducido	PAS: presión arterial sistólica
GSSG: glutatión oxidado	PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
HIF: factor inducible por hipoxia	PDH: piruvato deshidrogenasa
HTA: hipertensión arterial	
I.N.T.: 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio	

PGI₂ : prostaciclina	SRA : sistema renina angiotensina
PKC : proteína quinasa C	TFG : tasa de filtrado glomerular
PLD : fosfolipasa D	TGFR : receptor del factor de crecimiento transformante
PPAR : receptor activado por el proliferador de peroxisomas	TGF-β : factor de crecimiento transformante- β
PPRE : elemento de respuesta de peroxisoma	TMP : 1,1,3,3-tetrametoxipropano
ROS : especies reactivas del oxígeno	TNFα : factor de necrosis tumoral alfa
ROT : rotenona	URL : unidades relativas de luz
RXR : receptor de retinoide X	WLC : ratas wistar tratadas con L-carnitina
SDS : dodecil sulfato de sodio	WLN : ratas wistar tratadas con L-NAME
SFB : suero fetal bovino	WLNLC : ratas wistar tratadas con L-NAME y L-carnitina
SHR : <i>spontaneously hypertensive rats</i> (ratas genéticamente hipertensas)	XOD : xantina oxidasa
Smad : <i>small mothers against decapentaplegic</i>	α-sma : α actina del músculo liso
SOD : superóxido dismutasa	
Sp1 : <i>specific protein 1</i>	

LISTADO DE REACTIVOS Y ANTICUERPOS

- **1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP)**(*Sigma-Aldrich*, EE.UU.).....Art. T-1642
- **3,3'-Diaminobencidina** (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.) Art. D-800-1
- **Ácido 2-tiobarbitúrico** (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.)Art. T-5500
- **Acido acético** (*Panreac*, España) Art. 211008.1102
- **Ácido bórico** (*Merck*, Alemania)..... Art. 1.00165.050
- **Ácido clorhídrico** (*Panreac*, España)..... Art. 141020
- **Ácido ortofosfórico al 85%** (*Merk*, Alemania)..... Art. 1005731000
- **Acido pícrico al 1.3% en H₂O₂** (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.)Art.P6744
- **Acrilamida/Bisacrilamida al 30%** (*Bio-Rad Laboratories*, EE.UU.)Art. 67784
- **Adhesivo para preparaciones histológicas** (*Neo-Mount*) (*Merk*, Alemania) ... Art. 1.09016.0500
- **Agarosa** (*Pronadisa* (*Conda*), España).....Art. 8014
- **Agua-DEPC** (*Invitrogen*, EE.UU.) Art. AM9906
- **Amonio persulfato (APS)** (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.)..... Art. A3678
- **Anticuerpo anti- GR** (*Santa Cruz*, España) Art. sc-32886
- **Anticuerpo anti-GAPDH** (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.)..... Art.G8795
- **Anticuerpo anti-GPx** (*Santa Cruz*, España) Art. sc-30147
- **Anticuerpo anti-mouse biotinilado IgG** (*Vector*, EE.UU.)..... Art. BA-9200
- **Anticuerpo anti-mouse IgG-HRP** (*Santa Cruz*, España) Art. sc-2031
- **Anticuerpo anti-NOX4** (*Santa Cruz*, España) Art. sc-30141
- **Anticuerpo anti-rabbit IgG-HRP** (*Santa Cruz*, España) Art. sc-2030
- **Anticuerpo anti-rabbit biotinilado IgG** (*Vector*, EE.UU.)..... Art. BA-1000
- **Anticuerpo anti-SOD** (*Santa Cruz*, España)..... Art. sc-11407
- **Anticuerpo anti-TGF- β_1** (*Santa Cruz*, España) Art. sc-146
- **Aspergillus nitrato reductasa** (*Roche Applied Science*, Alemania)..... Art. 10981249001
- **Azul de bromofenol** (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.)..... Art. B-8026
- **Bio-Rad Protein Assay (Reactivo Bradford)** (*Bio-Rad Laboratories*, EE.UU.)Art. 500-0006
- **Butilhidroxitolueno (BHT)** (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.) Art. B-1378
- **Cloroformo** (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.)..... Art. C-2432
- **Cloruro sódico** (*Panreac*, España).....Art. 211939
- **Cocktail de antibióticos** (Penicilina-estreptomocina) (*Invitrogen*, España).....Art.15070-063
- **Cóctel inhibidor de proteasas** (*ROCHE*, EE.UU.) Art. 11697498001
- **Complejo Avidina-biotina- peroxidasa (Extravidin)** (*Sigma-Aldrich*, EEUU.).....Art. E2886
- **DMSO: dimetilsulfóxido** (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.)..... Art. 276855

- DPBS (<i>Invitrogen</i> , España).....	Art.14190-250
- Eosina (<i>Panreac</i> , España)	Art. 251299
- Etanol absoluto (<i>Panreac</i> , España).....	Art. 141086.1214
- FastStart SYBR Green Master (<i>ROCHE</i> , Alemania).....	Art.7504673514001
- Formaldehído (<i>Panreac</i> , España).....	Art. 131328.1211
- Fosfato dipotásico (<i>Panreac</i> , España)	Art.121512
- Fosfato potásico monobásico (<i>Panreac</i> , España)	Art. 141509.EDTA
- Glicerol (<i>Sigma-Aldrich</i> , EE.UU.).....	Art. G-5516
- Glicina (<i>Sigma-Aldrich</i> , EEUU.)	Art. G-8898
- Glucosa-6-fosfato (G6P) (<i>ROCHE</i> , Alemania)	Art. 127647
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenada (G6PDH) (<i>Sigma-Aldrich</i> , EE.UU.)	Art. G-5516
- Glutación peroxidasa (kit comercial) (<i>Randox</i> , United Kingdom)	Art. RS504
- Glutación reductasa (kit comercial) (<i>Cayman Chemical Company</i> , EE.UU.)	Art. 703202
- GW9662 (2-Chloro-5-nitrobenzanilide) (<i>Merk</i> , Alemania)	Art. GW9662
- Hematoxilina de Gill nº3 (<i>Sigma-Aldrich</i> , EEUU.)	Art. GHS3
- IGEPAL (<i>Sigma-Aldrich</i> , EEUU.)	Art. I3021
- Isopropanol (<i>Sigma-Aldrich</i> , EE.UU.)	Art. I-9516
- Kit de extracción de ARNm total (RNeasy Mini Kit (50)) (<i>QIAGEN</i> , España)	Art. 74104
- Kit High-Capacity cDNA Archive (<i>Applied Biosystems</i> , España)	Art. 4322171
- Kit para la determinacion de creatinina (<i>SPINREACT</i> , España)	Art.1001111
- Kit Tricrómico de Masson (<i>Merk</i> , Alemania)	Art. 1.00485
- L-carnitina (<i>Roig Farma</i> , España)	Art. 32183-25
- Leche desnatada en polvo (<i>Bio-Rad Laboratories</i> , EEUU.).....	Art. 170-6404
- Lucigenina (<i>Sigma-Aldrich</i> , EE.UU.)	Art. M-8010
- Marcador de pesos moleculares (<i>Bio-Rad Laboratories</i> , EE.UU.).....	Art. 161-0373
- Medio de cultivo DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) (<i>Invitrogen</i> , España).....	Art.12491-015
- Metanol (<i>Panreac</i> , España)	Art. 131091.1214
- Nitrito sódico (<i>Merck</i> , Alemania)	Art. 6549
- Nω-nitro-L-arginina metil éster(L-NAME) (<i>Sigma-Aldrich</i> , EE.UU.).....	Art.N-5751
- Parafina (<i>Paraplast Plus</i> , España)	Art. 400.10
- Peróxido de hidrógeno (<i>Panreac</i> , España)	Art. 121076-1211
- Reactivo de Griess (<i>Merk</i> , Alemania)	Art. 1.09023.0500
- Reactivo de inmunodeteccion Western blotting (<i>ECL Advance</i>) (<i>GE Healthcare LifeSciences</i> , EEUU.)	Art. RPN2135
- Rojo Sirio (Direct Red 80) (<i>Sigma-Aldrich</i> , EEUU.)	Art.365548

- **Suero de cabra** (*Vector*, EEUU.).....Art. S-1000
- **Suero fetal bovino (SFB)** (*Invitrogen*, España)Art.244-0096
- **Superóxido dismutasa** (kit comercial) (*Randox*, United Kingdom) Art. SD125
- **TGF- β_1** (*R&D Biosystems*, EEUU.)..... Art. 240-B-002
- **Tolueno** (Prolabo, España)..... Art. 286775.294
- **Tripsina-EDTA (1X)** (*Invitrogen*, España).....Art.25300054
- **Tris-hidroximetil-aminometano** (TRIZMA[®], Tris) (*Sigma-Aldrich*, EE.UU.).....Art. T-1378
- **TRizol[®]** (*Invitrogen*, EE.UU.)Art. 15596018
- **Xilol** (Panreac, España)..... Art. 131769.1611
- **β -Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH)**
(*Sigma-Aldrich*, EE.UU.)..... Art. N- 6505
- **γ -Globulina bovina** (*Bio-Rad Laboratories*, EE.UU.)Art. 500-0005

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Sistema antioxidante enzimático</i>	<i>9</i>
<i>Figura 2. Tipos de NADPH oxidasas</i>	<i>12</i>
<i>Figura 3. Activación de la NADPH oxidasa en la hipertensión arterial.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 4. Vías de señalización sensibles a especies reactivas de oxígeno.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 5. Mecanismos de acción de la familia PPARs.</i>	<i>17</i>
<i>Figura 6. Generación de inflamación renal en la HTA.....</i>	<i>19</i>
<i>Figura 7. Vías de señalización mediadas por el TGF-β en la hipertensión arterial.</i>	<i>23</i>
<i>Figura 8. Estructura química de la L-carnitina.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 9. Acciones fisiológicas de la L-carnitina</i>	<i>27</i>
<i>Figura 10. Determinación de la actividad NADPH oxidasa.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 11. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real</i>	<i>59</i>
<i>Figura 12. Equipo necesario para la realización de la técnica de Western blotting</i>	<i>60</i>
<i>Figura 13. Esquema representativo de la inmersión de tejidos en parafina</i>	<i>67</i>
<i>Figura 14. Esquema representativo del complejo avidina-biotina-peroxidasa</i>	<i>75</i>
<i>Figura 15. Fotografía de contraste de fase de células NRK-52E.</i>	<i>76</i>
<i>Figura 16. Estudio del efecto antifibrótico de la L-carnitina in vitro.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 17. Análisis de la participación de PPARγ en el efecto antifibrótico de la L-carnitina.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 18. Pesos corporales y relación peso corporal/peso riñón.....</i>	<i>85</i>
<i>Figura 19. Cifras de presión arterial.....</i>	<i>86</i>
<i>Figura 20. Valoración de la función renal.....</i>	<i>87</i>
<i>Figura 21. Peroxidación lipídica en homogenados de corteza renal.....</i>	<i>88</i>
<i>Figura 22. Niveles de nitritos y nitratos (NOx) y expresión génica de la enzima eNOS.....</i>	<i>89</i>
<i>Figura 23. Actividad NADPH oxidasa y niveles de anión superóxido</i>	<i>92</i>
<i>Figura 24. Expresión génica de las subunidades de la NADPH oxidasa</i>	<i>93</i>
<i>Figura 25. Expresión proteica de la subunidad NOX4 en corteza renal</i>	<i>94</i>
<i>Figura 26. Actividad y expresión proteica de las enzimas antioxidantes en corteza renal</i>	<i>96</i>
<i>Figura 27. Expresión génica de las enzimas antioxidantes en corteza renal.....</i>	<i>97</i>
<i>Figura 28. Expresión génica del factor Nrf-2 en corteza renal</i>	<i>98</i>

<i>Figura 29. Expresión génica de las interleukinas IL-1β, IL-6, y IL-10 en corteza renal</i>	<i>100</i>
<i>Figura 30. Expresión génica del factor de transcripción NF-κB en corteza renal.....</i>	<i>101</i>
<i>Figura 31. Microfotografías a microscopía óptica.....</i>	<i>102</i>
<i>Figura 32. Estudio de la fibrosis en muestras de riñón teñidas con Tricromico de Masson</i>	<i>104</i>
<i>Figura 33. Estudio morfométrico de la fibrosis a nivel intersticial.....</i>	<i>105</i>
<i>Figura 34. Estudio morfométrico de la fibrosis a nivel mesangial.</i>	<i>106</i>
<i>Figura 35. Estudio del área corpuscula</i>	<i>107</i>
<i>Figura 36. Expresión génica de colágeno I y III en corteza renal</i>	<i>108</i>
<i>Figura 37. Expresión génica de los factores profibróticos TGF-β1 y CTGF en corteza renal.....</i>	<i>109</i>
<i>Figura 38. Estudio inmunohistoquímico de TGF-β1 en riñón.....</i>	<i>110</i>
<i>Figura 39. Expresión génica de ECA y AT1 en corteza renal.....</i>	<i>111</i>
<i>Figura 40. Expresión génica de los factores PPARα y PPARγ en corteza renal.....</i>	<i>112</i>
<i>Figura 41. Expresión proteica de PPARγ en corteza renal.....</i>	<i>113</i>
<i>Figura 42. Expresión génica de OCTN2 y BBOX-1 en corteza renal.....</i>	<i>114</i>
<i>Figura 43. Determinación de la concentración de L-carnitina necesaria para revertir el efecto profibrótico de TGF-β1.....</i>	<i>115</i>
<i>Figura 44. Determinación de la participación de PPARγ en el efecto antifibrótico de la LC....</i>	<i>116</i>

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Definición y clasificación de las cifras de presión arterial.....</i>	<i>3</i>
<i>Tabla 2. Valores de tasa de filtración glomerular</i>	<i>6</i>
<i>Tabla 3. Primers utilizados en los estudios de PCR en tiempo real</i>	<i>58</i>
<i>Tabla 4. Preparación del gel separador a diferentes concentraciones.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 5. Condiciones de la inmunodetección para cada anticuerpo</i>	<i>64</i>

INTRODUCCIÓN

1. Nefropatía hipertensiva

La hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales problemas de salud a nivel global. En España, la prevalencia de esta patología en adultos es del 35% (cifra que se eleva hasta el 65% en personas mayores de 65 años), afectando aun un total de 10 millones de sujetos.^{1,2} Además, la HTA es considerada un factor de riesgo para el padecimiento de enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y renales.³ Se considera que un paciente sufre HTA cuando experimenta una elevación mantenida de las cifras de presión arterial (PA) por encima de los límites normales, como se muestra en la tabla 1.⁴

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

Tabla 1. Definición y clasificación de las cifras de presión arterial. Los valores recogidos en la tabla se expresan en milímetros de mercurio (tomado de: *European Society of Hypertension - European Society of Cardiology: guidelines for the management of arterial hypertension. J. Hypertens. 2013;31:1281*).

Esta elevación desmesurada de las cifras de PA provoca daños en diferentes órganos, como el corazón, los riñones, el cerebro, la vasculatura y los ojos, causando cambios estructurales y funcionales que son determinantes para la progresión de la enfermedad.

La nefropatía hipertensiva (NH) es un concepto que engloba la serie de daños que la HTA causa sobre el riñón. Los pacientes hipertensos sufren alteraciones en la microcirculación y el metabolismo renal, que terminan provocando daños morfológicos y funcionales.⁵ Existen estudios que muestran cómo aproximadamente el 35% de los pacientes hipertensos desarrollan NH, y que aproximadamente el 2% de éstos desarrolla una insuficiencia renal crónica.^{3,6}

Aunque los tratamientos farmacológicos han disminuido la incidencia de complicaciones cardíacas y cerebrales asociadas a la HTA, las complicaciones renales no se han conseguido reducir en la misma proporción que aquéllas, y algunos pacientes hipertensos muestran un declive en la función renal a pesar de llevar un adecuado control de las cifras de PA.⁷

Estudios realizados en el National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK, EEUU) muestran que, para disminuir significativamente el daño que la HTA causa en el riñón de pacientes hipertensos, es necesario, por un lado, reducir las cifras de PA en niveles < 130/80 mmHg, y, por otro lado, actuar sobre el sistema renina angiotensina (SRA).⁸ De esta forma, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs), han mostrado ser más efectivos para frenar el desarrollo de la NH que los betabloqueantes o los bloqueadores de los canales de calcio.⁷ Por consiguiente, se acepta que el mejor tratamiento para estos pacientes consiste en una terapia combinada que haga disminuir las cifras de PA a la vez que bloquee el SRA.

1.1. Alteraciones estructurales y funcionales en la nefropatía hipertensiva

Diversos estudios indican que la naturaleza y desarrollo de la NH son procesos heterogéneos que conducen a un fallo renal hipertensivo de origen multifactorial; en cualquier caso, aparecen elementos histopatológicos bien definidos, entre los que se encuentran:³

- Hipertrofia renal
- Depósitos hialinos y eosinofílicos en la pared de las arterias y arteriolas
- Arterioesclerosis y arterioloesclerosis
- Presencia de túbulos atrofiados con cilindros hialinos
- Fibrosis intersticial con infiltración leucocitaria, caracterizada por la invasión de elementos del sistema inmune en el intersticio y en el interior de los túbulos renales
- Glomeruloesclerosis
- Pared capilar engrosada y plegada

Se ha sugerido que el daño que la HTA causa sobre el sistema renal se da en dos etapas.⁵ En la primera etapa, de origen no renal, no se observan daños graves en el riñón porque sus mecanismos de autorregulación evitan los efectos del aumento de la PA sistémica sobre la vasculatura renal. Estos mecanismos de autorregulación se basan, entre otros, en variaciones en la contractilidad de la arteriola aferente renal. En la segunda etapa, tras la persistencia del estímulo, la arteriola aferente sufre daños y se vuelve incapaz de amortiguar el aumento de PA sistémico. En consecuencia, se produce un aumento en la presión hidrostática de la arteriola aferente que va acompañado de

un aumento del estrés oxidativo y de la inflamación intersticial; esta situación conduce al desarrollo de una disfunción endotelial que se origina una disminución en el número de podocitos, una transdiferenciación epitelio-mesenquimal y un aumento de los componentes de la matriz extracelular (MEC), causando fibrosis.

Estos daños en el tejido renal traen consigo consecuencias funcionales, entre ellas una disminución en la tasa de filtración glomerular (TFG) que se acompaña de un aumento en la proteinuria y albuminuria, pudiendo conducir a una insuficiencia renal total en los casos más extremos.

1.2. Diagnóstico y factores de riesgo en la nefropatía hipertensiva

Por definición, el diagnóstico de la NH debe llevarse a cabo mediante estudios histológicos. No obstante, debido a que la realización de una biopsia es un método bastante agresivo, normalmente el diagnóstico se lleva a cabo mediante una serie de consideraciones clínicas. Algunas de estas consideraciones están basadas en los estudios de Schlessinger y col.,⁹ destacando:

- Historial familiar de HTA
- Presencia de cardiomiopatía hipertensiva
- Grado de proteinuria
- Disminución de la TFG (ver tabla 2)
- Ausencia de exposición a nefrotoxinas
- Ausencia de enfermedades congénitas renales o enfermedades sistémicas asociadas a enfermedad renal)

Hay que tener en cuenta que la proteinuria no aparece en todos los casos de NH, por lo que es siempre recomendable la determinación de la TFG. Hay que señalar, no obstante, que el grado de proteinuria sí ha resultado ser efectivo en la predicción de eventos cardiovasculares ligados a la HTA de manera independiente de la TFG.¹⁰

Etapa	Descripción	TFG (ml/min/1,73m ²)
1	Riñón con un TFG normal	>90
2	Riñón con un daño leve	60-89
3	Riñón con un daño moderado	30-59
4	Riñón con un daño severo	15-29
5	Fallo renal	<15

Tabla 2. Valores de tasa de filtración glomerular (TFG) asociados al desarrollo de enfermedades renales.

Existen diversos factores de riesgo que favorecen la aparición de NH,^{3,11} por lo que su conocimiento es importante a nivel preventivo. Entre estos factores podemos incluir:

- Factores genéticos. Aunque se han estudiado muchos genes que podrían estar implicados, los más conocidos son los polimorfismos en el gen de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).
- Trastornos metabólicos, como resistencia a la insulina
- Aterosclerosis
- Raza (más común en personas de raza negra)
- Edad > 64años
- Género (más común en hombres)
- Tabaquismo

1.3. Estrés oxidativo en la nefropatía hipertensiva

1.3.1. Definición, daño celular y fuentes

El estrés oxidativo se define como la acumulación de *especies reactivas*, también denominadas *radicales libres*. Los radicales libres se caracterizan por tener un electrón desapareado en su orbital más externo, lo que les concede un carácter prooxidante. Este electrón, al reaccionar con otras moléculas, afecta a su integridad y ocasiona la generación de más radicales libres, generándose así una reacción en cadena que, en su avance, llega a afectar la integridad de las biomoléculas que forman las células (ADN, proteínas y lípidos).¹² Es un hecho aceptado que la acumulación de estas especies reactivas es perjudicial para la salud, y que están relacionadas con la fisiopatología de enfermedades tales como la HTA, el cáncer, el

Alzheimer o la aterosclerosis, además de con el proceso normal de envejecimiento.¹³⁻

15

Especies reactivas del oxígeno

La gran mayoría de estas especies reactivas pertenece a las denominadas *especies reactivas del oxígeno* (normalmente abreviadas como ROS, del término anglosajón *Reactive Oxygen Species*). Existen varios tipos de ROS, algunas son radicales libres del oxígeno, como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el hidroxilo (OH^{\cdot}) y el oxígeno singulete (1O_2); otras, sin ser radicales libres, pertenecen al grupo de ROS por tratarse de especies con una alta capacidad de generar radicales, como el peróxido de hidrogeno, (H_2O_2) y el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$).¹⁶

Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Se forma cuando el oxígeno acepta un electrón. El $O_2^{\cdot-}$ es una de las ROS más abundantes y de más relevancia en las patologías cardiovasculares y renales.¹⁷ Su carga le hace que sea incapaz de atravesar membranas celulares, excepto a través de canales iónicos. Existen varias fuentes de $O_2^{\cdot-}$, como la cadena de transporte de electrones mitocondrial, la lipoxigenasa, la cicloxigenasa, el citocromo P-450, la enzima xantina oxidasa, la óxido nítrico sintasa (NOS) desacoplada y la más importante de todas, por ser la mayor fuente de $O_2^{\cdot-}$ en el organismo, que es la Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato oxidasa (NADPH oxidasa). El desacople de la NOS y la actividad de la NADPH oxidasa se describen con más detalle en los apartados 1.3.3 y 1.3.4, respectivamente.

Peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Es una especie que se produce durante la respiración normal celular. Este compuesto es relativamente estable y difunde fácilmente entre las células. La enzima superóxido dismutasa (SOD) es una de las enzimas del sistema antioxidante (ver apartado 1.3.2) que desempeña un papel fundamental en la producción de H_2O_2 . Por último, en los últimos años está cobrando especial interés la producción de H_2O_2 a partir de la NADPH oxidasa no fagocítica,¹⁸ como se menciona en el apartado 1.3.4. Tanto el H_2O_2 como el $O_2^{\cdot-}$ son compuestos poco reactivos; sin embargo, ambos son tóxicos principalmente por su capacidad para generar OH^{\cdot} y 1O_2 .

Radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Es una molécula altamente oxidante y de vida muy corta. Las principales fuente de OH^{\cdot} son: a través de la interacción de H_2O_2 con Fe^{2+} u otros

metales traza, mediante la conocida como reacción de Fenton;¹⁹ y a través de la interacción de H_2O_2 con $\text{O}_2^{\cdot-}$, mediante la reacción de Haber-Weiss.²⁰

Oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$). Es una especie muy reactiva, que se relaciona con procesos destructivos de membranas, fagocitosis y envejecimiento. Se genera tras la interacción de H_2O_2 con ONOO^- . Este radical puede interaccionar con moléculas biológicas como ADN, lípidos y proteínas, generando daños graves a nivel celular.

Anión peroxinitrito (ONOO^-). Es una especie altamente oxidante, que se genera por la reacción entre óxido nítrico (NO) y $\text{O}_2^{\cdot-}$.^{21,22} El peroxinitrito es bastante estable y genera daños graves en las células.

1.3.2. Balance entre el estrés oxidativo y el sistema antioxidante

Los niveles de las ROS no solo dependen de su producción, sino también de la actividad del sistema de defensa antioxidante del organismo, que se encarga de la regulación de la homeostasis redox. Este sistema consta de diferentes enzimas, así como de algunas moléculas que poseen actividad antioxidante.

Las enzimas que forman parte del sistema antioxidante son la SOD, la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR) y la catalasa (figura 1). Existen 3 isoformas de la enzima SOD: la citosólica (Cu/Zn-SOD), la mitocondrial (Mn-SOD) y la extracelular (ec-SOD); todas ellas son responsables de la regulación de los niveles de $\text{O}_2^{\cdot-}$, ya que catalizan la dismutación de éste a H_2O_2 . Por otro lado, la catalasa y la GPx catalizan la reducción de H_2O_2 a H_2O , utilizando esta última glutatión reducido (GSH) como donador de electrones. Este GSH se oxida para generar glutatión oxidado (GSSH), que es nuevamente reducido a GSH por la enzima GR.¹⁷

Además de las enzimas antioxidantes, existen moléculas con capacidad antioxidante, como el mencionado GSH, los flavonoides y algunas vitaminas, entre otros.

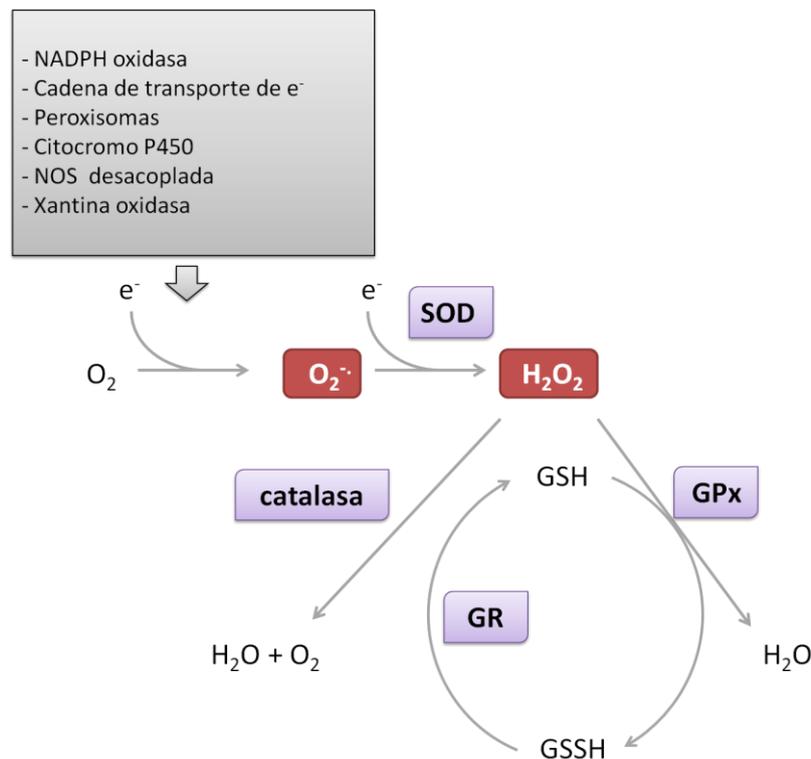


Figura 1. Sistema antioxidante enzimático. SOD, superóxido dismutasa. GR, glutatió reductasa. GPx, glutatió peroxidasa. NOS, óxido nítrico sintasa. GSH, glutatió reducido. GSSG, glutatió oxidado.

1.3.3. Desacople de la óxido nítrico sintasa (NOS)

La biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) es uno de los factores clave en los sistemas cardiovascular y renal, ya que se trata de una molécula con un alto poder vasodilatador. De este modo, el balance entre su síntesis y degradación forma parte del sistema de regulación del tono vascular. La síntesis de NO se estimula por la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS); existen 3 isoformas de NOS, nNOS (neuronal), iNOS (inducible) y eNOS (endotelial), siendo clave esta última en el sistema cardiovascular.²³

La activación de la NOS puede realizarse de forma dependiente de receptores (como ocurre típicamente con los receptores de acetilcolina), o de forma independiente de éstos, como por ejemplo mediante estrés mecánico sobre la pared vascular.²¹

La existencia de una baja biodisponibilidad de NO puede deberse a varios factores. Por un lado, podría deberse a una disminución en la síntesis de NO por un descenso en la expresión génica o proteica de NOS, por una disminución en el sustrato (L-arginina) o cofactores de la NOS, o por un mal funcionamiento de la misma. Por otro

lado, la menor biodisponibilidad de NO puede ser consecuencia de un aumento en su degradación.

Una elevación en los niveles de ROS disminuye la biodisponibilidad de NO,²¹ ya que, como se menciona en el apartado 1.3.1, el NO puede reaccionar con $O_2^{\cdot-}$, generando ONOO⁻, en una reacción que es más rápida que la eliminación de $O_2^{\cdot-}$ por el sistema antioxidante. Además, el ONOO⁻ tiene una capacidad prooxidante mayor que la del propio $O_2^{\cdot-}$, por lo que la interacción del NO con las ROS no solo disminuye su biodisponibilidad, sino que favorece la generación de estrés oxidativo.²⁴

En condiciones normales, la NOS recibe y almacena suficientes electrones desde el NADPH para transformar la L-arginina y el O_2 (sustratos de la reacción) en NO y L-citrulina (productos de la reacción). Sin embargo, en situaciones de deficiencia de sustrato o del cofactor tetrahidrobiopterina (BH_4), la NOS no genera NO, sino que transfiere los electrones del NADPH al O_2 , resultando la formación de $O_2^{\cdot-}$; a este proceso se le denomina *desacople* de la NOS.

Se sabe en la actualidad que un entorno prooxidante favorece el desacople de NOS, generándose a su vez mas ROS.²² Un estudio realizado por Dikalova y col.²⁴ muestra cómo un tratamiento con BH_4 en ratones con hipertensión generada por Angiotensina II (Ang II), trajo consigo una mejora significativa de los valores de PA, mostrando así la participación de este proceso en la HTA. En un estudio llevado a cabo en ratas con hipertensión inducida por L-NAME (N- ω -nitro-L-arginina metil éster, inhibidor de la NOS), fue necesario tanto disminuir el nivel de ROS como aumentar la expresión de NOS, para restaurar los niveles de PA.²⁵

1.3.4. NADPH oxidasa

Como comentamos en el apartado 1.3.1., las ROS son producidas por distintas fuentes, pero existen evidencias de que el complejo enzimático NADPH oxidasa es la principal fuente de ROS en los sistemas cardiovascular y renal.^{22,26,27} Originariamente, la estructura y función de la NADPH oxidasa fue identificada en neutrófilos y macrófagos; de ahí que comúnmente se la denomine NADPH oxidasa fagocítica. Estructuralmente, la NADPH oxidasa fagocítica consta de dos subunidades de membrana, gp91^{phox} (también denominada NOX2) y p22^{phox}, que juntas conforman el citocromo b₅₅₈. Por otra parte, en el citosol se encuentran las subunidades p47^{phox},

p67^{phox} y p40^{phox}, y una proteína G de bajo peso molecular denominada Rac.²⁸ La subunidad gp91^{phox} es la que ejerce la actividad oxidasa; actúa como un transportador de electrones desde el NADPH, que se encuentra unido a la región citosólica de dicha subunidad, hasta el oxígeno que se encuentra al otro lado de la membrana, generando así O₂⁻.²⁸ La subunidad p22^{phox} ejerce un efecto estabilizador, ya que sin ella la subunidad gp91^{phox} es inestable y no ejerce su acción catalítica. Bajo ciertos estímulos, la subunidad citosólica p47^{phox} es fosforilada; de este modo, recluta a las demás subunidades citosólicas (p40^{phox} y p67^{phox}), y juntas forman un complejo que se transloca a membrana. Dicho complejo, junto con la actividad GTPasa de la proteína Rac, provocan la activación final de la NADPH oxidasa, con la consecuente generación de O₂⁻.²⁸

En los últimos años, se han realizado numerosos estudios que muestran la presencia de NOX2 en diferentes tejidos; así, además del tejido renal, al que nos referiremos en detalle más adelante, se ha detectado NOX2 en cardiomiocitos, neuronas, hepatocitos, células del endotelio vascular o podocitos, entre otros.²⁸ Además, se han identificado varios homólogos funcionales de NOX2, a los cuales se les ha dado el nombre de NOX1, NOX3, NOX4 y NOX5, así como homólogos de las subunidades citosólicas p47^{phox} y p67^{phox}, denominados NOXO1 y NOXA1, respectivamente.

Las distintas NOX se diferencian en cuanto a su estructura, mecanismo de activación y localización tisular y celular. Como muestra la figura 2, las subunidades NOX1 y NOX3 también requieren la subunidad p22^{phox} para ejercer su actividad. La activación de NOX1 se produce tras la translocación de NOXO1 y NOXA1, mientras que NOX3 parece que solo necesita a NOXO1 para activarse. La subunidad NOX5 no requiere de ninguna otra subunidad para su activación, sino que se activa mediante la interacción de Ca²⁺ con residuos situados en su región citosólica.²⁹

En el caso de NOX4, de especial relevancia en el tejido renal, como se menciona más adelante, sí se requiere la presencia de p22^{phox} para su funcionamiento.³⁰ El modo de acción de NOX4 es un tema de controversia, ya que existen autores que opinan que NOX4 es una subunidad que actúa de forma constitutiva,³⁰ mientras que otros estudios recientes muestran cómo la Ang II puede regular la generación de ROS en el riñón a través de NOX4,^{31,32} implicando a la proteína citosólica Rac en este efecto.²⁸

Otro tema que suscita polémica con respecto a la subunidad NOX4 es la posibilidad de que esta subunidad genere H_2O_2 en lugar de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Algunos autores opinan que NOX4 genera $\text{O}_2^{\cdot-}$, pero que éste rápidamente es transformado en H_2O_2 por la SOD.^{32,33} Sin embargo, otros autores piensan que NOX4 tiene la capacidad de generar directamente H_2O_2 .^{18,24,30,34} Sea como fuere, NOX4 se relaciona con un aumento en los niveles de H_2O_2 en algunos órganos, entre ellos el riñón.^{24,30,34}

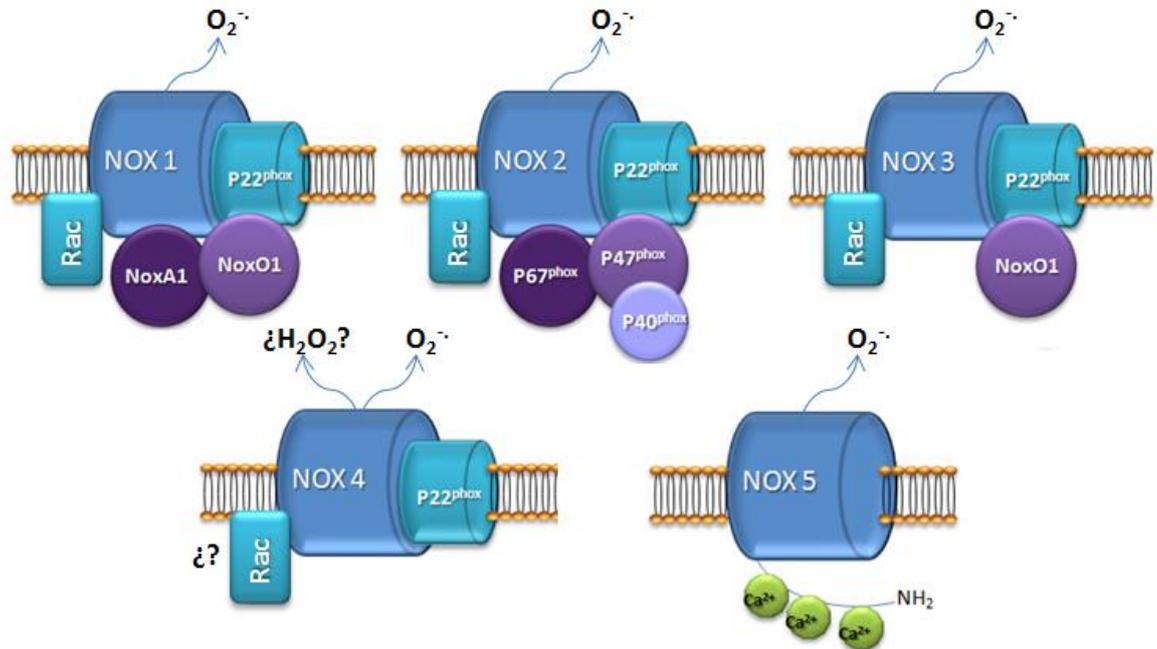


Figura 2. Tipos de NADPH oxidasas. La figura muestra los distintos tipos de NADPH oxidasas. Las subunidades NOX presentan un alto grado de homología, aunque difieren en el mecanismo de activación y en las especies reactivas que generan.

Otra diferencia entre los distintos tipos de NADPH oxidasas es la localización celular y la orientación que presentan en la membrana, que determina si las ROS generadas se emiten hacia el exterior o hacia el interior celular. La localización de las NADPH oxidasas en el interior celular va a depender no solo del tipo de NOX, sino también del tipo celular.³⁵

NADPH oxidasas en la nefropatía hipertensiva

El estrés oxidativo desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la HTA y el daño que la misma ocasiona a nivel renal. Como ya se ha señalado, la principal fuente de ROS en el sistema renal es la NADPH oxidasa.²⁶ En el riñón están presentes tres de

las isoformas de NOX (NOX1, NOX2 y NOX4), siendo la más abundante NOX4.^{18,22} No obstante, si bien la expresión y distribución de NOX4 es mucho mayor que la de NOX1 y NOX2, estudios recientes señalan que la depleción de una de estas dos últimas trae consigo una disminución de los niveles de ROS comparable a la depleción de NOX4, lo que atribuiría a ésta isoforma una actividad catalítica menor de la esperada.^{24,32} En cuanto a la distribución dentro del tejido, las subunidades NOX4 y NOX 2 se encuentran tanto en el túbulo renal como en el glomérulo,^{22,32} mientras que la subunidad NOX1 se ha identificado hasta el momento en células epiteliales tubulares.³²

La activación de la NADPH oxidasa puede estar mediada por una gran variedad de estímulos, pero los más caracterizados en cuanto al desarrollo y mantenimiento de la HTA son la interacción con Ang II y el estrés mecánico sobre la pared vascular.³⁶ En la HTA, el SRA está sobreestimulado, existiendo un aumento de Ang II (su principal molécula efectora) a nivel sistémico.^{5,37,38} Existen varios receptores para Ang II, pero el más abundante es el receptor tipo 1 (AT1).³⁸ Como muestra la figura 3, la unión de Ang II a su receptor AT1 desencadena una serie de vías moleculares que se dirigen a la activación de la proteína quinasa C (PKC), de la c-Src tirosina quinasa, y de P38, miembro de la familia de *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK); todas estas vías inducen la fosforilación de p47^{phox}, con la consiguiente activación de la NADPH oxidasa, como se ha descrito previamente. Por otro lado, la proteína c-Src, mediante diversas vías moleculares, promueve la activación de Rac, cuya actividad también es necesaria para el funcionamiento de NOX2,²² como se recoge en la figura 2. Además de esta acción de Ang II, el aumento en los niveles de PA produce estrés mecánico sobre la pared vascular, que también lleva a la activación de la subunidad Rac de la NADPH oxidasa, a través de la acción de la integrina ILK-1 (figura 3).^{39,40}

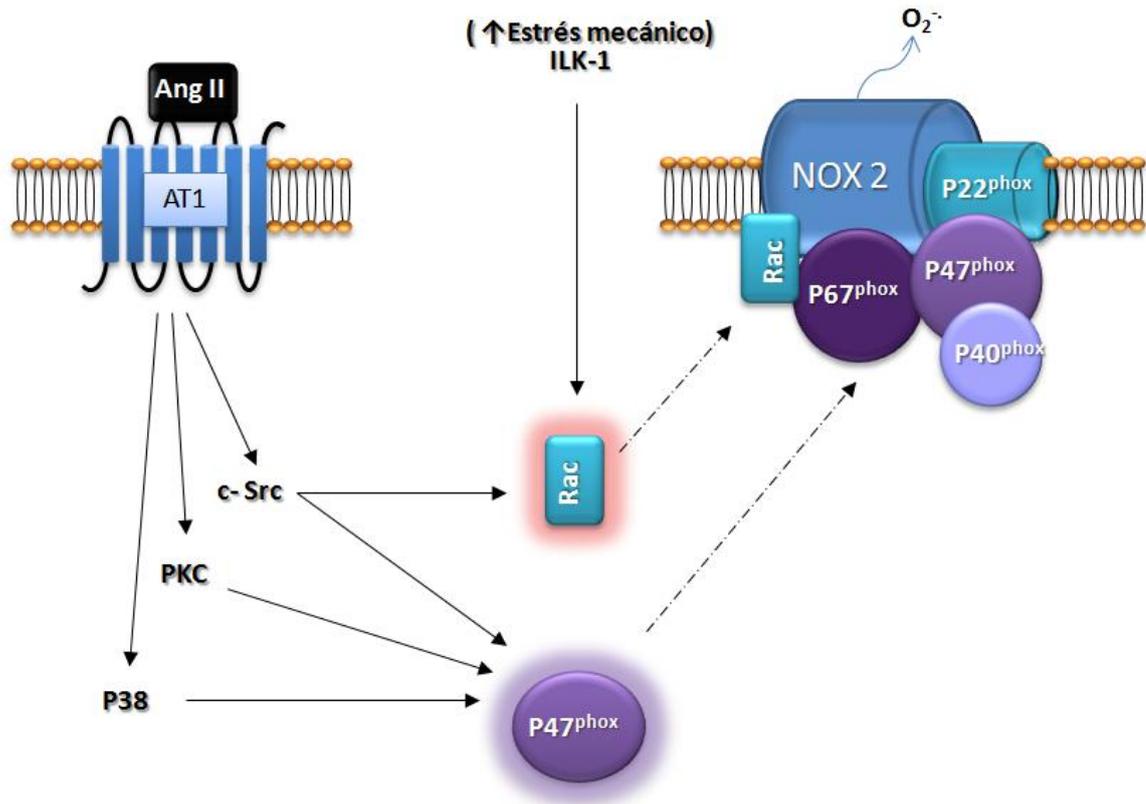


Figura 3. Activación de la NADPH oxidasa en la hipertensión arterial. La figura muestra la migración de las subunidades citosólicas de la NADPH oxidasa a membrana, gracias a la acción de Angiotensina II (Ang II) sobre su receptor tipo 1 (AT1), y a la acción del estrés mecánico contra las integrinas (ILK-1). PKC, proteína quinasa C. c-Src, proteína quinasa c-Src. p38, miembro de la familia Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK).

Como ya hemos comentado, la activación de la NADPH oxidasa trae consigo un aumento en la síntesis de ROS. La participación de las ROS en vías de señalización es un hecho aceptado. Estas vías participan o modulan el efecto vasoconstrictor, prooxidante, proinflamatorio, profibrótico y proliferativo que ejercen las ROS en el organismo, y que son, en parte, los responsables del daño renal producido en la hipertensión arterial.^{36,41}

La figura 4 ilustra algunas de las rutas moleculares más relevantes activadas por el estrés oxidativo en relación a la HTA. Por un lado, las ROS actúan sobre los canales iónicos, favoreciendo la liberación de Ca^{2+} hacia el citoplasma y promoviendo la contracción de las células musculares de la vasculatura. De esta forma, aumentan la vasoconstricción, favoreciendo el mantenimiento de la HTA.^{42,43}

Por otro lado, el estrés oxidativo aumenta la expresión y emisión de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 β , TNF- α), mediante la acción de factores de transcripción

como el denominado NF- κ B (*factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas*), la *proteína activadora 1* (AP-1) o el *factor inducible por hipoxia tipo 1* (HIF-1), promoviendo los procesos proinflamatorios que describiremos con más detalle en el siguiente apartado.^{5,44}

Además de lo citado anteriormente, el estrés oxidativo está implicado en la generación de fibrosis. Este efecto está mediado por factores de transcripción, como HIF-1 y LOX-1 (receptor de lipoproteínas oxidadas 1); por las vías de las MAPKs y las tirosinas quinasa, y por la activación de metaloproteinasas de matriz (MMPs). Todos estos mecanismos promueven la expresión génica de componentes de la MEC.^{5,45,46}

Las ROS también participan en procesos de proliferación celular, activando vías de señalización como las MAPKs, las MMPs, las tirosinas quinasa y el factor de transcripción AP-1, así como inhibiendo diferentes tirosinas fosfatasas.^{36,41}

Algunas de las vías *sensibles a redox* tienen un efecto autoregulador, como la activación de Nrf-2 (*factor de nuclear relacionado con el factor eritroide 2*). Gracias a un aumento de las ROS, Nrf-2 se libera de su inhibidor Keap-1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*) y viaja al núcleo, donde induce la transcripción de enzimas antioxidantes. De esta forma, el organismo amortigua los cambios en los niveles redox.^{5,47}

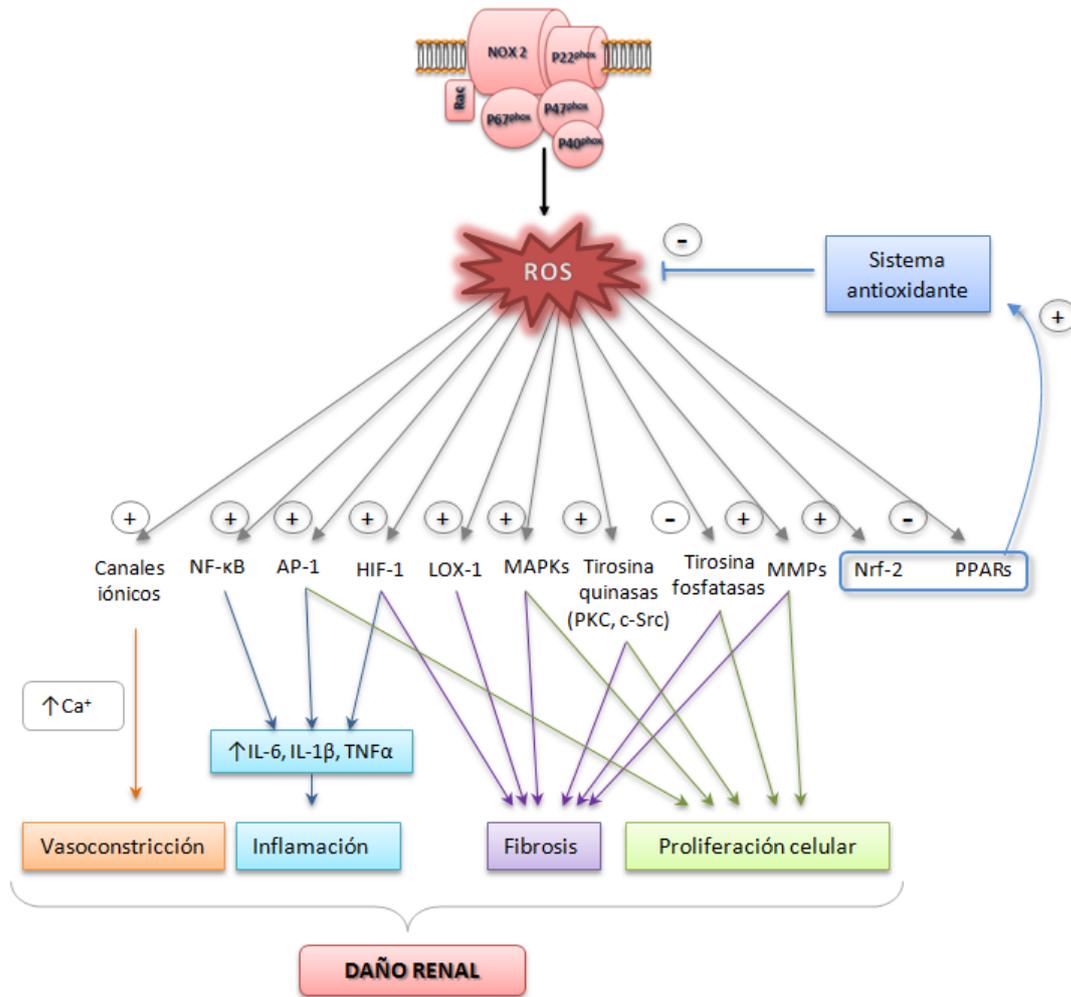


Figura 4. Vías de señalización sensibles a especies reactivas de oxígeno. La imagen muestra algunas de las vías de señalización reguladas por ROS. AP-1, proteína activadora 1. HIF-1, factor inducible por hipoxia. IL, interleukina. LOX-1, receptor de lipoproteínas oxidadas. MAPKs, proteínas quininas activadas por mitógenos. MMPs, metaloproteinasas de la matriz. NF-κB, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. Nrf-2, factor nuclear relacionado con el factor eritroide 2. PKC, proteína quinasa C. PPARs, receptores activados por el proliferador de peroxisomas. ROS, reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno). TNF- α , factor de necrosis tumoral alfa.

Por último, las ROS también actúan inhibiendo la expresión génica de factores de transcripción, como sucede con la familia PPARs (*receptores nucleares activados por el proliferador de peroxisomas*).⁴⁸ Esta familia está compuesta por tres miembros: PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ , de los cuales α y γ son los más estudiados en cuanto a sus efectos beneficiosos en enfermedades cardiovasculares. En general, los PPARs actúan regulando la expresión de genes través de distintos mecanismos moleculares (figura 5).

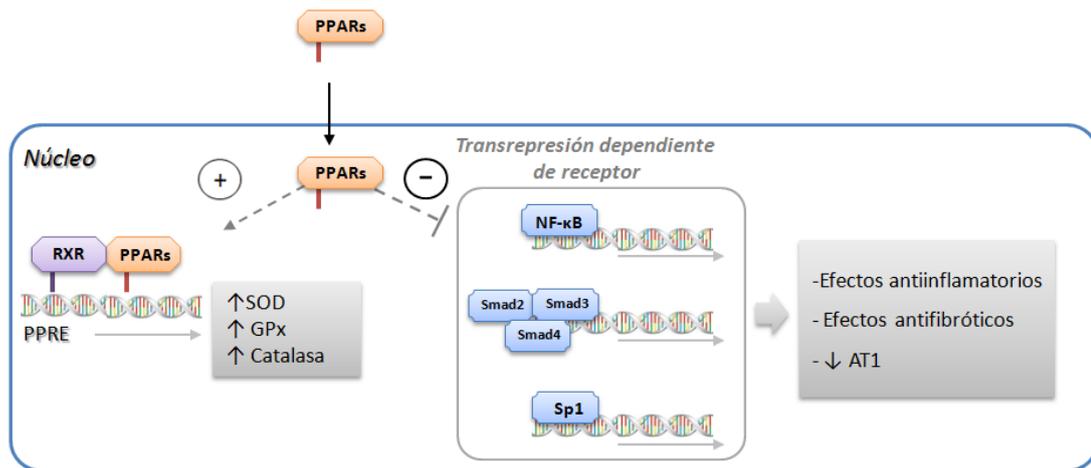


Figura 5. Mecanismos de acción de la familia PPARs. La imagen muestra los mecanismos de acción por los cuales la familia de receptores nucleares PPARs regula la expresión génica de distintas vías. AT1, receptor tipo 1 de la Angiotensina II. GPx, glutatión peroxidasa. IL, interleukina. NF-κB, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. PPARs, receptores activados por el proliferador de peroxisomas. PPRE, elemento de respuesta del proliferador de peroxisomas. RXR, receptor de retinoide X. Smad, small mothers against decapentaplegic. SOD, superóxido dismutasa. Sp1, specificity protein 1. TGF-β, factor de crecimiento transformante beta. TNF-α, factor de necrosis tumoral alfa.

Por un lado, como muestra la figura 5, los PPARs, tras diferentes estímulos, forman un heterodímero con RXR (receptor de retinoide X), y juntos interaccionan con determinadas regiones del ADN denominadas PPRE (*elemento de respuesta del proliferador de peroxisomas*).⁴⁹ De esta forma, se activa la expresión génica de componentes del sistema antioxidante (SOD, GPx, catalasa), ejerciendo así una función protectora contra el estrés oxidativo.⁵⁰ Por otro lado, la familia PPARs también regula la expresión génica de manera independiente de la unión con PPRE, inhibiendo otro tipo de factores de transcripción e influyendo en su función a través del mecanismo denominado transrepresión dependiente de receptor (figura 5). Distintos estudios han mostrado como PPARα y PPARγ pueden ejercer sus efectos antiinflamatorios a través de la inhibición de NF-κB mediante este mecanismo de transrepresión.^{48,51,52} De la misma forma, tanto PPARα como PPARγ han mostrado ser capaces de frenar el desarrollo de fibrosis mediante la inhibición de la vía Smad (*small mothers against decapentaplegic*).^{51,53,54} Por último, el tratamiento con agonistas de estos dos miembros de la familia PPAR se ha relacionado con una disminución de la expresión génica de AT1, gracias a la inhibición del factor de transcripción Sp1 (*specificity protein 1*).^{49,50} Por todo lo anterior, un aumento excesivo de las ROS no

solo causa daños por su acción mediante vías de señalización intracelular, sino que además inhibe la expresión de PPARs, disminuyendo sus efectos beneficiosos.

1.4. Procesos inflamatorios en la nefropatía hipertensiva

Los procesos inflamatorios desempeñan un papel esencial tanto en el desarrollo como en el mantenimiento de la HTA. Existe una gran cantidad de estudios que correlaciona la presencia de marcadores inflamatorios con el daño que la HTA causa sobre sus órganos diana.⁵⁵⁻⁵⁷ Este daño orgánico se lleva a cabo por la participación de las dos respuestas inmunes, la innata y la adquirida o adaptativa. De esta forma, se ha hallado tanto infiltración de macrófagos (respuesta inmune innata), como activación de linfocitos T (respuesta inmune adaptativa) en ratas SHR, principalmente en el sistema vascular y a nivel renal.⁵⁸

Si nos centramos en el daño que la HTA causa a nivel renal (figura 6), en primer lugar la subida de la PA a nivel sistémico produce una activación excesiva del SRA y un estrés mecánico sobre la pared vascular, desencadenando los mecanismos moleculares que se detallaron en el apartado anterior.^{44,58,59} De todas las vías moleculares, la activación del factor de transcripción NF- κ B es clave en este proceso, al ser éste un factor mediador que conducen a la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 β y/o TNF- α ; ver figura 4) e inhibición de la antiinflamatoria (IL-10).^{44,58,22,58} En segundo lugar, el aumento de la PA provoca la activación del sistema nervioso simpático,⁵⁸ que también desempeña un papel fundamental en la respuesta inmune. Todos estos procesos traen consigo una activación leucocitaria a nivel sistémico.

El aumento de células del sistema inmune circulantes, junto con las ROS circulantes y la acción del SNS, acaban causando una inflamación renal caracterizada por la invasión de elementos del sistema inmune (macrófagos y células T) a nivel glomerular (glomerulonefritis) y a nivel tubulointersticial. Esta inflamación, cuando se produce a nivel de los vasos preglomerulares y a nivel tubulointersticial, puede resultar en retención de sodio renal y un aumento del volumen de expansión.^{56,59}

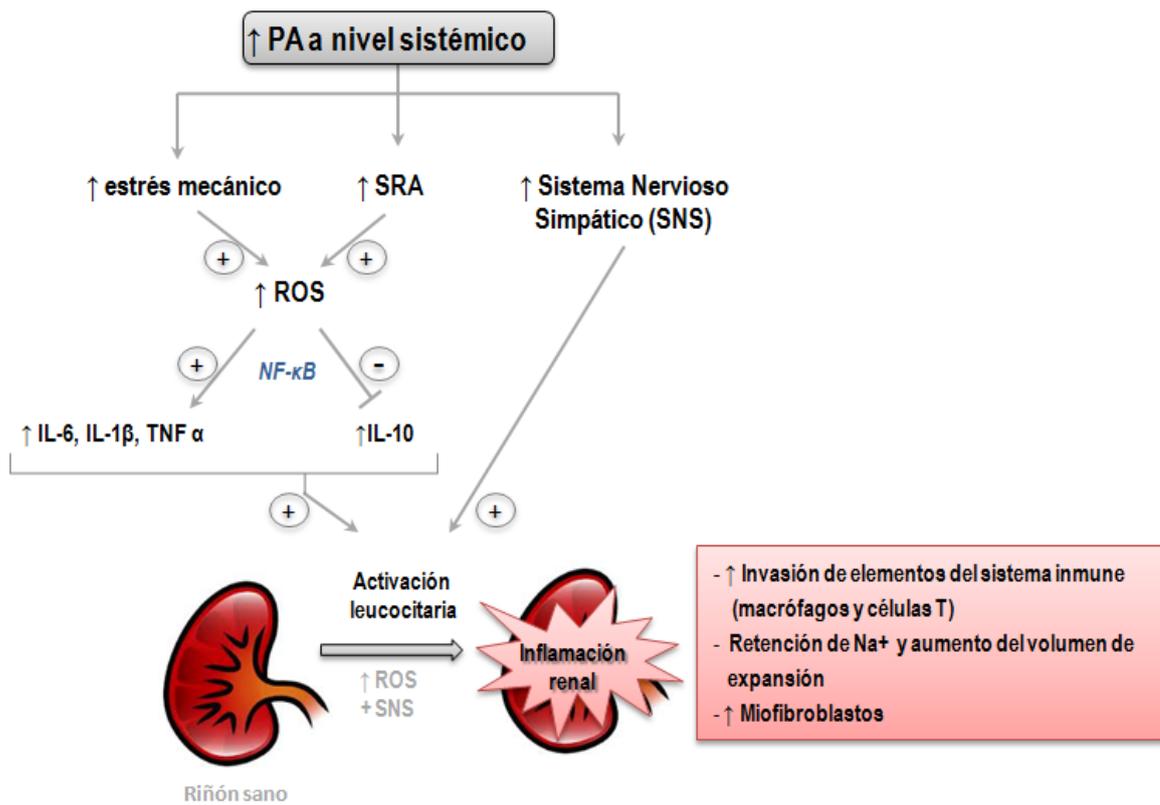


Figura 6. Generación de inflamación renal en la HTA. El aumento de la presión arterial (PA) produce una serie de mecanismos que desembocan en un aumento de la respuesta inflamatoria renal. IL, interleukina. NF-κB, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. ROS, reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno). SRA, sistema renina angiotensina. TNFα, factor de necrosis tumoral alfa.

Acompañando a todo lo anterior, aparecen procesos de transdiferenciación de células del tejido renal a miofibroblastos,⁶⁰ procesos considerados como la primera etapa en el desarrollo de la fibrogenesis renal, que trataremos con detalle en el siguiente apartado.

1.5. Fibrosis en la nefropatía hipertensiva

La fibrosis renal es el punto en el que desembocan una gran cantidad de patologías renales, entre ellas la HTA. El grado de fibrosis renal no es solo un marcador de la lesión; también se utiliza para predecir y estratificar la pérdida de función y la severidad del daño renal.⁶¹

La fibrosis se considera una respuesta anómala a la cicatrización de una herida, en la que el balance entre la generación y degradación de proteínas de la MEC queda desequilibrado hacia aquella de forma desmesurada.⁶²

1.5.1. Progresión de la fibrogénesis renal

La fibrogénesis renal se ha descrito como un fenómeno progresivo, el cual tiene como consecuencia la aparición de hiper celularidad intersticial, acumulación de MEC y atrofia tubular; todo ello trae consigo una pérdida de función y fallo orgánico.⁶⁰ Se ha dividido el proceso en 4 etapas: iniciación, activación, ejecución y progresión.^{61,63,64}

Iniciación: en primer lugar, se produce una respuesta inflamatoria en el lugar del daño (ver apartado 1.4) y un aumento de las ROS (ver apartado 1.3).

Activación: en esta fase, los protagonistas son las citoquinas proinflamatorias y los factores de crecimiento generados por las células renales y por las células inflamatorias que han sido reclutadas. Este ambiente molecular favorece que aumente el número de miofibroblastos, un tipo de células del tejido conectivo que presenta características similares a las fibras del músculo liso (p.ej., expresión de desmina, caldesmona, miosina de la cadena pesada del músculo liso y α -actina del músculo liso, α -SMA).⁶⁰ El aumento de miofibroblastos en un tejido se relaciona directamente con grado de fibrosis del mismo, ya que este tipo celular está especializado en generación de MEC. En condiciones normales, los miofibroblastos suponen una pequeña población, y provienen de la diferenciación de otros tipos celulares. Existen varios tipos de celulares que tienen la capacidad que diferenciarse en miofibroblastos, si bien los fibroblastos intersticiales y las células mesangiales glomerulares se consideran las más importantes a nivel renal.⁶⁰ Además, en esta etapa del proceso fibrogénico, se generan miofibroblastos por la vía denominada *transdiferenciación epitelio-mesenquimal*, que consiste en la diferenciación de células epiteliales tubulares a miofibroblastos,^{60,62,63,65,66} con la consecuente pérdida del parénquima renal y de la función del órgano. Existen distintos estímulos asociados a la diferenciación de los miofibroblastos, como puede ser el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*platelet-derived growth factor*, PDGF) y Ang II; no obstante, es el factor de crecimiento transformante 1 (TGF- β_1), al que nos referiremos en el siguiente apartado, el que tiene un papel central en la activación de estos procesos y constituye la vía predominante en esta etapa de la fibrogénesis.^{60,63,67}

Ejecución: el aumento y activación del número de miofibroblastos provoca una elevación en la producción de proteínas de la MEC (fibronectina, laminina y colágeno I, II, III, IV y VI).^{60,61,68} El colágeno (Col) I y el Col III constituyen dos tercios del

colágeno total en el riñón, siendo el primero el más abundante a nivel intersticial.^{63,69} El Col III es el segundo tipo de colágeno más abundante, y se encuentra asociado al Col I.^{69,70} En esta etapa, además del aumento de la síntesis de MEC, también existe un aumento de las ROS, ya que los miofibroblastos son considerados una de las mayores fuentes de ROS a nivel renal.⁶⁰ Esto trae consigo la activación de vías relacionadas con apoptosis celular e inflamación, y promueve la síntesis de más moléculas profibróticas, generándose un bucle de retroalimentación positiva que favorece el desarrollo de la fibrosis.⁶¹

Progresión: esta etapa marca un cambio de rumbo en la reparación del tejido renal. Se caracteriza por un aumento exacerbado de la generación de MEC, por los mecanismos que ya hemos comentado, acompañado por la inhibición del sistema de degradación de la MEC (caracterizado a su vez por una inhibición de la síntesis de MMPs y una activación de sus inhibidores).⁷¹ Existe un punto de no retorno que marca un antes y un después en la fibrogénesis. Aunque no se conocen del todo las razones, la duración y la severidad del daño parecen ser los factores principales que promueven el paso de una reparación normal del tejido al desarrollo de fibrosis.^{46,60,61}

Como hemos visto en este apartado, la fibrogénesis es un fenómeno progresivo en el que se dan una serie de eventos bien diferenciados. Este hecho tiene especial relevancia en clínica, donde el desarrollo de la fibrosis renal ayuda a determinar la pérdida de función y la severidad del daño, siendo el principal factor de riesgo de padecer una enfermedad renal terminal.⁶¹ Por ello, es de vital importancia estudiar las vías involucradas en este proceso, para así encontrar nuevos marcadores y diseñar nuevas terapias que permitan evitar la pérdida total de la función renal.

1.5.2. Factor de crecimiento transformante tipo β (TGF- β)

El factor de crecimiento transformante tipo β (TGF- β) es una citoquina multifuncional que está implicada en la regulación de procesos como la diferenciación y proliferación celular, la inflamación, y la producción de la MEC.^{67,72,73} Existen tres isoformas del TGF- β (TGF- β_1 , TGF- β_2 y TGF- β_3), siendo la primera de ellas la más abundante en mamíferos y la más estudiada en relación con las enfermedades cardiovasculares.⁷² Cada una de las isoformas del TGF- β se sintetiza como una gran molécula denominada pro-TGF- β , en la que el TGF- β está unido de forma no covalente a una *proteína asociada a latencia (latency-associated protein, LAP)* y a una

proteína de unión al TGF-β latente (LTBP ½), que mantiene al conjunto unido a la MEC.⁶³ La activación del TGF-β consiste en su liberación de LAP y LTBP ½; este proceso se desencadena por diferentes factores, tales como la acción proteolítica de proteasas de la matriz (MMP 2, MMP 9 y plasmina) y de las integrinas, cambios de pH, o la presencia de ROS.^{74,75} Una vez libre, el TGF-β puede actuar de forma paracrina o autocrina, uniéndose a su receptor de membrana tipo 2 (TGFBR-2), el cual se activa y forma un dímero con el receptor tipo 1 (TGFBR-1). Al dimerizarse, el TGFBR-1 se fosforila y se activa, desencadenando una cascada de señalización gracias a la fosforilación de las proteínas Smad 2 y Smad 3.⁶³ Estas proteínas Smads fosforiladas forman un trímero con Smad 4 y son translocadas al núcleo (figura 7), donde regulan la expresión de genes relacionados con proteínas de la MEC y con procesos inflamatorios.⁷⁴ Además de la activación de la vía Smad, la unión del TGF-β a sus receptores produce un aumento en la expresión de Smad7, que tiene un efecto represor sobre esta vía. Es por ello que a Smad 7 se le atribuye una acción antifibrótica.⁷⁵

El TGF-β también actúa sobre rutas independientes de Smad. Numerosos estudios muestran como la dimerización y activación de los TGFBRs activa a su vez a diferentes miembros de la familia de las MAPKs (ERK7, p38), así como la vía de la PKC (figura 7); se desencadena, pues, una gran variedad de vías de señalización, que actúan tanto de forma independiente como interaccionando, de nuevo, con las Smad.⁷⁶

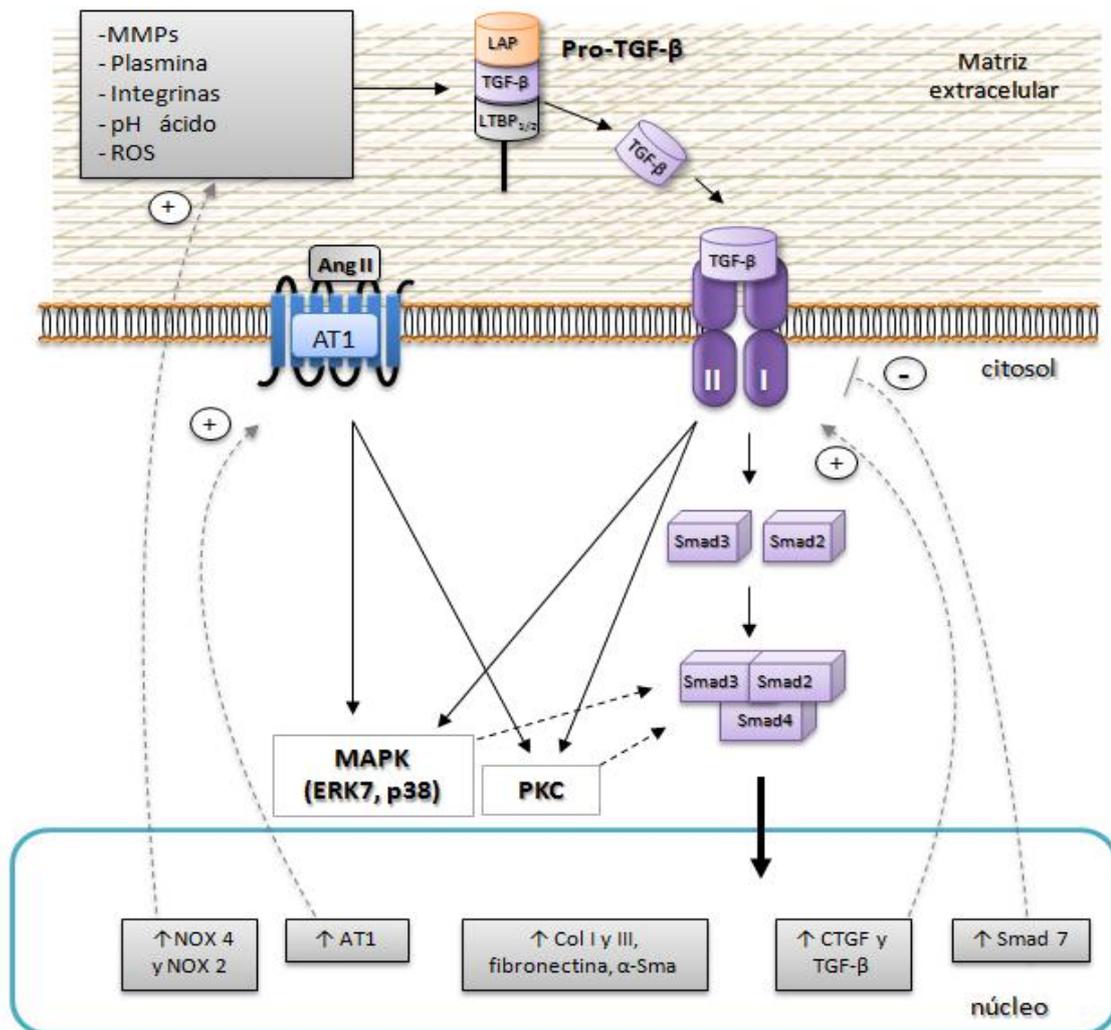


Figura 7. Vías de señalización mediadas por el TGF-β en la hipertensión arterial. En la figura se muestran los diferentes estímulos que actúan sobre el pro-TGF-β, permitiendo su liberación y unión a sus receptores, y desencadenando vías de señalización dependientes e independientes de las Smad. Además, se muestra la participación del sistema renina-angiotensina en este proceso. α-Sma, alfa-actina del músculo liso. Ang II, angiotensina II. AT1, receptor tipo 1 de Angiotensina II. Col, colágeno. CTGF, factor de crecimiento del tejido conectivo. LAP, proteína asociada a latencia. LTBP_{2/3}, proteína de unión al TGF-β latente. MAPK, mitogen-activated protein kinase. MMPs, metaloproteinasas de matriz. NOX, subunidad de la enzima NADPH oxidasa. PKC, proteína quinasa C. ROS, reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno). TGF-β, factor de crecimiento transformante beta.

La actividad del TGF-β se regula a través de su liberación del pro-TGF-β, o bien a nivel de expresión génica; pero además, el TGF-β necesita de un cofactor para su función profibrótica, el factor de crecimiento del tejido conectivo (*connective tissue growth factor*, CTGF). El CTGF, es una proteína de la MEC que participa en los procesos de angiogénesis y de adhesión celular,⁶⁷ además de ser considerado un factor clave en el desarrollo de la fibrosis. El CTGF se estimula tanto por TGF-β como por Ang II.^{77,78} Se

sabe que CTGF, por sí solo, puede aumentar la síntesis de la MEC, aunque necesita al TGF- β para provocar el desarrollo de fibrosis.^{67,79}

TGF- β_1 en la hipertensión arterial

Existen numerosas patologías, como aterosclerosis, cáncer, hipertensión o cardiomiopatías, en las que aparecen alteraciones en la actividad del TGF- β_1 .^{71,80-82} Esta citoquina puede actuar regulando positiva o negativamente procesos inflamatorios, la proliferación celular o la migración celular, dependiendo de su concentración y grado de activación. Es por ello que también existen trabajos que muestran los efectos antiinflamatorios de TGF- β_1 .^{61,63,75}

Existe una relación entre el desarrollo de HTA y el aumento de la expresión y actividad del TGF- β_1 ,^{62,71} así como de su cofactor CTGF.⁸³ El TGF- β_1 se ha asociado con elevación en los niveles de Ang II a través de la vía Smad.^{71,84} Además, la activación del receptor AT1 promueve la expresión génica y la actividad de TGF- β_1 , mediante su acción sobre componentes de la familia de las MAPKs (ERK, p38) y sobre la activación de la PKC. Estas vías, a su vez, interaccionan con las Smad, que son la vía de acción principal del TGF- β_1 . Según un estudio realizado por Leask y col.,⁶⁷ Ang II no fue capaz de generar fibrosis en ausencia de TGF- β_1 .

Por otro lado, el TGF- β_1 promueve el aumento de ROS mediante la activación de la expresión génica de las subunidades de la NADPH oxidasa, NOX2⁸⁵ y NOX4,^{18,30} que a su vez favorecen la activación de TGF- β_1 , como muestra la figura 7. La subunidad NOX4 es la predominante en los miofibroblastos,⁶⁰ y se le ha atribuido un papel clave en el desarrollo de la fibrosis renal. Un estudio realizado por Cucoranu I y col.,⁸⁶ muestra como una depleción de NOX4, mediante el uso de ARN de interferencia, inhibe el aumento de expresión génica de fibronectina, Col I y III y α -sma, en células cardiacas tratadas con TGF- β_1 , mostrando así un papel fundamental de NOX4 en la fibrogénesis.

Por consiguiente, TGF- β_1 está altamente relacionado con la fisiopatología de la HTA, no solo por su participación en el desarrollo de la fibrosis renal, sino también por su interacción con el SRA y por su efecto sobre la generación de ROS. Por todo ello, TGF- β_1 se ha convertido en una de las moléculas más estudiadas en la nefropatía hipertensiva, con el fin de desarrollar estrategias terapéuticas que corrijan las alteraciones en la actividad de esta citoquina.

2. L-carnitina

El término carnitina proviene del latín *carneus* (carne), debido a que fue aislada por primera vez (1905) a partir de músculo bovino. Sin embargo, no fue hasta 1927 cuando se estableció su estructura con carácter definitivo. Se trata de una amina cuaternaria altamente polar y soluble en agua. Existen dos estereoisómeros de carnitina (D y L), pero solo la L-carnitina (LC) (LC, 3-hidroxi-4-trimetilaminobutirato; figura 8) es biológicamente activa, mientras que el isómero D se comporta como inhibidor competitivo.⁸⁷

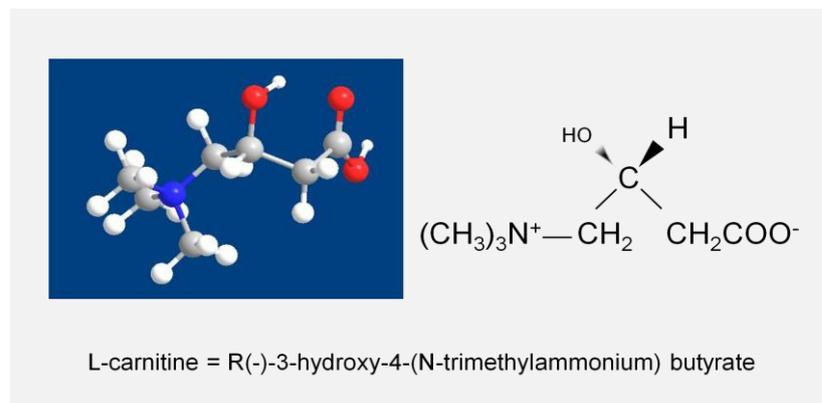


Figura 8. Estructura química de la L-carnitina

2.1. Biosíntesis y metabolismo

La LC se sintetiza biológicamente a partir de los aminoácidos lisina y metionina, siendo la vitamina B6, la vitamina C y el hierro esenciales para su síntesis.^{88,89} El 25% de la LC que nuestro organismo necesita es biosintetizada en el hígado, los riñones y el cerebro, y el 75% restante procede de la ingesta de alimentos como los huevos, la carne roja, el pescado y los lácteos. La LC es absorbida de manera activa hacia el interior del enterocito, a través de los transportadores de membrana *Organic Cation Transporter Novel* (OCTNs); posteriormente, atraviesa la membrana basolateral pasivamente hacia el torrente sanguíneo, donde la concentración de LC en humanos suele ser de 20-50 μM .⁹⁰⁻⁹² Por lo que respecta a su distribución, el 98% de la LC se encuentra en el músculo estriado y el músculo cardíaco, el 1,7% en el hígado y los riñones, y el resto en fluidos extracelulares y otros tejidos. En humanos, los niveles de la LC en plasma están regulados por la adquisición con la dieta, la tasa de biosíntesis, y también por una eficiente reabsorción renal. Así, en condiciones normales, el 98% de la LC filtrada en el glomérulo renal es reabsorbida gracias a la presencia de los transportadores OCTNs,

principalmente OCTN2, en el epitelio renal.^{90,93} La reabsorción de LC aumenta de forma inversamente proporcional a su ingesta, e independientemente de la cantidad de LC filtrada a nivel glomerular. Sin embargo la excreción de LC aumenta (ya que su reabsorción disminuye) cuando existe un aumento anormal de LC filtrada en el glomérulo. Se trata, pues, de una respuesta adaptativa para mantener la concentración de LC estable en plasma).^{88,90,91}

En el organismo podemos encontrar la LC en forma libre o esterificada. En concreto, el 80% aproximadamente suele encontrarse en forma libre, y el resto esterificada en forma de acilcarnitina, ya sea unida a ácidos grasos de cadena larga o corta.⁹⁴ Dentro de las acilcarnitinas de cadena corta se encuentran la propionil-L-carnitina y la acetil-L-carnitina, siendo esta última capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.

2.2. Funciones fisiológicas

La LC es un compuesto fundamental en el metabolismo lipídico, ya que permite el transporte de los ácidos grasos de cadena larga (> 10 carbonos) hacia el interior de las mitocondrias, donde estos son degradados para producir energía mediante el proceso de la β -oxidación. Esta función de la LC es de vital importancia en el sistema cardiovascular, donde la oxidación de ácidos grasos de cadena larga es la principal fuente de ATP.⁹⁵

El proceso de transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria implica la acción de tres enzimas: carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I), carnitina palmitoiltransferasa II (CPT II) y carnitina-acilcarnitina translocasa (CACT). CPT I se encuentra en la membrana mitocondrial externa, donde cataliza la transferencia de grupos acilo desde el acil-CoA hasta la LC; de este modo, se genera acilcarnitina, molécula que se transporta hacia el espacio intermembrana. CACT se encuentra en la membrana mitocondrial interna, y transporta la acilcarnitina hacia la matriz mitocondrial. Por último, CPT II cataliza la transferencia inversa de los grupos acilo desde la acilcarnitina hasta el Coenzima A (CoA), generando acil-CoA y liberándose de nuevo la LC.^{88,91,96}

Además de su función principal en el transporte de ácidos grasos, la LC ejerce otras funciones relevantes, como evitar la acumulación de triglicéridos en sangre, ya que mantiene elevados los niveles citoplasmáticos de CoA. Por otro lado, la LC gracias a la acción de las enzimas carnitina acetil transferasa (CAT) y CACT, favorece la salida de los

ácidos grasos de cadena corta y media desde el interior de la mitocondria, previniendo la acumulación tóxica de estos compuestos en la mitocondria, y manteniendo elevados los niveles de CoA libre; esto favorece la acción de la piruvato deshidrogenasa y facilita el acoplamiento con la glucólisis oxidativa. De esta manera se mantienen estables los niveles de glucógeno en el hígado, además de reducir la producción de ácido láctico y amonio, compuestos que causan daños en el organismo.⁹⁷

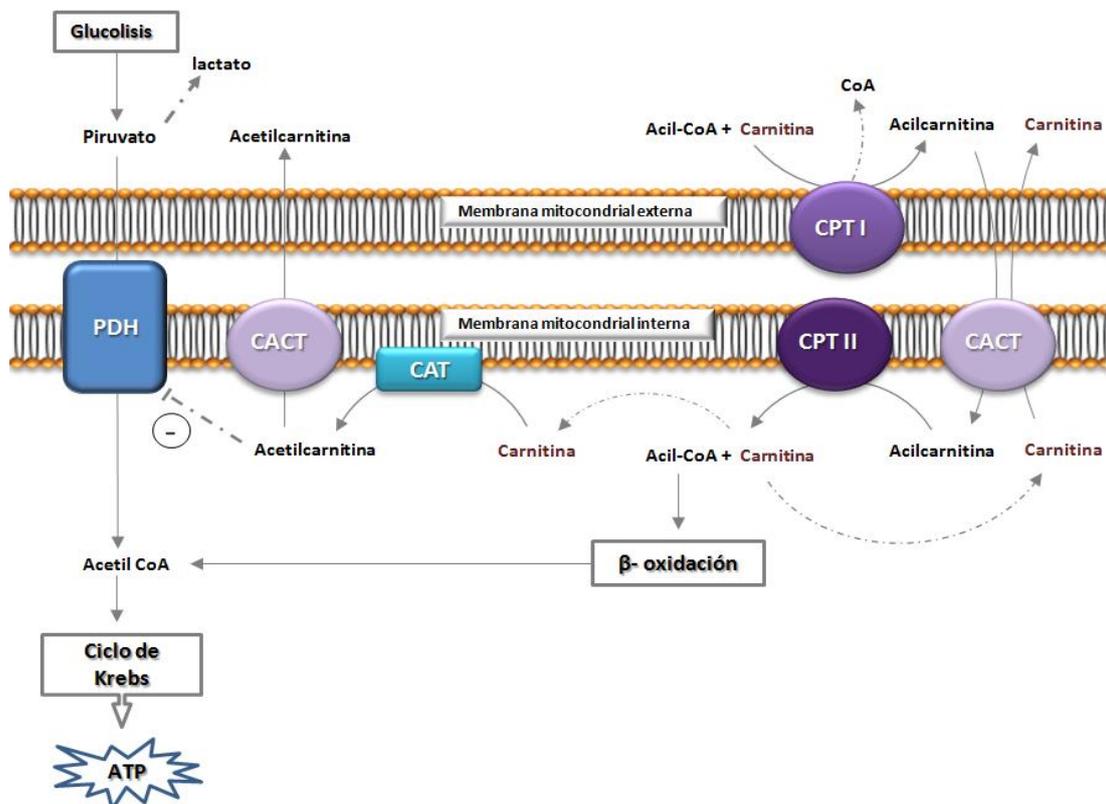


Figura 9. Acciones fisiológicas de la L-carnitina. La LC está relacionada principalmente con la incorporación de ácidos grasos de cadena larga al interior de la mitocondria para la producción de ATP. El transporte de estos ácidos grasos requiere la acción de tres enzimas, carnitina palmitoil transferasa I (CPT I), carnitina palmitoil transferasa II (CPT II) y carnitina-acetilcarnitina translocasa (CACT). La enzima CACT, además de su función como intercambiador de carnitina/acilcarnitina, actúa como transportador uniporte, desplazando acetilcarnitina hacia el exterior de la mitocondria. Esta función, junto con la acción de la proteína carnitina acetiltransferasa (CAT), es importante para la eliminación de productos tóxicos como ácidos grasos de cadena corta al exterior de la mitocondria para la producción de CoA libre. PDH, piruvato deshidrogenasa.

Finalmente, la LC, gracias a la formación de sus ésteres de cadena larga, se considera no solo un transportador de energía metabólica sino también un almacén de dicha energía.⁸⁹ Por todo lo mencionado anteriormente, la LC es esencial para el buen

funcionamiento del organismo, y sus deficiencias tienen graves consecuencias para la salud, como se expone en el siguiente apartado.

2.3. Deficiencias

Existen dos tipos de deficiencia de LC:

Deficiencia primaria de LC: se produce por una mutación recesiva en el gen del transportador de carnitina, OCTN2. Estos pacientes poseen alteraciones en la reabsorción renal de LC y en el transporte de ésta hacia los tejidos.⁹⁸⁻¹⁰⁰

Deficiencia secundaria de LC: la deficiencia secundaria de LC puede tener diversos orígenes. Entre ellos destaca la administración de ciertas drogas, como ácido piválico (presente en ciertos antibióticos)¹⁰¹ o ácido valpróico (antiepiléptico);¹⁰² pacientes con un daño renal grave que afecte a la reabsorción tubular;¹⁰³ pacientes sometidos a hemodiálisis;^{95,103} enfermos de cáncer,^{104,105} anorexia¹⁰⁶ y pacientes sometidos a nutrición enteral,¹⁰⁷ entre otros.

Algunos de los síntomas asociados a la deficiencia de LC son: acidosis metabólica, aumento del tamaño del hígado e insuficiencia hepática, aumento en los niveles de transaminasas, aumento de los triglicéridos en sangre, aumento en los niveles de amonio (sobre todo en niños), miopatía esquelética, fatiga, cardiomiopatía y arritmias, entre otros.^{99,100}

2.4. Aplicaciones terapéuticas

La administración farmacológica de LC está actualmente aprobada en España para el tratamiento de isquemia miocárdica (aguda y crónica), miocardiopatías producidas por adriamicina y antidepresivos tricíclicos, miopatías por carencia de L-carnitina, y pérdidas de L-carnitina secundarias a hemodiálisis¹. Sin embargo, existe una gran cantidad de estudios que muestran efectos beneficiosos adicionales de la suplementación con LC en patologías muy diversas. Así, en las dos últimas décadas, se ha investigado ampliamente sobre la suplementación con LC en enfermedades como cáncer,¹⁰⁸ Parkinson,¹⁰⁹ enfermedades cardiovasculares,^{110,111} renales¹⁰³ y en la diabetes,⁹¹ entre muchas otras. Esto se debe, por un lado, a que algunas de estas patologías y/o sus tratamientos están relacionadas con deficiencias de LC.^{95,97} Sin

¹ www.vademecum.es.

embargo, numerosos estudios muestran que la LC es un agente pleiotrópico, capaz de ejercer sus efectos beneficiosos en patologías en las que no existe carencia de LC, y a través de mecanismos de acción que parecen no estar ligados al metabolismo de las grasas.¹¹²⁻¹¹⁴ Estos mecanismos de acción se están estudiando en la actualidad y, aunque existen muchas teorías, continúan siendo un misterio. Entre los efectos beneficiosos de la LC cabe destacar su efecto antioxidante, antiproliferativo, antiinflamatorio, antiapoptótico y antifibrótico.^{92,115-117}

Además de los usos terapéuticos mencionados anteriormente, en los últimos años ha aumentado el número de estudios sobre el efecto de la LC en pacientes que sufren desórdenes neurodegenerativos, como Alzheimer,^{118,119} depresión,¹¹⁸ autismo¹²⁰ o enfermedad de Huntington,¹²¹ entre otros. Como hemos mencionado, la LC puede atravesar la barrera hematoencefálica en forma de acetil-LC; de esta forma, suministrando acetil-LC a los pacientes se logra aumentar su biodisponibilidad en el sistema nervioso central, consiguiéndose una disminución de las ROS y de marcadores proinflamatorios, lo que se traduce en una mejora de estos desórdenes.

Otras de las aplicaciones clínicas de la LC son las relacionadas con los desórdenes nutricionales, como la anorexia¹⁰⁶ y la fatiga crónica, sobre todo en relación con pacientes de cáncer.¹⁰⁸ En estos casos, la LC ha mostrado una acción ergogénica y de aumento de la masa muscular, ya que disminuye la proteólisis muscular y aumenta el apetito.¹⁰⁸

De todas las propiedades atribuidas a la LC, quizás las más populares son las relacionadas con la medicina deportiva y con la “quemada” de grasas. Sin embargo, no existen evidencias que muestren el efecto lipogénico de la LC en sujetos sanos no obesos, ya que la concentración de LC necesaria para que la enzima CPT I alcance su velocidad media de acción es de 400-700 μM , bastante por debajo de las concentraciones musculares normales (aprox. 4 mM).¹²² No obstante, la suplementación con LC ha mostrado un efecto ergogénico y antioxidante en personas sanas que realizan ejercicio físico de alta intensidad. En dichos sujetos, la suplementación con LC trajo consigo una disminución de la producción de ácido láctico y un aumento en la actividad del complejo piruvato deshidrogenasa, manteniendo así estables los niveles de glucógeno.¹²³

2.5. L-carnitina en la nefropatía hipertensiva

Como mencionamos en el apartado 1, la HTA es uno de los mayores problemas de salud en la actualidad. En los últimos años se ha hecho un gran progreso en el conocimiento de esta patología, de modo que actualmente se están manejando nuevos enfoques terapéuticos para su tratamiento. El daño orgánico asociado a la HTA es un factor clave a la hora de buscar nuevas terapias contra esta patología; por ello, es importante encontrar estrategias terapéuticas que no solo reduzcan las cifras de PA, sino que también protejan a los órganos diana del daño que la HTA causa sobre ellos.

Nuestro grupo de investigación lleva años estudiando los efectos beneficiosos de la LC en la HTA y en el daño orgánico que ésta provoca. Estudios realizados por Gómez-Amores y col.,¹¹⁵ mostraron como la LC redujo significativamente las cifras de PA en un modelo animal de hipertensión, las ratas con hipertensión espontánea (Spontaneously Hypertensive rats, SHR). Resultados similares se encontraron en otros modelos experimentales de HTA, como en las ratas sometidas a sobrecarga de fructosa,¹²⁴ o aquellas tratadas con N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), un inhibidor de la síntesis de NO.¹¹⁶ Existen pocos trabajos en humanos que muestren el efecto de LC como antihipertensivo. En un estudio realizado por Ruggenenti y col.,¹²⁵ se muestra el efecto antihipertensivo de la LC en pacientes con resistencia a la insulina causada por diferentes factores de riesgo, entre ellos la HTA. Este efecto hipotensor de la LC podría deberse al hecho de que este compuesto es capaz de mejorar la disfunción endotelial, como se ha observado en ratas SHR; dicho efecto parece estar relacionado con un incremento de la biodisponibilidad de NO y de prostaciclina (PGI₂), sustancias con acción vasodilatadora, así como por una disminución de las ROS.¹²⁶ El tratamiento con LC ha mostrado igualmente tener un efecto vasodilatador dependiente de endotelio en arterias subcutáneas humanas,¹²⁷ debido igualmente a un aumento en la actividad de la PGI₂.

Aunque los mecanismos por los cuales la LC ejerce su acción antihipertensiva son aún objetivo de estudio, es un hecho aceptado que la LC tiene efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antifibróticos que la convierten en una molécula interesante desde el punto de vista terapéutico. En ratas SHR, el tratamiento con LC restauró el sistema antioxidante y disminuyó la generación de ROS por parte de la NADPH oxidasa, tanto a nivel sistémico como en corazón; además, la LC produjo un descenso significativo en la expresión de ECA y AT1,⁹² demostrándose así una relación entre la LC y el SRA. En ratas

tratadas con L-NAME y LC simultáneamente, la disminución en las cifras de PA fue acompañada por una disminución de las ROS, así como por un aumento de la NOS y de NO, lo cual podría indicar que la LC actúa a través de diferentes mecanismos de acción.⁸⁸

Otra de las características asociadas a la acción de la LC es su efecto antiinflamatorio. Este efecto se ha relacionado con una reducción a nivel sistémico de citoquinas proinflamatorias, como IL-6, IL-1 β o TNF- α .^{128,129} Un estudio realizado en pacientes urémicos, tratados con 20 mg LC/kg, resultó en un decremento notable en los niveles de la citoquina proinflamatoria proteína C reactiva al finalizar su sesión de diálisis durante un periodo de 6 meses. Los autores concluyeron que, en pacientes con problemas renales, los beneficios clínicos del tratamiento con LC se deben, en gran medida, a la acción antiinflamatoria de la misma.¹³⁰

Por otro lado, el tratamiento con LC atenuó el remodelado cardiaco y la acumulación de componentes de la MEC observados en ratas hipertensas DOCA-sal (modelo de hipertensión por administración de deoxicorticosterona y sal).¹¹² En este último trabajo, el efecto antifibrótico de la LC fue acompañado de una disminución en los niveles de las citoquinas profibróticas TGF- β 1 y CTGF. Otro estudio llevado a cabo por Chao HH y col.,¹³¹ muestra cómo el tratamiento con LC atenúa la proliferación de fibroblastos en el corazón de ratas tratadas con Ang II.

L-carnitina y PPARs

Aunque los mecanismos implicados en la acción antioxidante, antiinflamatoria y antifibrótica de la LC son desconocidos, en los últimos años se está apuntando a la familia de factores de transcripción PPAR, como posibles intermediarios de la acción beneficiosa de la LC.

Numerosos estudios han mostrado la participación de PPAR α y PPAR γ en la homeostasis de la LC.^{89,132-134} Por un lado, la expresión génica del transportador de LC, OCTN2, parece estar estimulada por la activación de PPAR α en el intestino de ratas y ratones.^{89,132,135} PPAR γ ha mostrado tener el mismo efecto modulador sobre la expresión génica de OCTN2 en el colon de humanos y de ratones.¹³⁶ Por otro lado, PPAR α se ha relacionado con la estimulación de la expresión génica de la enzima γ -butirobetaína (enzima limitante en la biosíntesis de la LC) en ratón.^{135,137,138}

Además de lo anteriormente expuesto, existen trabajos que muestran que tanto PPAR α como PPAR γ estimulan la expresión génica de la enzima CPT I; de este modo, regulan el paso de ácidos grasos de cadena larga al interior de la mitocondria, en lo que constituye como ya hemos visto la principal función fisiológica de la LC.^{139,140}

En los últimos años están cobrando importancia las teorías que apuntan hacia la familia PPARs como mediadores en los efectos antioxidantes, antiapoptóticos y cardioprotectores observados en el tratamiento con LC.¹⁴¹⁻¹⁴⁴ Aunque los mecanismos moleculares implicados en la relación de la LC con miembros de la familia PPARs no se conocen con exactitud, parecen estar mediados por la prostaciclina (PGI₂). Así Chen H.H. y col. mostraron el efecto antiapoptótico de la LC, en células tubulares renales, a través de un aumento en la producción de la PGI₂, que fue acompañado por un aumento de la actividad PPAR α .¹⁴¹

Con todos estos antecedentes, y puesto que cada vez son más las investigaciones que proponen a la LC como sustancia antioxidante y antiinflamatoria, en este trabajo pretendemos estudiar los efectos de la suplementación con LC sobre la nefropatía hipertensiva, en un modelo experimental de hipertensión inducida por la administración crónica de L-NAME, planteando como hipótesis la existencia de una relación entre los efectos de la LC y los miembros de la familia PPARs.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipertensión arterial (HTA) produce, entre otros, un daño estructural y funcional del riñón. Este daño, conocido como nefropatía hipertensiva, conlleva cambios tanto en la morfología como en la función renal normal. El conocimiento de la fisiopatología subyacente tras este proceso ayudaría a prevenir y tratar aquellos eventos renales producidos como consecuencia de la elevación sostenida de la presión arterial. De ahí la importancia de encontrar fármacos que, además de controlar las cifras de presión arterial, actúen previniendo y/o paliando las alteraciones orgánicas asociadas a la HTA. La L-carnitina (LC) es una amina cuaternaria necesaria en el transporte de ácidos grasos hacia el interior de la mitocondria, lugar donde se produce su β -oxidación; por ello, un déficit de este compuesto alteraría el metabolismo de lípidos y disminuiría la producción de energía en las células. El riñón es un órgano esencial para el mantenimiento de los niveles de LC en el organismo, ya que, además de ser un lugar de biosíntesis de carnitina, en condiciones normales se reabsorbe un 95% de la LC que es filtrada en el glomérulo; por ello, la presencia de daño renal puede provocar una deficiencia de este compuesto. Aunque la LC se administra hoy día como suplemento energético, existen otros mecanismos de acción desconocidos que justificarían su uso en ciertas patologías cardiovasculares y renales. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la LC mejora el estado oxidativo sistémico, así como el grado de fibrosis, estrés oxidativo e inflamación a nivel cardíaco, en diferentes modelos de ratas hipertensas, además de ejercer un efecto hipotensor.

Por todo lo mencionado anteriormente, nuestra hipótesis de trabajo es que la LC podría actuar atenuando los procesos fisiopatológicos implicados en el daño renal asociado a la HTA. Para comprobar esta hipótesis, hemos diseñado un estudio que nos permite evaluar los efectos beneficiosos de LC en la nefropatía hipertensiva desde un punto de vista funcional, celular y molecular, analizando mecanismos de acción y posibles vías de señalización intracelular implicadas.

Los objetivos a abordar en esta Tesis son los siguientes:

1. Estudios en el riñón de ratas con HTA provocada por el tratamiento con N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). En estos animales analizamos los efectos del tratamiento crónico con LC. En concreto:

- I. Evaluamos los efectos que ejerce la LC sobre el estrés oxidativo asociado a la actividad NADPH oxidasa y sobre el sistema de defensa antioxidante. Además, estudiamos la participación del factor de transcripción Nrf-2 en estos efectos.
 - II. Estudiamos la capacidad antiinflamatoria de la LC, y la participación del factor de transcripción NF- κ B en este efecto.
 - III. Analizamos el efecto antifibrótico de LC, determinando la síntesis de matriz extracelular y la expresión de marcadores profibróticos.
 - IV. Evaluamos la implicación del sistema renina angiotensina en las acciones de la LC.
2. Estudios *in vitro* en la línea celular NRK-52E, con el fin de determinar la participación de PPAR γ en el posible efecto antifibrótico de la LC en el riñón de ratas hipertensas tratadas con este compuesto.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño experimental y determinaciones generales

1.1. Animales y tratamientos

Para la realización de este trabajo hemos utilizado ratas macho de entre 8 y 10 semanas de edad, pertenecientes a la cepa Wistar y procedentes del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla. Todos los procedimientos llevados a cabo 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 de 10 animales cada uno: i) ratas control (grupo Wistar), ii) ratas tratadas con 400 mg de L-carnitina/kg de peso/día (grupo WLC), iii) ratas tratadas con 25 mg de L-NAME² mg/kg de peso/día (grupo L-NAME) y iv) ratas tratadas simultáneamente con L-NAME y LC (grupo LNLC). Los tratamientos fueron administrados en el agua de bebida, siendo la concentración media de LC y L-NAME 4 y 0,25 g/L, respectivamente³. El tratamiento con LC se mantuvo durante 12 semanas, mientras que el tratamiento con L-NAME comenzó dos semanas más tarde que el de LC, y se mantuvo durante 10 semanas. Durante el periodo experimental, los animales se mantuvieron en condiciones estándar (23 ± 1 °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).

1.2. Determinación de la presión arterial y obtención de orina

Desde el inicio del tratamiento, y hasta el día del sacrificio, se midió semanalmente el peso corporal y los valores de presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) de los animales. Para la medida de la presión arterial, hemos utilizado el método indirecto de oclusión en la cola utilizando un medidor de presión NIPREM 645 (CIBERTEC). En este sistema, las señales recogidas se traducen a través de un sistema de adquisición de datos acoplado al medidor de presión y con soporte informático.

¹ Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010. Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero de 2013 (BOE núm. 34 de 8 de febrero). Decreto 80/2011 de 12 de abril por el que se regula la formación en bienestar animal (BOJA núm. 82 de 28 de abril).

² N ω -nitro-L-arginina metil éster.

³ Ambos tratamientos fueron ajustados semanalmente acorde con el peso y el agua ingerida por los animales. No se observaron diferencias significativas en la ingesta de agua entre los distintos grupos experimentales.

El procedimiento a seguir es el siguiente: los animales se inmovilizan en el interior de cepos cilíndricos, y se les coloca la cola debajo de una lámpara de infrarrojos durante 10-15 minutos, evitando someterlos a otros estímulos externos y controlando que la temperatura local no sea superior a 37 °C; de este modo se consigue la vasodilatación necesaria para que los pulsos cardiacos sean lo más definidos posible. Transcurrido este tiempo, se desconecta la fuente de calor, se coloca el manguito presurizador y el transductor de pulsos cardiacos en la cola de los animales. A continuación, se aumenta la presión del manguito colapsando completamente la arteria caudal. En este momento, la señal del pulso queda atenuada completamente. El momento en el que aparece de nuevo el pulso se corresponde con la presión sistólica de la rata. La despresurización continúa aumentando progresivamente la señal del pulso, de manera que la presión diastólica corresponde al momento en el que el pulso se hace de nuevo homogéneo y recobra prácticamente su valor inicial.

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

Para la obtención de orina, los animales se colocan en una jaula de metabolismo durante 24 horas, con libre acceso a comida y (bebida con sus respectivos tratamientos). Tras ese tiempo, se recoge el volumen total de orina, la cual es filtrada, alícuotada y conservada a -20°C. En esta orina se determina el grado de proteinuria, mediante la técnica de Bradford (descrita en el apartado 2.2), y el aclaramiento de creatinina (apartado 1.4).

1.3. Procesado de los tejidos

Tras las 12 semanas de tratamiento, los animales se someten a un ayuno de 12h, tras lo cual son anestesiados con pentobarbital (50 mg/kg i.p.). A continuación, se extraen aproximadamente 5 mL de sangre mediante punción cardiaca directa con agujas de calibre 0,26x25 mm (23G), sangre que se recoge sobre tubos heparinizados para evitar la formación del coágulo. Se centrifuga la sangre a 1500x (g) durante 20 minutos a temperatura ambiente para separar el plasma. Posteriormente, se recoge el plasma y se divide en alícuotas de 0,5-1 mL, las cuales se conservan a -80°C hasta el momento de su análisis.

Una vez extraída la sangre, se procede al sacrificio del animal, se extraen los riñones y se desencapsulan con ayuda de dos pinzas, se lavan en suero fisiológico frío (solución de NaCl al 0,9% p/v a 4°C), se secan brevemente en papel de filtro y se pesan en una balanza de precisión. Uno de los dos riñones se destina a estudios de expresión génica y proteica, y a la determinación de actividades enzimáticas y otros ensayos recogidos en el apartado 2. Para este fin, se disecciona la corteza renal, se congela por inmersión en nitrógeno líquido y se conserva a -80°C. El otro riñón se usa para estudios histológicos e inmunohistoquímicos; en este caso, el órgano se somete a un proceso de inmersión en parafina, que se describe detalladamente en la sección 3.1.

1.4. Determinación de la tasa de filtración glomerular

La tasa de filtración glomerular (TFG) se ha determinado mediante el análisis del aclaramiento renal de creatinina. Para determinar la concentración de creatinina en orina y plasma, utilizamos el kit comercial de *SPINREACT*, basado en el método de Jaffe.¹⁴⁵ Este método consiste en la reacción de la creatinina con picrato de sodio. Dicha reacción produce un compuesto de color rojo, cuya intensidad es proporcional a la concentración de creatinina presente en la muestra.¹⁴⁶

Para la determinación del aclaramiento de creatinina utilizamos la siguiente fórmula:

$$\text{Aclaramiento de creatinina} = \frac{Co \times Vo/24h}{Cp}$$

Co= concentración de creatinina en orina

Cp= concentración de orina en plasma

Vo= volumen de orina

Los resultados están expresados en mL/min/ g de riñón.

2. Análisis en homogeneizados de corteza renal y estudios de expresión génica y proteica

2.1. Homogeneización de tejidos

Reactivos

Tampón de Homogeneización de tejidos animales:

Solución Fosfato 50 mM 9900 μ L

Inhibidor de proteasas (*Roche Diagnostics*): IP 100 μ L

Protocolo experimental

Para la determinación de las enzimas antioxidantes, la corteza renal se ha homogeneizado en una proporción de 200 mg de tejido en 1 mL de tampón de homogeneización. Para esto, una vez pesado el tejido sin descongelar, se sumerge inmediatamente en el tampón de homogeneización y se homogeniza utilizando un homogeneizador con émbolo de teflón (Pobel 245432), acoplado a un motor con una velocidad de giro de 2500 r.p.m. Posteriormente, el homogeneizado se centrifuga a 10000 x g durante 15 minutos a 4 °C, para eliminar restos de orgánulos celulares, y el sobrenadante se utiliza para la determinación de las enzimas antioxidantes (glutatión reductasa (GR), glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD)), peroxidación lipídica, cantidad de óxido nítrico, actividad NADPH oxidasa, determinación de anión superóxido, y para los estudios de la expresión proteica por *Western blotting*.

2.2. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas en los homogeneizados de corteza renal se ha determinado siguiendo el método descrito por Bradford,¹⁴⁷ utilizando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* (que contiene ácido fosfórico y metanol). Este método se basa en la reacción de las proteínas con el reactivo, dando un complejo coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas de la muestra. La técnica consiste en incubar, en una microplaca de ELISA 5 μ L de los homogeneizados (diluidos 1/40 con

agua bidestilada)¹, o de los estándares en su caso, con 250 µL del reactivo de *Bio-Rad* (previamente diluido 1:4 con agua bidestilada y filtrado a través de un papel Whatman nº 1) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se lee en el espectrofotómetro a 595nm (UVM340, ASYS). La coloración es estable en un plazo de 50 minutos. Las soluciones estándar se preparan a partir de una solución de gammaglobulina bovina de concentración igual a 1,56 mg/mL. A partir de ésta, se realizan diluciones seriadas, para obtener los siguientes puntos de la curva patrón (en µg/mL): P₁ = 0,975; P₂ = 0,195; P₃ = 0,39; P₄ = 0,78; P₅ = 1,56. Conociendo las concentraciones de los estándares y sus absorbancias, se elabora la correspondiente curva patrón, la cual permite conocer las concentraciones de los homogeneizados de corteza renal a partir de sus absorbancias.

2.3. Determinación de la peroxidación lipídica en corteza renal

Para valorar el estado de peroxidación lipídica en una muestra biológica, el método de diagnóstico más directo es la cuantificación de los hidroperóxidos formados en las etapas iniciales del proceso. Sin embargo, la naturaleza especialmente lábil de estos productos ha hecho que se recurra a métodos indirectos, como el análisis de productos secundarios o finales derivados de su metabolismo o descomposición. Existe una gran variedad de métodos para evaluar la peroxidación lipídica, siendo uno de los más utilizados la cuantificación del malondialdehído (MDA) por medio de su reacción con el ácido tiobarbitúrico (ATB).

El MDA es un producto final de la degradación oxidativa de los lípidos que, en condiciones de bajo pH y temperatura elevada, participa fácilmente en una reacción de adición nucleofílica con el ATB, generando un pigmento rojo fluorescente (compuesto por una molécula de MDA y dos de ATB) que puede ser determinado por espectrofotometría visible o de fluorescencia, siendo su cuantificación muy sencilla. No obstante, a la hora de considerar el MDA como índice de peroxidación lipídica hay que tener en cuenta una serie de inconvenientes, ya que ni todos los lípidos producen MDA cuando sufren peroxidación, ni el MDA se produce exclusivamente como resultado de la peroxidación lipídica.¹⁴⁸ Por tanto, debemos considerar este método únicamente como un indicador de la potencial existencia de daño peroxidativo sobre los lípidos celulares, y no como una medida fiel de la peroxidación lipídica.

¹ Para la determinación de proteinuria (apartado 1.2 de la sección Resultados), el procedimiento es el mismo que el descrito en este apartado, realizándose en este caso una dilución 1/20 de las muestras de orina.

Para la determinación del MDA hemos seguido el método descrito por Jentzsch y col.,¹⁴⁹ en el cual se valora espectrofotométricamente a 535 nm y 572 nm (esta última medida es para eliminar la absorción basal), el aducto de color rojo formado a consecuencia de la reacción del MDA con el ATB.

Reactivos

- 1,1,3,3- tetrametoxipropano (TMP) 50 μ M
- Butilhidroxitolueno (BHT).....0,1% en etanol absoluto
- Ácido ortofosfórico 0,2 M
- Ácido tiobarbitúrico (ATB)..... 0,11 M (en NaOH 0,1M)

Protocolo experimental

En el interior de microtubos eppendorf de 2 mL, se adicionan 0,2 mL de homogeneizado de corteza renal (equivalentes aproximadamente a 4 mg de proteína) junto con 25 μ L de la solución de BHT. A continuación, se añaden 0,2 mL de la solución de ácido ortofosfórico. Se agita durante 10 segundos aproximadamente, se añaden 25 μ L de la solución de ATB y se vuelve a mezclar bien. La mezcla de reacción se incuba durante 45 minutos a 95 °C. Pasado este tiempo, los tubos se enfrían para parar la reacción, y se adicionan 0,5 mL de n-butanol para extraer el aducto de color rosa formado. Se cierran bien los tubos, se agitan vigorosamente y se centrifugan durante 10 minutos a 10000 x g y a 4 °C, para separar las dos fases. Se recogen 250 μ L de la fase orgánica (superior), y se lee el color a 535 nm y 572 nm frente al blanco (constituido por 0,2 mL de H₂O bidestilada tratados de manera análoga a las muestras). A la vez que se procesan las muestras, se prepara una curva estándar a partir del TMP el cual, al igual que el MDA, reacciona con el ATB bajo las mismas condiciones. Así, a partir de la solución madre 50 μ M de TMP¹, se preparan los distintos estándares: 0,5; 1; 2,5; 5; 10 y 25 μ M. Se añaden 0,2 mL de cada uno de los estándares en microtubos eppendorf de 2 mL, y se procesan de forma semejante a las muestras.

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

¹ Estable durante dos semanas a 4 °C

2.4. Determinación de óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un radical libre inorgánico gaseoso que se origina por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) sobre el aminoácido esencial L-arginina (apartado 1.3.1 de la sección Introducción). Una de las formas para calcular la formación de NO es la medida del nitrito (NO_2^-), que es uno de los dos productos primarios, estables y no volátiles del NO. Este ensayo está basado en el método descrito por Griess en 1879,¹⁵⁰ consistente en una reacción química que usa sulfanilamida y N-1-naftiletilenodiamida dihidrocloro (NEDDC) bajo condiciones acídicas (ácido fosfórico). Este sistema detecta NO_2^- en una enorme variedad de fluidos y tejidos biológicos.

Previamente al ensayo, los tejidos se someten a una incubación con nitrato reductasa, para conseguir que los nitratos (NO_3^-) se transformen en nitritos y de esa forma determinar el contenido de NO como la suma de nitritos y nitratos (NOx).

Reactivos

- Reactivo de Griess (ácido acético 286 g/L, ácido sulfanílico 1,55 g/L y naftilamina 0,33 g/L),
- Tampón Tris/HCl (pH = 7,5)..... 1 M
- NADPH 0,02 mM
- Glucosa 6-fosfato (G6P) 5 mM
- Glucosa 6-fosfato deshidrogenada (G6PDH).....10 U/mL
- *Aspergillus* Nitrato Reductasa1 U/mL
- Solución patrón de nitrito sódico 320 μM

Protocolo experimental

Los reactivos se añaden en microtubos eppendorf de 1,5 mL en el siguiente orden: 7 μL de tampón Tris/HCl 1 M (pH=7,5), 10 μL de NADPH 0,02 mM, 23 μL de la mezcla G6P-G6PDH (resultante de mezclar 2200 μL de G6P con 330 μL de G6PDH) y 10 μL de nitrato reductasa. Se mezcla bien. Sobre estos tubos se añaden 50 μL de muestra, blanco (agua bidestilada) o patrón (se elaboran distintas diluciones a partir de la solución patrón de 320 μM : 2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 y 320 μM). Se mezcla y se incuba a temperatura

ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se depositan 75 μL de la correspondiente mezcla reactiva sobre una microplaca de 96 pocillos. Se añaden, además, 75 μL de reactivo de Griess sobre cada pocillo, se mezcla y se deja a temperatura ambiente durante 10 minutos. Pasados esos 10 minutos, se lee la absorbancia a 550 nm mediante un lector de microplacas. Los resultados se expresan en $\mu\text{mol/L}$ de NO.

2.5. Determinación de la actividad NADPH oxidasa y de la cantidad de anión superóxido en corteza renal

Para determinar la actividad de este complejo enzimático, utilizamos una técnica basada en la quimioluminiscencia. El fundamento de la técnica consiste en la capacidad que posee el superóxido (producto de la reacción que cataliza la NADPH oxidasa), de oxidar la lucigenina, en una reacción que produce fotones de luz que son rápidamente medidos en un luminómetro estándar (*BERTHOLD Junior LB 9509*).

Reactivos

- PBS (pH 7)..... 320 mM
- NADPH..... 3 mM
- Lucigenina 5,3 μM
- Difenil-eno-iodonio (DPI) 10 mM
- Oxipurinol (OXI) 10^{-4}M
- Rotenona (ROT) 10^{-4}M

Preparación de las muestras:

Las muestras se diluyen a una concentración de 10 mg/mL con PBS

Protocolo experimental:

Preparación de las muestras:

Las muestras se diluyen a una concentración de 10 mg/mL con PBS (pH=7)

Protocolo experimental:

En un tubo de poliestileno para luminómetro se añaden en un lateral (como se muestra en la figura 10) 10 μL de muestra (100 μg de proteína) y en el lateral opuesto 10 μL de NADPH 3 mM (para una concentración final de 100 μM de NADPH). Por último, añadimos 280 μL de lucigenina 5,3 μM ¹. La reacción se produce a 37°C durante 4 minutos, y transcurrido este tiempo se mide en el luminómetro.

Los resultados están expresados en URL/seg (Unidades relativas de luz/seg).

Con el fin de caracterizar la fuente de anión superóxido tratamos la muestra con diferentes inhibidores de las fuentes de ROS como son, el DPI (inhibidor de flavoproteínas), el oxipurinol (inhibidor de la xantina oxidasa) y la rotenona (inhibidor de la cadena mitocondrial de transporte de electrones). Para ello incubamos la muestra durante 5 minutos a 37 °C con 0,3 μL de DPI 0,1mM, 3 μL de OXI 10^{-4} M ó 3 μL de ROT 10^{-4} M, y tras la incubación se procede a realizar la medida como con el resto de las muestras.

Para la determinación de la cantidad de anión superóxido en las muestras, se procede de la misma manera que para la determinación de la actividad NADPH oxidasa, pero con la salvedad de que no añadimos NADPH (sustrato de la NADPH oxidasa).



Figura 10. Determinación de la actividad NADPH oxidasa. La figura muestra la posición de los distintos reactivos en el tubo de poliestireno antes de iniciar la reacción mediante la adición de la lucigenina

¹ La lucigenina es fotosensible por lo que es recomendable mantenerla en oscuridad.

2.6. Determinación de la actividad glutatión reductasa (GR)

La GR es una flavoenzima dependiente del nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH), que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH); el GSH puede entonces ser usado por la GPx para la reducción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y de peróxidos orgánicos (ROOH), los cuales son elementos tóxicos¹⁵¹ (apartado 1.3.1. de la sección Introducción).

Para la determinación de la actividad de la enzima GR se ha utilizado el kit comercial de los laboratorios *Cayman Chemical Company*, que sigue el método descrito por Calberg y Mannervik.¹⁵² Este método consiste en determinar, espectrofotométricamente, la disminución de absorbancia a 340 nm debida a la oxidación del NADPH por acción de la enzima, siguiendo la siguiente reacción:



Reactivos

- Reactivo 1 (tampón fosfato):

KH₂PO₄ (pH = 7,5)..... 50 mM

EDTA 1 mM

- Reactivo GSSG:

GSSG 9,5 mM

- Reactivo NADPH:

NADPH..... 0,17 mM

- Reactivo Glutatión Reductasa (GR) (control)

Protocolo experimental

En primer lugar se realiza un blanco (120 µL de Reactivo 1 y 20 µL de GSSG) y un control positivo (100 µL de Reactivo 1, 20 µL de GSSG y 20 µL de Reactivo GR). Para las muestras, añadimos 100 µL de Reactivo 1, 20 µL de GSSG y 20 µL de muestra (equivalentes aproximadamente a 50µg de proteína). Todas las determinaciones se hacen por triplicado. Para obtener resultados reproducibles, la cantidad de GR presente

en las muestras debería provocar un descenso en la absorbancia entre 0,008 y 0,1 unidades/min.

Se inicia la reacción añadiendo 50 μL de NADPH en todos los pocillos. Se agita la placa durante unos segundos. Por último, se lee la absorbancia cada minuto a 340 nm (registrando un total de 5 medidas).

Para el cálculo de la actividad de la enzima GR:

Se calcula el cambio de absorbancia por minuto; para ello, se seleccionan dos puntos de la porción lineal de la curva y se determina el cambio de absorbancia durante el tiempo usando la siguiente ecuación:

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

ΔA_{340} = diferencia de absorbancias a 340nm

Se determina el cambio de absorbancia por minuto para el blanco, y se resta al valor obtenido para las muestras. Se usa la siguiente fórmula para calcular la actividad GR (el valor 0,00373 μM^{-1} corresponde a al coeficiente de extinción del NADPH):

$$\text{Actividad GR} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{0,00373 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0,19 \text{ ml}}{0,02 \text{ ml}} \times \text{factor de dilución inicial de la muestra} = \text{U/mL}$$

ΔA_{340} = diferencia de absorbancias a 340nm; U/mL= unidades por mililitro

Por último, para obtener las U/g de proteína, dividimos el resultado de la fórmula anterior por el valor de la concentración proteica obtenida mediante la técnica de Bradford descrita en el apartado 2.2.

2.7. Determinación de la actividad glutatión peroxidasa (GPx)

Para la determinación de la actividad GPx hemos utilizado un kit comercial de los laboratorios *Randox*, usando el método descrito por Paglia y Valentine.¹⁵³ Este método se basa en la capacidad de esta enzima para catalizar la oxidación de glutatión (GSH) por cumeno hidroperóxido. En presencia de glutatión reductasa (GR) y de NADPH, el glutatión oxidado (GSSG) vuelve a su forma reducida a expensas de la oxidación del

NAPDH; la desaparición de éste se valora midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm, al igual que en el apartado anterior.



Reactivos

- Reactivo 1a (líoilizado):

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

- Solución tampón fosfato (Reactivo 1b):

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

- Solución cumeno hidroperóxido (Reactivo 2):

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

- Reactivo diluyente

Protocolo experimental

Se reconstituye el vial del reactivo líoilizado con 10 mL de tampón fosfato¹. A continuación, se diluyen 10 µL de la solución de cumeno hidroperóxido con 10 mL de agua bidestilada (estable hasta la fecha de caducidad indicada en el frasco comercial). Por último, se reconstituye el reactivo diluyente con 200 mL de agua bidestilada (estable durante 30 días a 2-8 °C). Una vez preparado los reactivos se procede al ensayo de la siguiente forma:

Para realizar el ensayo añadimos 20 µL de muestra, que contenga aproximadamente 100 µg de proteína, 1000 µL de Reactivo 1 y 40 µL de solución de cumeno hidroperóxido, y se agita. Para la preparación del blanco procesamos de manera análoga pero sustituyendo los 20 µL de muestra por 20 µL de H₂O bidestilada.

¹ Esta mezcla reactiva (Reactivo 1) es estable durante 2 días a 2-8 °C

Inmediatamente medimos la absorbancia inicial a 340 nm, poniendo en marcha el cronómetro de forma simultánea. Después de 1, 2 y 3 minutos repetimos la medida. Tras las medidas debemos restar a las muestras el valor del blanco.

El cálculo de la actividad de la enzima GPx se realiza restando a la absorbancia obtenida en T1 la de T2, y de la misma forma restamos T2 menos T3, para así obtener el decremento en la absorbancia en 1 minuto. Posteriormente, calculamos la media entre los dos valores para cada muestra y determinamos la concentración de Glutatión peroxidasa utilizando la siguiente fórmula:

$$U/L = 8412 \times \Delta A_{340} \text{ nm /min}$$

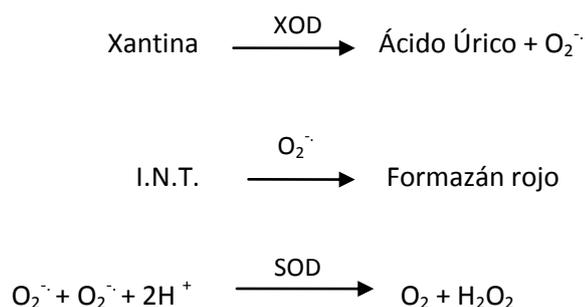
U /L= unidades por litro

ΔA_{340} = gradiente de absorbancia obtenido

Por último, para obtener las U/g de proteína, dividimos el resultado de la fórmula anterior por el valor de la concentración proteica obtenida mediante la técnica de Bradford descrita en el apartado 2.2.

2.8. Determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD)

Para la determinación de la actividad de esta enzima hemos utilizado un kit comercial de los laboratorios *Randox*, el cual se basa en el método descrito por Austin y col.¹⁵⁴ Este método emplea xantina y xantina oxidasa (XOD) para formar radicales superóxido, que reaccionan con el compuesto cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio (I.N.T.) para formar un colorante formazán rojo. La actividad superóxido dismutasa se mide a partir del grado de inhibición de esta reacción, teniendo en cuenta que una unidad de SOD es la que causa un 50% de inhibición en la reducción de I.N.T. bajo las condiciones del ensayo.



Reactivos

- Solución diluyente *Randsod*:

KH₂PO₄/KOH (pH = 7)..... 10 mM

- Sustrato mixto:

Xantina 0,05 mM

I.N.T..... 0,025 mM

- Solución tampón:

CAPS (ácido *N*-cyclohexyl-3-aminopropanesulfónico)

(pH = 10,2) 40 mM

EDTA (ácido etilendiamina tetra acético)..... 0,94 mM

- Solución Xantina oxidasa:

Xantina Oxidasa80 U/L

- Solución patrón:

Patrón.....3,88 U/mL

Protocolo experimental

La concentración de los patrones (P) empleados en la curva patrón han sido (U/mL): 0,162 (P₁); 0,485 (P₂); 0,97 (P₃); 1,94 (P₄) y 3,88 (P₅).

Sobre una cubeta *semimicro*, se añaden 0,05 mL de solución patrón o de la muestra (aproximadamente 200 µg de proteína por reacción), según corresponda, y 1,7 mL de sustrato mixto, y se mezcla bien. Se añaden 0,25 mL de xantina oxidasa, se mezcla de nuevo y se leen las absorbancias a 505 nm. Las medidas se realizan a los 30 segundos (A₁), y de nuevo 3 minutos después (A₂).

Para medir el grado de inhibición de la formación del formazán rojo, se realiza una medida de referencia, que se procesará de la misma forma descrita pero sin añadir la muestra (se sustituye por solución diluyente), de modo que esta medida corresponde al 100% de la reacción (reacción sin inhibir).

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

$\Delta A/\text{min}$ de la solución diluyente es el 100% de la reacción (es decir, corresponde al 0% de inhibición). A continuación, se representan los porcentajes de inhibición de cada patrón frente al logaritmo decimal de su concentración (U/mL). Esta curva patrón permite conocer las U/mL de SOD presente en la muestra a partir del grado de inhibición alcanzado. Los resultados se expresan en U/g de proteína. Para obtener las U/g de proteína, dividimos el resultado de la fórmula anterior por el valor de la concentración proteica obtenida mediante la técnica de Bradford descrita en el apartado 2.2.

2.9. Estudio de la expresión génica en corteza renal

Para determinar la expresión de un gen determinado realizamos tres pasos primordiales: extracción de ARNm, retrotranscripción y PCR.

2.9.1. Extracción de ARNm

El método empleado se basa en la diferente solubilidad de las biomoléculas en disolventes orgánicos como el cloroformo. Para ello, seguimos el siguiente protocolo experimental:

Reactivos

- TRIzol®: solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina.
- Cloroformo.
- Isopropanol.
- Etanol absoluto: diluido al 75% con agua bidestilada autoclavada.
- Agua con DEPC: solución de DEPC al 0,1% (v/v) preparado en agua bidestilada. La solución se agita durante 12 horas y, posteriormente, se autoclava.
- Solución de Tris-Borato-EDTA (TBE 10X):

Tris 44,5 mM

Ácido bórico 44,5 mM

EDTA·Na₂/NaOH (pH = 8)..... 1 mM

- Tampón mixto (10X):

Azul de bromofenol 3,6 mM

Tris/HCl (pH = 8) 50 mM

Glicerol 6% (v/v)

Protocolo experimental

Antes de proceder a la extracción del ARN, se limpia todo el material con etanol absoluto, y se cuida que todos los reactivos estén en condiciones estériles y libres de ARNasas. En tubos cónicos de 2 mL de capacidad, se pesan 50-70 mg de corteza renal, y se añade 1 mL de la solución comercial TRIzol®. A continuación, se somete a la acción de un homogeneizador (*Heidolph* DIAx 900) en posición de velocidad máxima durante 15 segundos, y se deja reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo, se añaden 200 µL de cloroformo, se agita vigorosamente con un agitador de tubos tipo *vortex*, y se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realiza una centrifugación en frío (4 °C) a 12000 x g durante 15 minutos, para la separación de las distintas fases. Con ayuda de una pipeta, se recupera la fase acuosa superior que contiene el ARN, y se deposita en el interior de microtubos eppendorf de 1,5 mL de capacidad. A continuación, se añaden 500 µL de isopropanol, se mezcla (invirtiendo varias veces los tubos) y se deja incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se centrifuga de nuevo (4 °C) a 12000 x g durante 10 minutos, para obtener el precipitado de ARN. Se elimina el sobrenadante con ayuda de una pipeta, y se lava el precipitado con 1 mL de etanol al 75%, agitando en *vortex* durante 20 segundos. El precipitado de ARN se recupera centrifugando a 8000 x g durante 5 minutos a 4 °C. Tras la eliminación del sobrenadante, y para conseguir el secado completo del precipitado, se tapan los microtubos con *parafilm*®, se hacen varias perforaciones pequeñas y se deja bajo el calor de un flexo durante 15-20 minutos¹. Una vez seco el precipitado, se añaden 50 µL de agua DEPC y se deja 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspende haciendo pasar 10 veces a través de una punta de pipeta de 100 µL de capacidad (con filtro). Para medir la concentración del ARN obtenido, colocamos 1 µL de ARN en el espectrofotómetro (*NANODROP 2000, Thermo scientific*), que medirá la absorbancia a 260 nm (A_{260}) para cuantificar el ARN y a 280 nm (A_{280}) para determinar

¹ No se debe utilizar para el secado centrifugación y vacío, y tampoco se debe dejar secar completamente (ya que esto dificultaría la posterior resuspensión del precipitado).

la contaminación por proteínas mediante la relación A_{260}/A_{280} ¹. Por último, hay que comprobar la integridad del ARN, para asegurarnos de que no ha sufrido degradación durante su extracción. Para ello, se realiza una electroforesis utilizando un gel de agarosa al 2%. En un microtubo eppendorf de 600 μL se mezcla 1 μL del tampón mixto con un volumen de ARN equivalente a 1 μg y agua-DEPC hasta completar un volumen de 10 μL . La mezcla se homogeniza y se carga en uno de los pocillos del gel de agarosa. La electroforesis se realiza en una cubeta con solución TBE, a un voltaje constante de 190 voltios durante 25-30 minutos. Transcurrida la electroforesis, el gel se observa bajo iluminación ultravioleta, debiendo observarse dos bandas correspondientes a los ARN ribosómicos, 18S y 28S.

2.9.2. Retrotranscripción (RT)

El proceso de retrotranscripción consiste en la síntesis de ADNc a partir de ARN gracias a la reacción catalizada por la enzima retrotranscriptasa inversa.

Reactivos

- ARN: 4 μg de ARN total para cada reacción de retrotranscripción.
- Agua-DEPC.
- Kit suministrado por *Applied Biosystems (High-Capacity cDNA Archive kit)*

Reactivos Concentración final:

Tampón RT 10X	2X
Random primers 10X.....	2X
Desoxinucleotidos-mix 25X.....	2X
Multiscribe RT (50 U/ μL)	5 U/ μL
Agua-DEPC	hasta 50 μL

Protocolo experimental

Con el kit de *Applied Biosystems*, la realización de la retrotranscripción comienza preparando, en microtubos eppendorf, un volumen equivalente a 4 μg de ARN total y agua-DEPC en cantidad suficiente hasta alcanzar los 50 μL . A continuación se

¹ Generalmente, se acepta una relación de $\sim 2,0$ como "ARN puro".

desnaturaliza el ARN calentando durante 10 minutos a 65°C, utilizando un termociclador (Biometra® T Gradient). Transcurrido este tiempo, se colocan los tubos inmediatamente a 4 °C para evitar la renaturalización del ARN. Se aprovecha este tiempo para preparar la mezcla con los reactivos comunes, según las concentraciones indicadas anteriormente. Finalmente, a los 50 µL de cada tubo de reacción se añaden 50 µL de dicha mezcla. Los 100 µL resultantes se llevan al termociclador (previamente programado para operar 10 minutos a 25 °C, seguido de 2 horas a 37 °C).

2.9.3. PCR en tiempo real

La principal característica de la PCR en tiempo real es que el análisis de los productos se produce durante el proceso de amplificación, mediante cuantificación de la fluorescencia. Para ello, se utilizan termocicladores que son capaces de amplificar y detectar la fluorescencia simultáneamente. En este trabajo se ha utilizado el termociclador de tiempo *Light Cycler® 480 Detection System (Roche Diagnostics)*, que contiene un bloque de 96 pocillos con un fluorímetro acoplado. La señal de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de producto de PCR amplificado, puede generarse con colorantes fluorescentes que pueden ser específicos al ADN de doble cadena (ADNdc), como el SYBR® Green I, o bien sondas fluorescentes específicas de secuencia, como las sondas Taqman. En este trabajo se ha utilizado como colorante fluorescente el SYBR® Green I, que es el más utilizado para la PCR en tiempo real. Este colorante se une al ADNdc en el surco menor, y tras la unión la fluorescencia aumenta 100 veces. La principal ventaja es que se adhiere a cualquier ADNdc, no requiriéndose diseño y optimización de sondas; no obstante, esto también supone una desventaja, puesto que además de unirse al producto específico, también hace lo propio con productos inespecíficos y con dímeros de cebadores. Para resolver este problema al final de la amplificación, se realiza una curva de disociación (*melting curve*), que nos permite confirmar si efectivamente hay un solo producto de amplificación.

Reactivos

FastStart SYBR® Green Master	10 µL
Cebadores específicos ¹ (Up y Low) 300 nM.....	0,6 µL (x2)
cDNA ²	1 µL
H2O bidestilada tratada con DEPC	7,8 µL
	Total 20 µL

Protocolo experimental

Una vez preparada la mezcla de reacción, según lo indicado en el apartado de reactivos, se introduce la placa de 96 pocillos en el *Light Cycler® 480 Detection System (Roche Diagnostics)*, programado como se indica en la siguiente tabla:

Activación SYBR® GREEN Master 50 °C	2 min.	
Desnaturalización inicial 95 °C	10 min.	
Desnaturalización 95 °C	15 s	} 40 CICLOS
Hibridación / Elongación 60 °C.....	1 min.	

Una vez realizado el experimento, el análisis de los resultados se realiza con el programa *Light Cycler® 480 sw1.5*. El programa recoge los resultados y los representa gráficamente como curvas de amplificación en las que se relaciona la intensidad de la señal fluorescente con el tiempo, expresado como número de ciclos de la amplificación (figura 11, derecha). Cada determinación se realizó por duplicado, y tras realizar la media de los valores, se obtuvo la Ct de cada muestra, que se define como el ciclo en el que la curva de amplificación se distingue del ruido de fondo y es dependiente de la cantidad inicial de ADNc.

¹ Los *primers* o cebadores utilizados para la amplificación de secuencias específicas de ARNm se muestran en la tabla 3.

² En el caso de la PCR de OCTN2, el cDNA se diluyó previamente 1/10.

Tabla 3. Primers utilizados en los estudios de PCR en tiempo real

	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
GPx	GGAGAATGGCAAGAATGAAGA	CCGCAGGAAGGTAAAGAG
GR	GGAAACTCGCCATAGACTT	CCAACCACCTTCTCTCTTT
SOD	CGTCATTCACCTCGAGCAGAAGG	GTCTGAGACTCAGACCACATA
eNOS	GGGCCAGGGTGATGAGCTCTG	CCCTCCTGGCTCCAGTGTCC
ECA	CAAAGTTCACCTTGCTTCTGG	TACTGTAAATGGTGCTCATGG
AT1	CACCTATGTAAGATCGCTTC	GCACAATCGCCATAATTATCC
NF-κB	CCTAGCTTTCTCTGAACTGCAAA	GGGTCAGAGGCCAATAGAGA
Nfr-2	GCCAGCTGAACTCCTTAGAC	GATTCGTGCACAGCAGCA
IL-6	GAAATACAAAGAAATGATGGATGCT	TTCAAGATGAGTTGGATGGTCT
IL-1β	GAGGCTGACAGACCCCAAAAGAT	GCACGAGGCATTTTTGTTGTTCA
IL-10	AGGCCATTCCATCCGGGGTGA	AGGCAGCCCTCAGCTCTCGG
Col I	TCAGGGGCGAAGGCAACAGT	TTGGGATGGAGGGAGTTTACACGA
Col III	CGTCCTGCAGGTAACAGTGGTTC	TGCTCCAGTTAGCCCTGCAA
TGF-β	GCCCTGGATACCAACTACTGCT	AGGCTCCAATGTAGGGGCAGG
CTGF	TAGCAAGAGCTGGGTGTGTG	TTCACTTGCCACAAGCTGTC
NOX4	TTGCTTTTGTATCTTC	CTTACCTTCGTACAG
NOX2	CCCTTTGGTACAGCCAGTGAAGAT	CAATCCCAGCTCCCACTAACATCA
p22^{phox}	GCTCATCTGTCTGCTGGAGTA	ACGACCTCATCTGTCACTGGA
p67^{phox}	GAAAGCATGAAGGATGCCTGG	ATAGCACCAAGATCACATCTCC
p47^{phox}	GCTCACCGAGTACTTCAACA	GCCTTCTGCAGATACATGGA
p40^{phox}	ACGCCCTGCAGAGCAAGCTG	GCCCTTGTGGAGTCACGCC
PPARα	TTCGGAAACTGCAGACCT	TTAGGAACTCTCGGGT
PPARγ	CTTGCCATATTTATAGCTGTCATTATT	AGCAGGTTGTCTTGATGTCCT
BBOX-1	AGAGTCCCTCTACCCAGCAG	GGCCATTGGGCCAAGTGATA
OCTN2	GAC GAA GGA CGG ACG ACA GGT GC	AGG AGC CCA TCA GCA CAC CCA CG
GAPDH	GCCAAAAGGGTCATCATCTCCGC	GGATGACCTTGCCACAGCCTTG

Para el análisis de los resultados obtenidos hemos empleado el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, normalizándose la expresión de los genes mediante GAPDH (un gen constitutivo) y

tomando como grupo de referencia las ratas Wistar (grupo control en el caso del estudio en tejido renal), o las células incubadas con medio mínimo (grupo control en el caso de los estudios en cultivos celulares - apartado 4), según el caso.

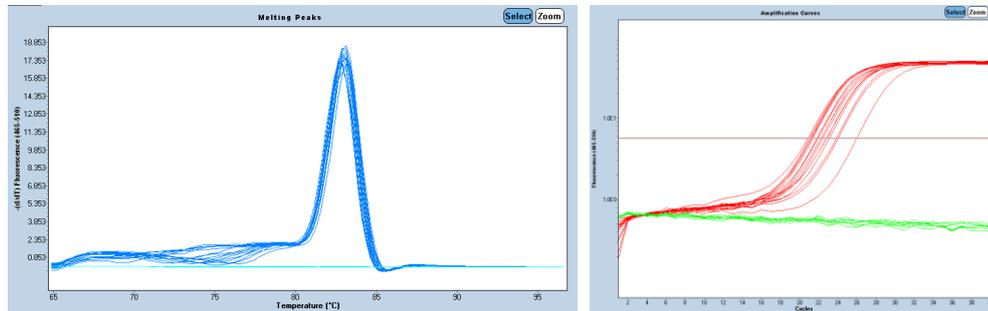


Figura 11. Análisis de los resultados de la PCR a tiempo real. La imagen de la derecha muestra las curvas de amplificación de CTGF y la imagen de la izquierda muestra la curva de disociación para los primers de CTGF.

2.10. Estudio de la expresión proteica en corteza renal

2.10.1 Fundamento del Western blotting

Para la cuantificación relativa de proteínas se ha utilizado la técnica de *Western blotting*, que permite la separación de proteínas según su peso molecular mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE); posteriormente, todas las proteínas presentes en la muestra son inmovilizadas en una membrana de nitrocelulosa, y aquellas que son objeto de estudio son identificadas gracias al empleo de anticuerpos específicos (en nuestro caso, GPx, GR, SOD y NOX4). Para la realización de este experimento se ha utilizado un equipo de *Bio-Rad Laboratories* para *Western blotting*, el cual incluye los componentes *Miniprotean III Cell* y *Mini Trans-Blot Cell* (figura 12).

2.10.2. Preparación de las muestras

Se mezclan volúmenes iguales del homogeneizado de corteza renal (equivalentes a 30 μ g de proteína, y obtenido según el procedimiento indicado en el apartado 2.1) y de tampón de muestra 2X, compuesto por los siguientes reactivos:

Reactivos

Tris / HCl (pH = 6,8).....	0,125 mM
Glicerol.....	25%
SDS.....	2%
Azul de bromofenol	0,01%

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



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

2.10.3. Electroforesis

Dado que las proteínas tienen carga neta a un valor de pH diferente de su punto isoeléctrico, pueden migrar en un campo eléctrico, de modo que su velocidad de migración será dependiente de su densidad de carga (relación entre la carga y la masa de esa proteína). Al estar cargadas negativamente, las proteínas viajan hacia el cátodo (polo positivo) durante la electroforesis. La electroforesis de proteínas se realiza en geles de poliacrilamida. Estos geles se forman por la polimerización del monómero acrilamida, empleándose aminas terciarias como el N, N, N, N'-tetrametilendiamina (TEMED) como catalizadores de esta reacción. Además de la mezcla de Acrilamida/Bisacrilamida y TEMED, se añade SDS (dodecil sulfato de sodio). El SDS es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas, eliminando sus estructuras secundaria y terciaria sin alterar los enlaces disulfuro, y además confiere una carga negativa a cada proteína en proporción a su masa. Sin SDS, las distintas proteínas que tienen masas moleculares similares migran de forma diferente debido

a diferencias en la proporción carga/masa, ya que cada proteína tiene un punto isoeléctrico distinto.

Reactivos

- Gel separador: 8% ,12%, 16% (tabla 4):

Tabla 4. Preparación del gel separador a diferentes concentraciones.

	8%	12%	16%
H ₂ O bidestilada	4,6 mL	3,3 mL	2 mL
Acrilamida/Bisacrilamida (30%)	2,7 mL	4 mL	5,3 mL
Tris 1,5 M (pH = 8,8)	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
SDS (10%)	100 µL	100 µL	100 µL
APS (10%)	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	6 µL	5 µL	5 µL

- Gel concentrador (30%):

H ₂ O.....	5,5 mL
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	1,3 mL
Tris 1 M (pH = 6,8)	1 mL
SDS (10%).....	80 µL
APS (10%).....	80 µL
TEMED	8 µL

- Tampón de electroforesis 10X:

Tris.....	250 mM
Glicina	1,92 mM
SDS.....	1%

Protocolo experimental

Se preparan dos tipos de geles: un gel concentrador (que concentre todas las proteínas en un lugar del gel) y un gel separador (cuya misión es la de separar las proteínas según su peso molecular). De esta forma se asegura que todas las muestras van a presentar el mismo patrón de proteínas, alcanzando proteínas de un mismo

peso molecular la misma altura en diferentes muestras. Se ha utilizado el gel al 12% para realizar la electroforesis para la determinación de SOD, el gel al 16% para la determinación de GPx y el gel al 8% para GR y NOX4. De manera general, con una mayor concentración del gel separador se separan mejor las proteínas de menor peso molecular. Una vez preparado el gel separador, se vierte inmediatamente entre los dos vidrios (suministrados en el Kit de electroforesis y que van a formar un gel de 0,75 mm de grosor) con ayuda de una pipeta. Se deja polimerizar durante aproximadamente 25 minutos, añadiendo H₂O destilada a la superficie del gel (ya que el O₂ del aire puede dificultar la correcta polimerización del mismo). Una vez polimerizado, se elimina el agua con ayuda de un papel tipo Whatman, y se vierte encima el gel concentrador (preparado también extemporáneamente). Recién añadido este gel se coloca un peine para formar los pocillos donde se añadirán después las muestras, y se deja polimerizar durante 10 minutos. Cuando ya esté polimerizado el gel, se separa el peine y se colocan las placas de vidrio en una cubeta de electroforesis. Las muestras, preparadas según lo dispuesto en el apartado 2.10.2, se cargan en los pocillos, añadiendo además en uno de estos pocillos un marcador de pesos moleculares (que permitirá identificar las correspondientes proteínas al final del proceso). Finalmente, se llena la cubeta de electroforesis con tampón de electroforesis 10X, se cierra el circuito y se aplica un voltaje constante de 150 V durante aproximadamente 75 minutos, vigilando que el frente de muestra (identificable gracias al azul de bromofenol presente en el tampón de muestra) no alcance el extremo inferior del gel separador.

2.10.4. Transferencia

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

Reactivos

- Tampón de transferencia:

Tris..... 20 mM

Glicina..... 150 mM

Metanol 20%

- Ponceau S al 0,5%:

Ponceau S0,5 g

Ácido acético glacial1 mL

Agua bidestilada.....99 mL

Protocolo experimental

Una vez terminada la electroforesis, se separa y elimina el gel concentrador, para quedarnos únicamente con el gel separador (que es el que posee todo el bandeo de proteínas separadas por su peso molecular) y proceder al montaje del casete para realizar la transferencia. Para ello, en una bandeja con tampón de transferencia se prepara un sándwich en el interior del casete con los siguientes elementos: una esponja, un papel de filtro Whatman 3mm (de la misma medida que el gel separador), el gel separador, la membrana de nitrocelulosa (también de la misma medida que el gel separador), otro papel de filtro y otra esponja. Se cierra bien el casete, y se coloca dentro de la cubeta de transferencia, junto con un molde de hielo (suministrado con el sistema) y un agitador magnético. Se llena la cubeta de tampón de transferencia y se cierra el circuito para realizar la transferencia, aplicando un voltaje constante de 100 V durante una hora. La transferencia debe realizarse en cámara fría. Una vez terminada la transferencia, se debe de comprobar que ésta se ha realizado adecuadamente. Para ello, se desmonta el sándwich y se coloca la membrana en un recipiente con colorante Ponceau S durante 1 minuto. Eliminando el exceso de colorante con sucesivos lavados con agua, se debe distinguir en cada carril el patrón de bandas correspondientes a las diferentes proteínas que componen las muestras.

2.10.5. Inmunodetección

Se basa en la detección de cada una de las proteínas de interés (GPx, GR, SOD y NOX4, como hemos señalado) en la membrana de nitrocelulosa, mediante el empleo de anticuerpos específicos.

Reactivos

- Solución de lavado (TBST):

Tris / HCl (pH = 7,5) 10 mM
 NaCl 100 mM
 Tween 20 0,1%

- Solución de bloqueo (TBST-M):

Leche desnatada en polvo 4% en TBST

- Anticuerpos para el análisis de Western blotting (tabla 5):

- Kit de quimioluminiscencia: *ECL Advance Western Blotting Detection kit*

Tabla 5. Condiciones de la inmunodetección para cada anticuerpo.

Parámetro	Ac1º	Origen	Ac2º	Tipo anticuerpo
GR	1:5000	Rabbit	1:10000	Goat anti-rabbit Ig-HRP
GPx	1:10000	Rabbit	1:25000	Goat anti-rabbit Ig-HRP
SOD	1:20000	Rabbit	1:30000	Goat anti-rabbit Ig-HRP
NOX4	1:7500	Rabbit	1:15000	Goat anti-rabbit Ig-HRP
GAPDH	1:40000	Mouse	1:50000	Goat anti-mouse Ig-HRP

Protocolo experimental

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

último, se procede al revelado de la membrana utilizando el *ECL Advance Western Blotting Detection kit*, tal y como indica el fabricante. Y realizamos una captura de image mediante el sistema análisis de imágenes quimioluminiscentes (*Fujifilm LAS3000 mini*). Para la cuantificación hemos analizado las bandas mediante densiometría óptica, utilizando el programa informático PCBAS (versión 2.08e). Finalmente, para poder comparar los resultados obtenidos en los diferentes grupos experimentales, se realiza también una inmunodetección, en las mismas membranas, de la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), utilizada como proteína constitutiva al igual que en los experimentos de expresión génica mencionados en el apartado anterior.

3. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos

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

Las técnicas histológicas y la microscopía nos ayudan a comprender la estructura fina tanto del tejido como de las células que lo comprenden. Además, nos permiten correlacionar la estructura de un tejido con su función. Este tipo de análisis son esenciales a nivel clínico para el diagnóstico de enfermedades.

3.1. Procesado de los tejidos

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

3.1.1. Fijación

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

Para llevar a cabo el proceso de fijación, el riñón se divide en dos secciones mediante un corte longitudinal y se sumerge en formol salino (formaldehído al 4% en PBS) durante 24h en una noria rotativa de agitación (GP70, *Selecta*).

Transcurrido este tiempo, se introduce cada sección del riñón dentro de un cassette (figura 13), donde el órgano se mantendrá durante el resto del procesado.

3.1.2. Deshidratación

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

3.1.3. Inclusión en parafina y formación de bloques

Una vez el tejido está deshidratado, se procede a la inclusión de parafina de forma gradual. Previamente, tratamos con etanol-tolueno (1:1), durante 2h y, a continuación, con tolueno puro durante 3h. El tolueno es un disolvente orgánico que permitirá que la parafina caliente entre en el interior de los tejidos de forma homogénea. A continuación, se sumerge el órgano en una mezcla de tolueno-parafina (1:1), a 60°C durante 2h. Por último, el órgano se mantiene toda la noche en parafina pura a 60°C. Al día siguiente se utiliza parafina limpia para formar los bloques con la ayuda de los cassettes y utilizando un molde metálico (figura 13). Los bloques se enfrían a 4°C durante unas horas para solidificar la parafina, y, tras desmontarlos de los cassettes, se mantienen a 4°C hasta el día de su corte para que estén lo más sólido posible.

Una vez los bloques están desmontados, ya están listos para obtener secciones con el micrótopo (MR-2258, *Histo-line laboratories*). El grosor de las secciones va a depender del tipo de técnica al que vayan destinadas esas muestras. En nuestro caso, las muestras destinadas a tinción con Rojo Sirio tienen un grosor de 5µm, grosor que se considera el óptimo para su posterior análisis de imagen mediante densitometría. En el caso de las demás técnicas (inmunohistoquímica, Tricromico de Masson y

Hematoxilina-eosina) utilizamos un grosor de $3\mu\text{m}$. Las tiras de secciones obtenidas con el micrótopo se depositan sobre agua a 37°C en un baño donde, aprovechando la hidrofobicidad de la parafina, el calor las hace extenderse sin llegar a su punto de fusión. Desde ahí son recogidas con la ayuda de un portaobjetos. Normalmente recolectamos tres secciones de tejido por porta objetos. Las muestras son entonces almacenadas en una caja contenedora de portaobjetos y conservadas a -20°C hasta el día de su tinción uso.

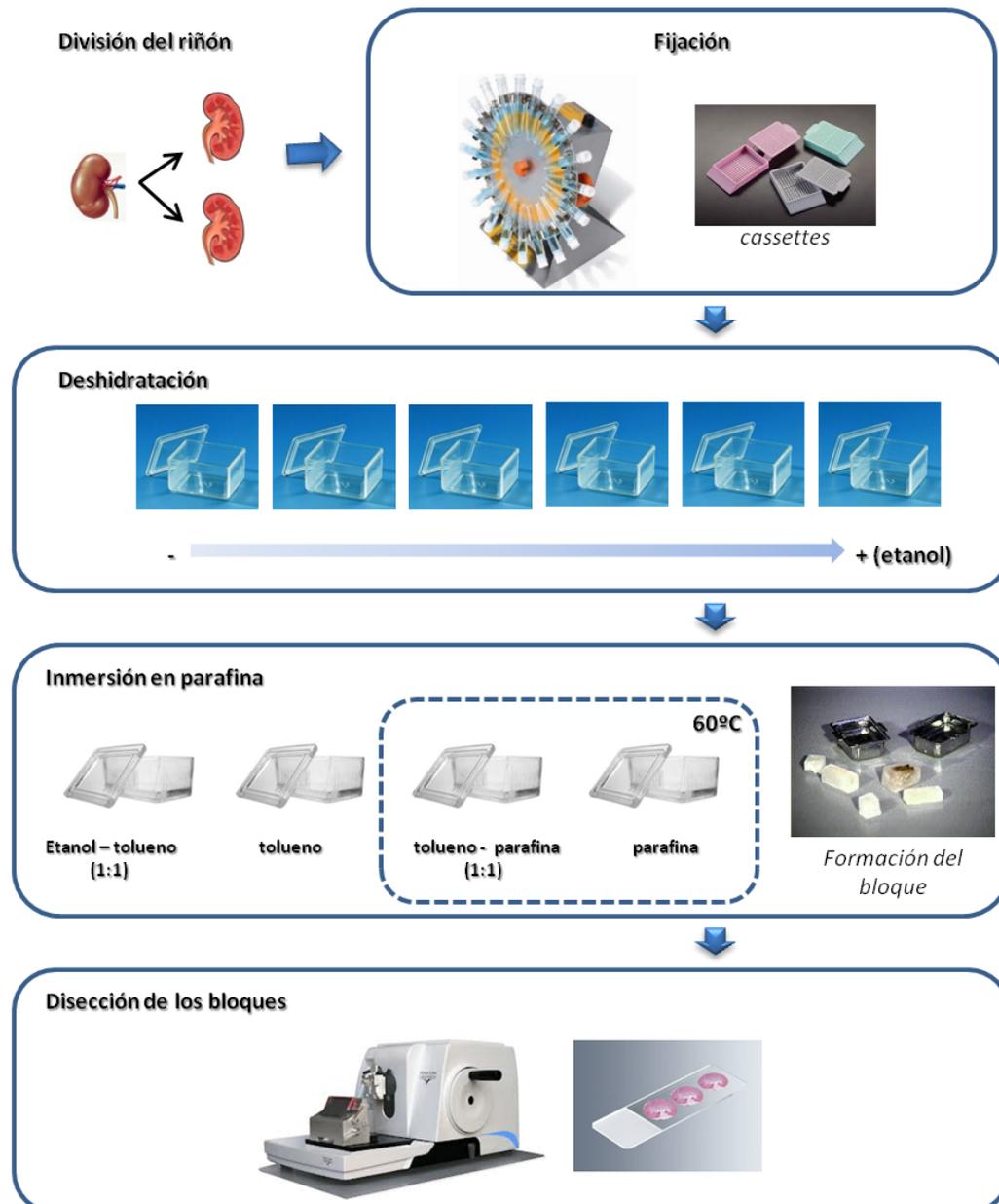


Figura 13. Esquema representativo de la inmersión de tejidos en parafina.

3.1.4 Tinción

Los tejidos son normalmente transparentes una vez que pierden la sangre y mucho más tras el procesado que hemos descrito más arriba, por lo que para verlos correctamente al microscopio son necesarias diferentes técnicas de tinción que posibiliten diferenciar sus constituyentes morfológicos. A continuación, se describen las tinciones que hemos utilizado en este trabajo con el fin de estudiar la microanatomía renal y el grado de fibrosis en nuestros distintos grupos experimentales.

3.1.4.1. Tinción con hematoxilina – eosina

Es la coloración utilizada de forma rutinaria en Histología para ver la mayoría de los tejidos cuando solo se quieren observar sus características utilización de un colorante básico (hematoxilina) y otro ácido (eosina). Por afinidad química elemental la hematoxilina, que es básica, se va a unir a componentes ácidos de la célula que están presentes fundamentalmente en el núcleo, y la eosina, que es ácida, a componentes básicos, los cuales aparecen ocupando la mayor parte del citoplasma. El contraste entre uno y otro colorantes nos va a dar una idea general del estado del órgano.

Protocolo experimental

- Desparafinado estándar: antes de comenzar con la tinción hay que eliminar la parafina que rodea e impregna el tejido y reponer en su lugar el agua extraída durante el procesado. Para ello se somete al tejido a un proceso de desparafinado y rehidratación de los portas como sigue:

- Desparafinar groseramente los portas en estufa a 60°C durante 1h
- Xilol 3 pases de 5 min. cada uno
- Etanol/xilol (1:1) 5min.
- Etanol 100 % 5min.
- Etanol 90 % 5min.
- Etanol 80 % 5min.
- Etanol 70 % 5min.
- Agua corriente..... 5min.

A continuación se procede al proceso de tinción propiamente dicho:

- Hematoxilina de Gill nº3 (diluida en agua 1:3) 30seg.
- Lavar con agua corriente 15min.
- Eosina amarillenta 15min.
- Lavar rápidamente con agua corriente

Deshidratación y montaje: tras realizar la tinción hay que deshidratar y montar la preparación para su posterior conservación. El proceso estándar consiste en someter la preparación a concentraciones crecientes de etanol hasta llegar a etanol absoluto. A continuación, se aclaran las muestras con xilol.

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

Por último, se procede al montaje de la preparación con un cubreobjetos y adhesivo de montaje (Neo-mount) con la ayuda de una pinza plana para microscopia.

Las preparaciones se colocan en posición horizontal sobre una bandeja con un pequeño peso de plomo sobre el cubre para evitar la formación de burbujas.

Resultado: con este tipo de tinción los núcleos celulares aparecen de un color azul oscuro y el citoplasma celular de un tono rosáceo.

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

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

Esta técnica concreta se conoce como tricrómico de Masson-Goldner y ofrece la ventaja de que puede realizarse en material fijado con formol. Para realizar este

ensayo hemos utilizado el kit comercial de tinción Masson-Goldner de la casa comercial Merk. El protocolo experimental es el siguiente:

Protocolo experimental

- Desparafinado estándar (descrito en el apartado 3.1.4.1)
- Hematoxilina de Weigert 5 min.
- Lavado en agua corriente..... 5 min.
- Enjuagar en ácido acético del 1%30 s
- Azofloxina..... 10 min.
- Enjuagar en ácido acético del 1%30 s
- Acido fosfotungstácico-anaranjado G 1 min.
- Enjuagar en ácido acético del 1%30 s
- Verde luz SF 2 min.
- Enjuagar en ácido acético del 1%30 s.

Resultado: Estructuras basófilas (como las cromatina) de color pardo-marrón a negro, las estructuras débilmente acidófilas (citoplasmas o múculo) de rojo a naranja y las fuertemente acidófilas (como las fibras de colágeno) de azul a verde. Los eritrocitos se observan de color naranja

3.1.4.3. Cuantificación de colágeno. Tinción de Rojo Sirio

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

Protocolo experimental

- Desparafinado estándar (descrito en el apartado 3.1.4.1).
- Etanol 70% 5 días
- Solución de rojo sirio saturada con ácido pícrico¹ 30 min.
- Deshidratar en etanol absoluto y montar (descrito en el apartado 3.1.4.1).

Para analizar el área ocupada por las fibras de colágeno así como el área corpuscular, se analizaron aleatoriamente un total de 15 glomérulos y 10 regiones intersticiales de cada una de las preparaciones de los riñones a estudiar. Para ello se capturaron imágenes de las muestras utilizando una videocámara de alta resolución (*Sony, DF.W.X710*) conectada a un microscopio óptico (*Nikon Eclipse 50i*), utilizando un objetivo de 20x y un filtro óptico verde (IF 550). El área ocupada por colágeno fue determinada usando un sistema de análisis computarizado (*Fibrosis HR^R, Master Diagnostic*). Los valores obtenidos (expresados en μm^2) fueron: el área corpuscular, el área de fibrosis glomerular y el área de fibrosis tubulointersticial.

3.2. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es un método que nos permite observar la presencia y localización de moléculas específicas en secciones de tejido. Esta técnica es especialmente útil para seguir la progresión de enfermedades. El marcaje inmunohistoquímico se da gracias a anticuerpos que reconocen la molécula de interés (anticuerpo primario). En un primer paso, los cortes se incuban con el anticuerpo primario, que se une a su antígeno específico allí donde esté presente en la preparación. La interacción antígeno-anticuerpo es luego visualizada mediante la acción de un segundo anticuerpo que se une con alta especificidad al anticuerpo primario (anticuerpo secundario). El anticuerpo secundario está unido covalentemente, en este caso, a la enzima peroxidasa (un enzima que cataliza la formación de peróxido de hidrógeno, altamente oxidante). Finalmente, el producto de reacción de este enzima es

¹ La solución de rojo sirio consiste en una solución acuosa saturada con ácido pícrico y 0,1% de rojo sirio

revelado utilizando como sustrato 3,3'diaminobencidina (DAB) que al oxidarse forma un producto de color marrón insoluble

Para las técnicas inmunohistoquímicas hemos seguido el siguiente protocolo experimental:

Protocolo experimental

Desenmascaramiento antigénico

Este paso es esencial en las muestras de tejido que han sido fijadas con formaldehído. Debido al formol se forman puentes metileno entre las proteínas de la membrana citoplásmica durante la fijación, que, si bien permiten la conservación de los tejidos, enmascaran los sitios antigénicos y los anticuerpos son incapaces de interactuar con su antígeno. Para llevar a cabo este desenmascaramiento antigénico, existen los métodos físicos, utilizando calor, y los métodos enzimáticos. Ambos métodos se encargan de romper los puentes metileno dejando expuesto el sitio antigénico con el fin de permitir que el anticuerpo primario interactúe con el mismo. Se elige un método u otro dependiendo de la proteína diana y de las especificaciones de los fabricantes del anticuerpo.

En nuestro caso hemos utilizado el desenmascaramiento antigénico inducido por calor. Para ello, se introduce en un coplin tampón Tris-EDTA (10mM Tris Base, 1mM EDTA, 0,05% Tween 20, pH=9) y se lleva hasta el punto de ebullición, utilizando un microondas a máxima potencia. Una vez precalentado el tampón, los porta con los tejidos desparafinados y rehidratados (descrito en el apartado 3.1.4.1), se introducen en el coplin y se vuelve a calentar a máxima potencia 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, las muestras se lavan durante 10 minutos en agua corriente. A continuación, se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno en PBS1x.

Permeabilización

Los anticuerpos son glicoproteínas hidrosolubles, por lo que no tienen capacidad para atravesar la bicapa lipídica celular. La permeabilización consiste en el tratamiento de las muestras con un detergente, para así desestabilizar las membranas y hacerlas más permeables a las sustancias hidrosolubles.

En nuestro caso, hemos empleado como agente permeabilizante una solución de IGEPAL al 0,1% en PBS 1x durante 20 minutos (el tiempo de permeabilización puede variar, dependiendo de la localización del antígeno en el interior celular).

Bloqueo de uniones inespecíficas

Este paso es necesario para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, como ya se comentó en el apartado 2.10 para la técnica de *immunoblotting*. Consiste en tratar la muestra con una solución de bloqueo rica en proteínas, las cuales van a adentrarse en la muestra y a formar interacciones débiles con las proteínas celulares; esto convierte la interacción antígeno-anticuerpo en un proceso competitivo, en el que el anticuerpo solo va a interaccionar con su antígeno (por el que siente gran afinidad), desplazando para ello a las proteínas contenidas en la solución de bloqueo.

La solución de bloqueo consiste en un suero al 3% en PBS 1x y 0,1% de IGEPAL. Es recomendable que el suero proceda de la misma especie animal en la que se haya desarrollado el anticuerpo secundario. El proceso se lleva a cabo durante 1h, y se realiza en cámara húmeda¹ para evitar pérdidas por evaporación.

Anticuerpo primario

Los anticuerpos (tanto el primario como el secundario) van disueltos en solución de bloqueo. En el caso del anticuerpo anti-TGF- β_1 , la dilución utilizada fue 1:50, y para anti-NOX4, 1:100. Las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Como control negativo, una de las secciones se incubó únicamente con solución de bloqueo (es decir, en ausencia de anticuerpo primario). Al día siguiente, se lavan las muestras 3 veces con PBS 1x durante 10 minutos cada una, para eliminar el exceso de anticuerpo, y se sigue el protocolo hacia la inactivación de la peroxidasa endógena.

Inactivación de la peroxidasa endógena

En los tejidos animales existen peroxidasas que pueden propiciar la aparición de un falso marcaje al revelar con la DAB y el peróxido de hidrogeno. Por ello, hay que

¹ Consiste en un recipiente cerrado, con un papel de filtro humedecido en el fondo. Dentro de dicho recipiente colocamos los portaobjetos, para evitar la evaporación del pequeño volumen de líquido que cubre las muestras y evitar que éstas queden secas.

realizar una inactivación de estas *peroxidasas endógenas*, mediante el tratamiento de las muestras con su sustrato, peróxido de hidrogeno (H_2O_2).

Con este fin, tratamos las muestras con una solución al 3% de H_2O_2 en PBS 1x durante 20 minutos. Por último, realizamos 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS 1x, para eliminar el exceso de H_2O_2 .

Anticuerpo secundario biotinilado

Como se comentó en la introducción de este apartado, existen distintos sistemas de detección en inmunohistoquímica. En nuestro caso, hemos seleccionado el sistema de detección cromogénico, mediante el cual visualizamos la localización de la proteína de interés gracias a la generación de una sustancia coloreada generada por enzimas peroxidasas. La enzima peroxidasa puede ir directamente conjugada al anticuerpo secundario (como en el caso de los estudios de *Western blotting*), pero a veces este sistema no genera suficiente color para ser observado mediante inmunohistoquímica. Por ello, hemos utilizado el sistema avidina-biotina-peroxidasa, que consiste en la amplificación de la señal gracias a que cada anticuerpo secundario va a acabar unido a varias moléculas de peroxidasa. Para llevar a cabo esta técnica se utilizan unos anticuerpos secundarios conjugados con una molécula de biotina (de ahí que se conozcan como *anticuerpos biotinilados*). La biotina es una pequeña molécula que posee una serie de residuos que le permiten interaccionar con otras moléculas, entre ellas la avidina (una glicoproteína del huevo que posee una extraordinaria afinidad por la biotina, de modo que tiene la capacidad de interaccionar con 4 moléculas de biotina simultáneamente). El método de detección consiste en conjugar con peroxidasas las moléculas de biotina que se unirán a la avidina. Simultáneamente, la avidina interacciona con la biotina del anticuerpo secundario, formándose finalmente un complejo en el cual cada anticuerpo secundario queda unido a 3 peroxidasas (figura 13); como hemos señalado, esto tiene como consecuencia la amplificación de la señal.

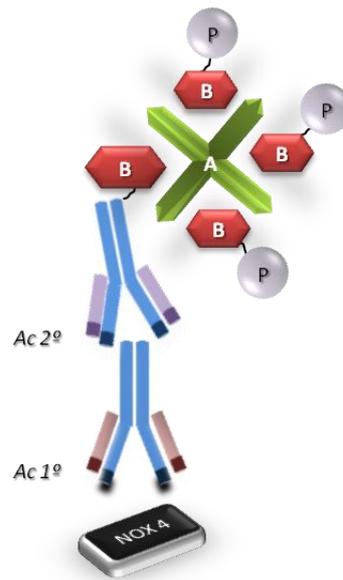


Figura 14. Esquema representativo del complejo avidina-biotina-peroxidasa. P, peroxidasa; B, biotina; A, avidina.

El anticuerpo secundario biotilado (*anti-rabbit*) se diluye en solución de bloqueo (diluciones 1:500 y 1:300 para TGF- β_1 y NOX4, respectivamente), y se incuba en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, realizamos 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS1 x, para eliminar el exceso de anticuerpo secundario.

El siguiente paso es la incubación con el complejo avidina-peroxidasa. Este complejo se diluye 1:300 en PBS1 x, y se incuba durante 1 hora en cámara húmeda. A continuación, realizamos 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS 1x.

Revelado y conservación de las muestras

El revelado consiste en hacer reaccionar a las peroxidases con su sustrato específico (H_2O_2), en presencia del cromógeno DAB. En la primera fase de la reacción, la peroxidasa y el H_2O_2 forman un complejo que interacciona con la DAB y la oxida. La DAB oxidada presenta unos radicales libres que reaccionan entre sí para formar polímeros insolubles de color marrón oscuro, cuya intensidad es proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra.

Para proceder al revelado, preincubamos durante 15 minutos con DAB al 0,05% en Tris 0,05 M. Este paso se realiza en cámara oscura. Transcurrido este tiempo, retiramos la DAB e incubamos con otra solución de DAB al 0,05% en Tris 0,05M, conteniendo además H₂O₂ al 0,05%. Tras la adición de esta solución, esperamos unos segundos hasta que a simple vista visualicemos el color marrón, momento en el que se retira rápidamente la solución arrastrando y lavando con PBS1x. A continuación, se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno en PBS 1x y se contratiñe con hematoxilina de Gill nº3 (apartado 3.1.4.1). Por último, se procede a la deshidratación con concentraciones crecientes de etanol (80%, 90% y 100%), y se procede al montaje estándar (descrito en el apartado 3.1.4.1).

4. Estudios en cultivos celulares

4.1. Línea celular

Para este estudio hemos utilizado células epiteliales de riñón de rata (NRK-52E) (figura 14). Las células, procedentes en origen de la *American Type Culture Collection*, han sido amablemente cedidas por la Dra. Ana Fortuño (Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Universidad de Navarra).

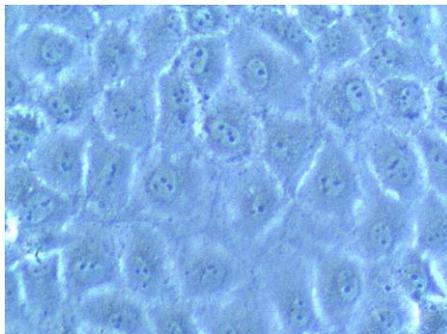


Figura 15. Fotografía de contraste de fase de células NRK-52E. Aumento 100x.

4.2. Mantenimiento del cultivo celular

Todas las manipulaciones de los cultivos se han realizado en el interior de una campana de flujo laminar (modelo Bio IIA, TELSTAR) y en condiciones asépticas para evitar la contaminación, utilizando instrumentos estériles y de un solo uso.

Descongelación

Tras la recepción de las células en nuestro laboratorio, el primer paso es la descongelación del vial a 37°C durante 2 minutos, transfiriéndose después la suspensión celular a un tubo de propileno con 9 mL de medio de cultivo completo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*). Este medio, que contiene glucosa, glutamina y piruvato, se suplementa con un 10% de suero fetal bovino (SFB) y con un 1% de una solución de diferentes antibióticos (penicilina, estreptomina, anfotericina). Los tubos se centrifugan a una velocidad de 150 x g durante 5 minutos, y el precipitado de células se resuspende cuidadosamente con 10 mL de medio completo, y se pasa a un frasco de cultivo celular de 75 cm². El cultivo se mantiene en un incubador a 37°C con una concentración de CO₂ de 0,5% y a una humedad relativa del 95%. Transcurridas 48 horas, el cultivo alcanza el nivel de confluencia máxima, momento en el que se procede a realizar subcultivos del mismo.

Subcultivo

Cuando un cultivo se encuentra al 100% de confluencia, debemos realizar subcultivos del mismo para mantener la viabilidad de las células. Para ello, se desprenden las células de la superficie del frasco mediante un tratamiento enzimático con tripsina. En primer lugar, eliminamos el medio de cultivo y realizamos dos lavados con PBS 1x, para eliminar los restos de SFB (que pueden inhibir la acción de la tripsina). A continuación, añadimos una cantidad de tripsina suficiente para cubrir toda la superficie del frasco (en el caso de los frascos de 75cm² se adicionan 4 mL), e incubamos durante 3 minutos. Transcurrido ese tiempo, observamos al microscopio si todas las células se han separado de la superficie de cultivo, en cuyo caso paramos la reacción de la tripsina con 6 mL de medio completo (el cual contiene SFB suficiente para frenar la reacción). El medio con las células en suspensión se recoge y se procede al conteo de las mismas en una cámara de Neubauer.

Congelación

Para realizar este proceso, debemos contar con frascos totalmente confluentes. Las células se tripsinizan como se indica en el punto anterior y, tras parar la reacción con medio completo, se centrifugan a 500 x g durante 5 minutos a 4°C. Se retira el sobrenadante, y el sedimento se resuspende con medio DMEM suplementado con

20% de SFB y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Finalmente, la suspensión de células se transfiere a un vial y se congela inmediatamente a -80°C . Trascorridas 24 horas, los viales se introducen en un contenedor de nitrógeno líquido para su mantenimiento.

4.3. Estudio del efecto antifibrótico de L-carnitina *in vitro*

Para mostrar el efecto antifibrótico de LC *in vitro*, estimulamos células con TGF- β_1 (una citoquina con un potente efecto profibrótico, como se menciona en el apartado 1.5.2 de la sección Introducción) y tratamos con distintas concentraciones de LC, con el fin de determinar cuál es la concentración que revierte, en su caso, el efecto profibrótico de TGF- β_1 . Para cuantificar este efecto, extraemos el ARN total de cada grupo experimental y realizamos una RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa inversa; ver apartado 2.9), utilizando cebadores para CTGF (factor profibrótico cuya expresión se regula positivamente por TGF- β_1 y que es indicativo del grado de fibrosis, como se menciona en el apartado 1.5.2 de la sección Introducción).

Protocolo experimental

Día 1. Siembra en placa de 12 pocillos

Partimos de un frasco de 75 cm^2 confluyente de células NRK-52E, que en primer lugar se tripsiniza para realizar el recuento celular en cámara de Neubauer. A continuación, se hacen los correspondientes cálculos para sembrar $35000\text{ células/cm}^2$ en cada pocillo (la superficie de cada pocillo es de $3,8\text{ cm}^2$), y se incubamos durante 24 horas con 2mL de medio completo.

Día 2. Deprivación

Tras 24 horas, las células que sembramos en los pocillos habrán alcanzado el 100% de confluencia. El siguiente paso es la deprivación, que consiste en incubar las células durante 24 horas en medio mínimo (medio DMEM con antibióticos, pero sin suero). Con este paso, nos aseguramos de que las células dejan de dividirse y parten del mismo punto del ciclo celular, de cara al siguiente paso del protocolo experimental.

Día 3. Incubación con los distintos tratamientos (TGF- β_1 y LC)

Para llevar a cabo este experimento, hemos diseñado 5 grupos experimentales: i) grupo control (C), incubado con medio mínimo; ii) grupo incubado con 10 ng/mL de TGF- β 1 (grupo TGF), concentración suficiente para observar el efecto profibrótico de este compuesto;¹⁵⁵ y grupos iii), iv) y v), incubados todos ellos con TGF- β 1 (10 ng/mL), más LC a concentraciones 100 μ M (grupo T+LC100), 1 mM (grupo T+LC1) y 10 mM (grupo T+LC10), respectivamente. Todos los tratamientos fueron diluidos en medio mínimo, y cada condición experimental se realizó por duplicado, como se muestra en la figura 16). El tratamiento con LC, en los correspondientes grupos, se preincubó durante 30 minutos antes de añadir el TGF- β 1; tras la adición de TGF- β 1, todos los grupos se mantuvieron con su correspondiente incubación durante 24h.

Día 4. Extracción de ARN total y RT-PCR

El último paso es la extracción del ARN celular total en los distintos grupos experimentales. El método empleado tiene igual fundamento que el empleado en la obtención de ARN total a partir de tejidos (apartado 2.9), adaptado para el caso de cultivos celulares de la siguiente forma: el primer paso consiste en retirar el medio de incubación y tratar cada pocillo con 500 μ L de TRIzol[®] durante 3 minutos¹. Transcurrido este tiempo, se traslada la suspensión resultante a tubos de 1,5 mL libres de ARNasas, y se añaden 100 μ L de cloroformo. Se agita vigorosamente con un agitador de tubos tipo *vortex*, y se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realiza una centrifugación en frío (4 °C) a 12000 x g durante 15 minutos, para permitir la separación de las distintas fases. Con ayuda de una pipeta, se recupera la fase acuosa superior que contiene el ARN, y se deposita en el interior de microtubos eppendorf de 1,5 mL libres de ARNasas. A continuación, se elimina el sobrenadante con ayuda de una pipeta, y se lava el precipitado con 0,5 mL de etanol al 75%, agitando en *vortex* durante 20 segundos. A partir de este punto, utilizamos el kit de extracción de RNA de *RNeasy Mini Kit 50 (QIAGEN)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se eluyen finalmente con H₂O DEPC. El proceso de cuantificación del ARN, así como la retrotranscripción de dicho ARN y el experimento de PCR a tiempo real se realizan de manera análoga a lo descrito en el apartado 2.9.

¹ En este paso se puede interrumpir el protocolo, manteniendo las células en la solución TRIzol[®] a -20°C.

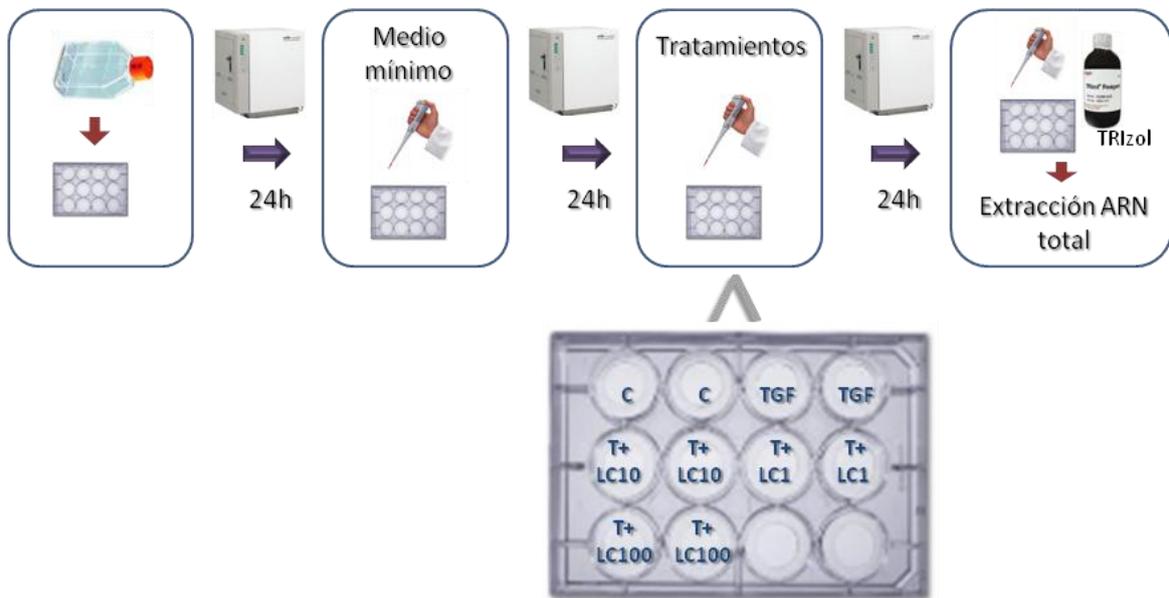


Figura 16. Estudio del efecto antifibrótico de la L-carnitina *in vitro*. C (grupo control, medio mínimo), TGF (10 ng/mL TGF- β_1), T+LC100 (10 ng/mL TGF- β_1 + 100 μ M LC), T+LC1 (10 ng/mL TGF- β_1 + 1 mM LC), T+LC100 (10 ng/mL TGF- β_1 + 10 mM LC).

4.4. Implicación de la vía PPAR γ en el efecto antifibrótico de L-carnitina.

Una vez mostrado el efecto antifibrótico de la LC, es interesante vislumbrar las vías mediante las cuales la LC ejerce su acción. Para ello, hemos diseñado un experimento en el cual determinamos si el efecto antifibrótico de la LC está mediado por PPAR γ , utilizando el inhibidor de PPAR γ , 2-cloro-5-nitrobenzanilida (GW9662). GW9662 es un antagonista sintético, que inhibe la activación del receptor nuclear de PPAR γ gracias a una modificación covalente en un residuo de cisteína necesario para la unión de PPAR γ a su receptor nuclear¹⁵⁶.

El protocolo experimental a seguir consta de los mismos pasos que el descrito en el apartado anterior: siembra en placa de 12 pocillos, deprivación, incubación con los tratamientos y extracción de ARN total. En este caso, también hemos determinado la

expresión génica de CTGF, como indicador del efecto profibrótico generado por TGF- β_1 y de la protección antifibrótica obtenida cuando se preincuba con LC.

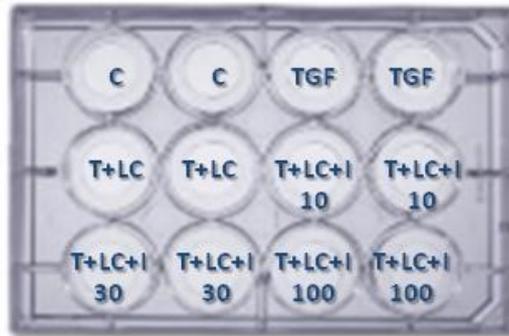


Figura 17. Análisis de la participación de PPAR γ en el efecto antifibrótico de la L-carnitina. C (grupo control, medio mínimo), TGF (10 ng/mL TGF- β_1), T+LC (10 ng/mL TGF- β_1 + 1mM LC), T+LC+I10 (10 ng/mL TGF- β_1 + 1mM LC + 10 μ M GW9662), T+LC+I30 (10 ng/mL TGF- β_1 + 1mM LC + 30 μ M GW9662), T+LC+I100 (10 ng/mL TGF- β_1 + 1mM LC + 100 μ M GW9662).

El diseño experimental consta de 6 condiciones: i) grupo control (C), incubado con medio mínimo; ii) grupo incubado con 10 ng/mL de TGF- β_1 (grupo TGF); iii) grupo incubado con 10 ng/mL de TGF- β_1 más 1mM de LC (grupo T+LC); y grupos iv), v) y vi), incubados todos ellos con TGF- β_1 (10 ng/mL) y LC (1 mM), más GW9662 a concentraciones 10 μ M (grupo T+LC+I10), 30 μ M (grupo T+LC+I30) y 100 μ M (grupo T+LC+I100), respectivamente. Todos los tratamientos fueron diluidos en medio mínimo, y cada condición experimental se realizó por duplicado, como se muestra en la figura 17. La incubación con el inhibidor se llevo a cabo 1 minuto antes de añadir los demás tratamientos, y la incubación con la LC, en los grupos correspondientes, se realizó 30 minutos antes de añadir el TGF- β_1 . Por último, extraemos el ARN total de las células, tal y como se detalla en el apartado anterior, y se determina la expresión génica de CTGF en los distintos grupos experimentales mediante RT-PCR (apartado 2.9).

5. Análisis estadísticos

La comparación entre las diferentes condiciones experimentales se ha realizado utilizando el test ANOVA, y en aquellos casos que han mostrado significación estadística, se ha aplicado el test de la *t* de Student, considerándose diferencias estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Estudios en animales de experimentación

1.1. Características generales

Al final del periodo experimental, no se encontraron diferencias significativas en el peso corporal entre los distintos grupos de animales. Sin embargo, el peso relativo del riñón fue significativamente elevado en ratas tratadas con L-NAME con respecto a las ratas control. El tratamiento con LC previno la hipertrofia renal observada en ratas hipertensas (figura 18).

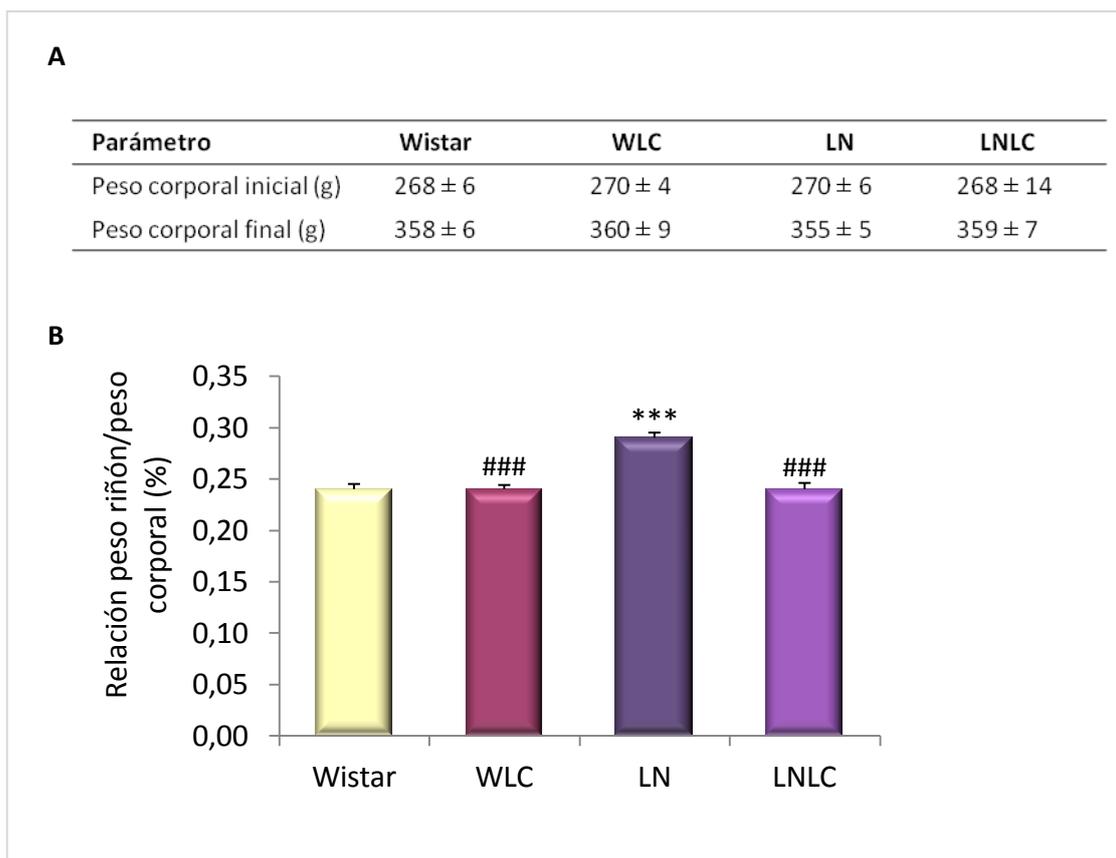


Figura 18. Pesos corporales y relación peso corporal/peso riñón. (A) pesos iniciales y finales de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con N ω -nitro-L-arginina metil éster, L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). (B) Relación peso riñón peso corporal en los diferentes grupos experimentales. Los resultados representan la media \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con Wistar; ### $p < 0,001$ comparado con LN.

La presión arterial diastólica (PAD) y la presión arterial sistólica (PAS) se incrementaron 68 y 70 mm Hg, respectivamente, en ratas tratadas con L-NAME cuando se comparó con los valores recogidos en las ratas normotensas. Por otro lado, la administración simultánea de LC redujo estos valores un promedio de 42 y 44 mm Hg, respectivamente (figura 19). Por tanto, como se aprecia en la figura, el tratamiento con LC produjo una disminución significativa en las cifras de PA de los animales con hipertensión inducida por L-NAME, aunque sin llegar a restablecerse los valores observados en las ratas Wistar normotensas.

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en las cifras de PA entre los grupos Wistar y WLC.

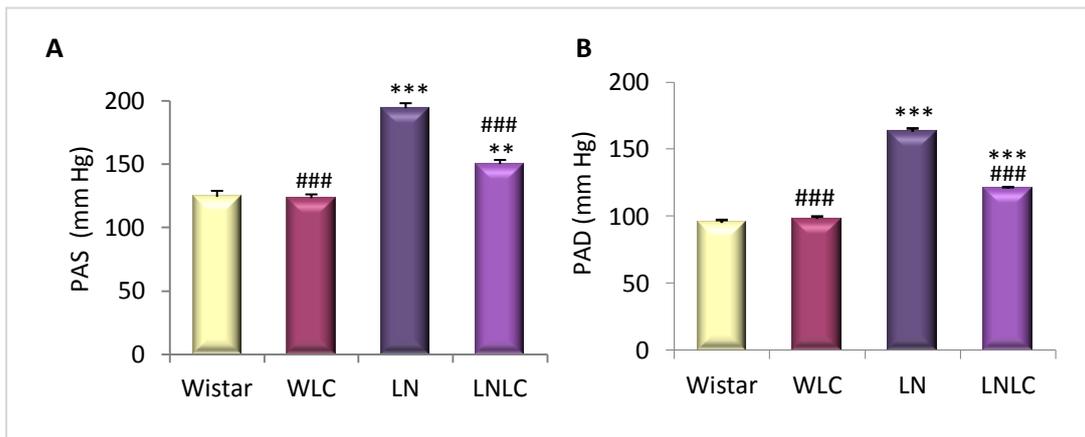


Figura 19. Cifras de presión arterial. (A) presión arterial sistólica (PAS), y (B) presión arterial diastólica (PAD), en ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Los resultados están expresados en milímetros de mercurio (mm Hg), y representan la media de \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con Wistar; ### $p < 0,001$ comparado con LN.

1.2. Función renal

No se observaron diferencias significativas en los valores de diuresis ni en los niveles plasmáticos de creatinina entre los cuatro grupos experimentales de animales (figura 20 A). Sin embargo, cuando se estudió el aclaramiento de creatinina como estimación de la tasa de filtración glomerular (TFG), se observó una reducción en los valores de las ratas hipertensas respecto de las normotensas, lo que sí indica una disminución en la función renal en aquellas (figura 20 B); esta alteración se revierte cuando los animales con hipertensión reciben simultáneamente un tratamiento de LC, alcanzándose valores muy similares a los observados en el grupo control.

Los valores de proteinuria fueron significativamente elevados en ratas hipertensas con respecto al grupo Wistar, y el tratamiento simultáneo con LC provocó una disminución en la excreción de proteínas, de forma que las ratas LNLC mostraron valores similares a los observados en las ratas controles (figura 20 C).

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en los valores de la TFG ni en la proteinuria entre los grupos Wistar y WLC.

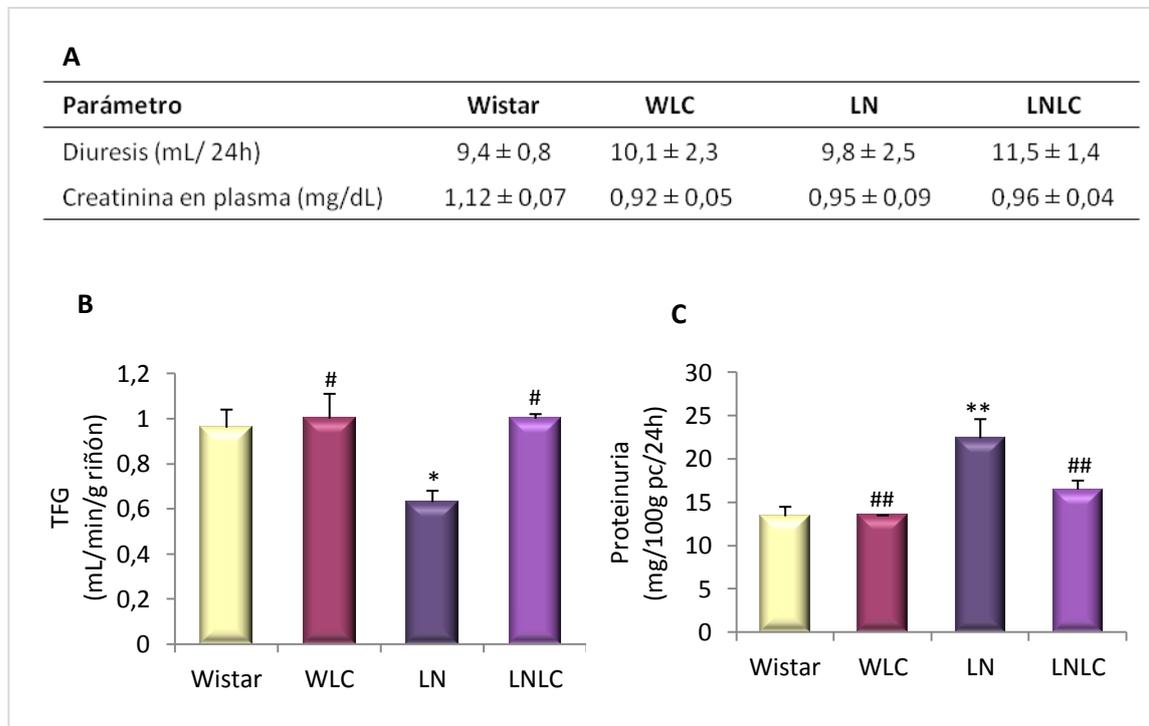


Figura 20. Valoración de la función renal. (A) valores de diuresis y niveles plasmáticos de creatinina, y (B) valores de tasa de filtración glomerular (TFG) y proteinuria, en ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Los resultados representan la media \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ comparado con Wistar; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ comparado con LN. pc = peso corporal.

1.3. Capacidad antioxidante de L-carnitina en el riñón

1.3.1 Grado de peroxidación lipídica en corteza renal

Para evaluar el efecto protector de la LC en el estrés oxidativo asociado a la HA, se determinaron los niveles de MDA como índice de la peroxidación lipídica en la corteza renal de los cuatro grupos experimentales de animales. Los niveles de MDA se incrementaron en un 76% en la corteza renal de ratas hipertensas al compararlos con los de las ratas normotensas. En el grupo LNLC encontramos una disminución significativa de los valores de MDA, obteniéndose niveles similares a los observados en ratas control. No se observaron diferencias significativas entre las ratas control y las ratas WLC (figura 21).

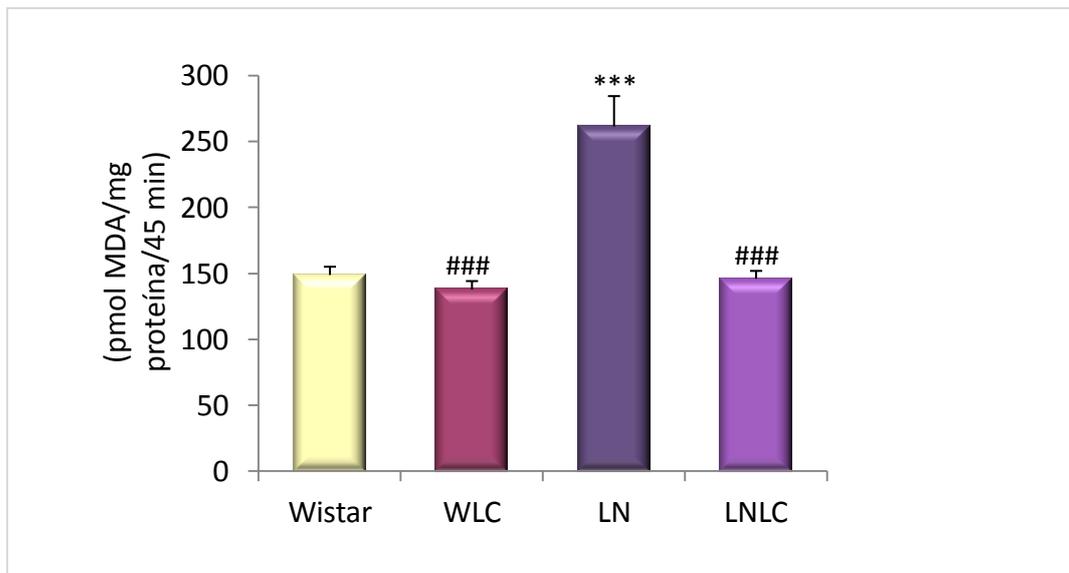


Figura 21. Peroxidación lipídica en homogenados de corteza renal. Resultados de los niveles de MDA en corteza renal de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Los resultados representan la media de \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con Wistar; ### $p < 0,001$ comparado con LN.

1.3.2. Niveles de NO en corteza renal

Los niveles de NO (estimados a partir de la medida de nitratos y nitritos, NO_x) disminuyen en la corteza renal de ratas tratadas con L-NAME al compararlos con los valores observados en ratas normotensas. El tratamiento simultáneo con L-NAME y LC restauró los valores de NO, alcanzando aquellos valores encontrados en ratas controles (figura 22 A). Cuando se estudió la expresión génica de la enzima eNOS, observamos que las ratas hipertensas presentaban un claro descenso con respecto al grupo control. Este descenso fue también revertido tras el tratamiento simultáneo con LC (figura 22 B). Las ratas Wistar tratadas con LC no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control en ambos parámetros.

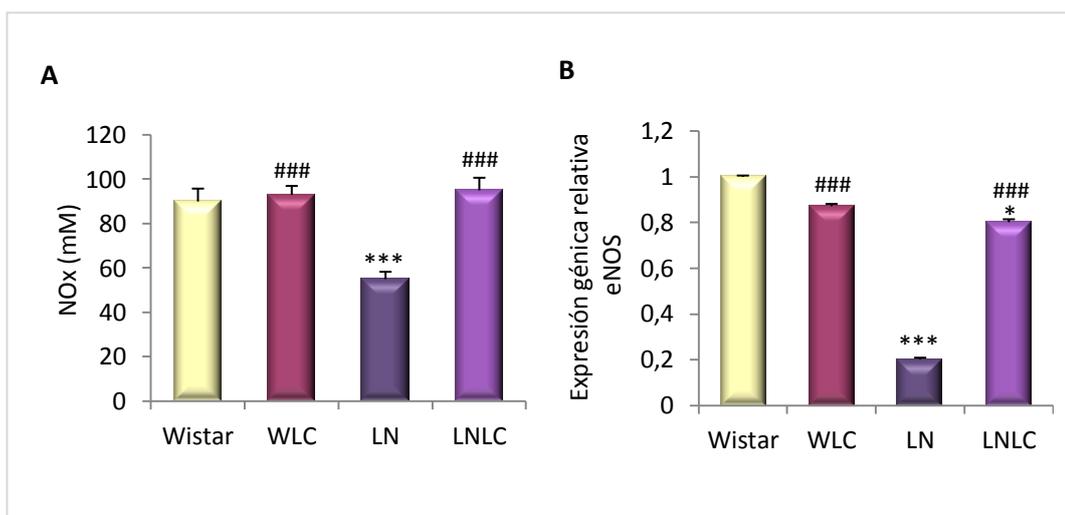


Figura 22. Niveles de nitritos y nitratos (NO_x) y expresión génica de la enzima eNOS. (A) cantidad de NO en homogeneizados de corteza renal de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Los valores están expresados en mM. La gráfica B representa los valores de expresión génica relativa de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en los mismos 4 grupos experimentales de animales. Los cambios cuantitativos en la expresión génica fueron determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo, y calculados según el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los resultados representan la media de \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ comparado con Wistar; ### $p < 0,001$ comparado con LN.

1.3.3 Actividad NADPH oxidasa en corteza renal

La actividad NADPH oxidasa se incrementó en un 44% en la corteza renal de ratas hipertensas con respecto a las ratas control. La administración simultánea de LC a las ratas hipertensas supuso una reducción en la actividad de esta enzima, alcanzando valores muy próximos a los observados en ratas controles (figura 23 A).

Los niveles de anión superóxido se incrementaron aproximadamente 1,4 veces en la corteza renal de ratas tratadas con L-NAME con respecto a las controles. La administración de LC a las ratas hipertensas produjo una reducción en los niveles de anión superóxido hasta alcanzar valores normales (figura 23 B). La administración de LC a ratas normotensas no mostró diferencias significativas con respecto al grupo Wistar, ni en la actividad de la enzima ni en la cantidad de anión superóxido (figura 23 A y B).

La figura 23 C muestra la caracterización de la fuente de superóxido en las muestras de corteza renal. Para realizar esta determinación se han empleado tres inhibidores de distintas fuentes de superóxido: DPI (inhibidor de oxidasas dependientes de flavoproteínas, como la NADPH oxidasa), oxipurinol (inhibidor de la enzima xantina oxidasa) y rotenona (inhibidor de la cadena mitocondrial de transporte de electrones). Los resultados arrojaron unos niveles de inhibición del 114,4 %, 40,2 y 60,6% al tratar con DPI, oxipurinol y rotenona, respectivamente, lo cual pone de manifiesto que la principal fuente de anión superóxido en el riñón de nuestras ratas hipertensas es la enzima NADPH oxidasa.

El estudio de la expresión génica de las diferentes subunidades de la NADPH oxidasa muestra un aumento significativo en la corteza renal de las ratas tratadas con L-NAME con respecto al grupo Wistar (NOX2 = 14,5 veces; NOX4 = 2,4 veces; p22^{phox} = 5 veces; p47^{phox} = 16 veces; p40^{phox} = 6 veces, y p67^{phox} = 5,5 veces). En todos los casos, el tratamiento simultáneo con L-NAME y LC disminuye significativamente los valores de expresión de estos genes (figura 24).

El análisis de la expresión proteica de la subunidad NOX4, mediante la técnica de *Western blotting*, indica que las ratas hipertensas presentan una elevación significativa (1,4 veces) en los niveles de esta isoforma con respecto a las ratas

control (figura 25 A). Este hecho se aprecia también en los estudios inmunohistoquímicos, en los que podemos observar un fuerte aumento en la expresión de la isoforma NOX4 en el grupo L-NAME, este aumento no se observa en las ratas sometidas a un tratamiento simultáneo con LC (figura 25 B). En todos estos estudios no se han observado diferencias significativas entre el grupo control y el grupo WLC.

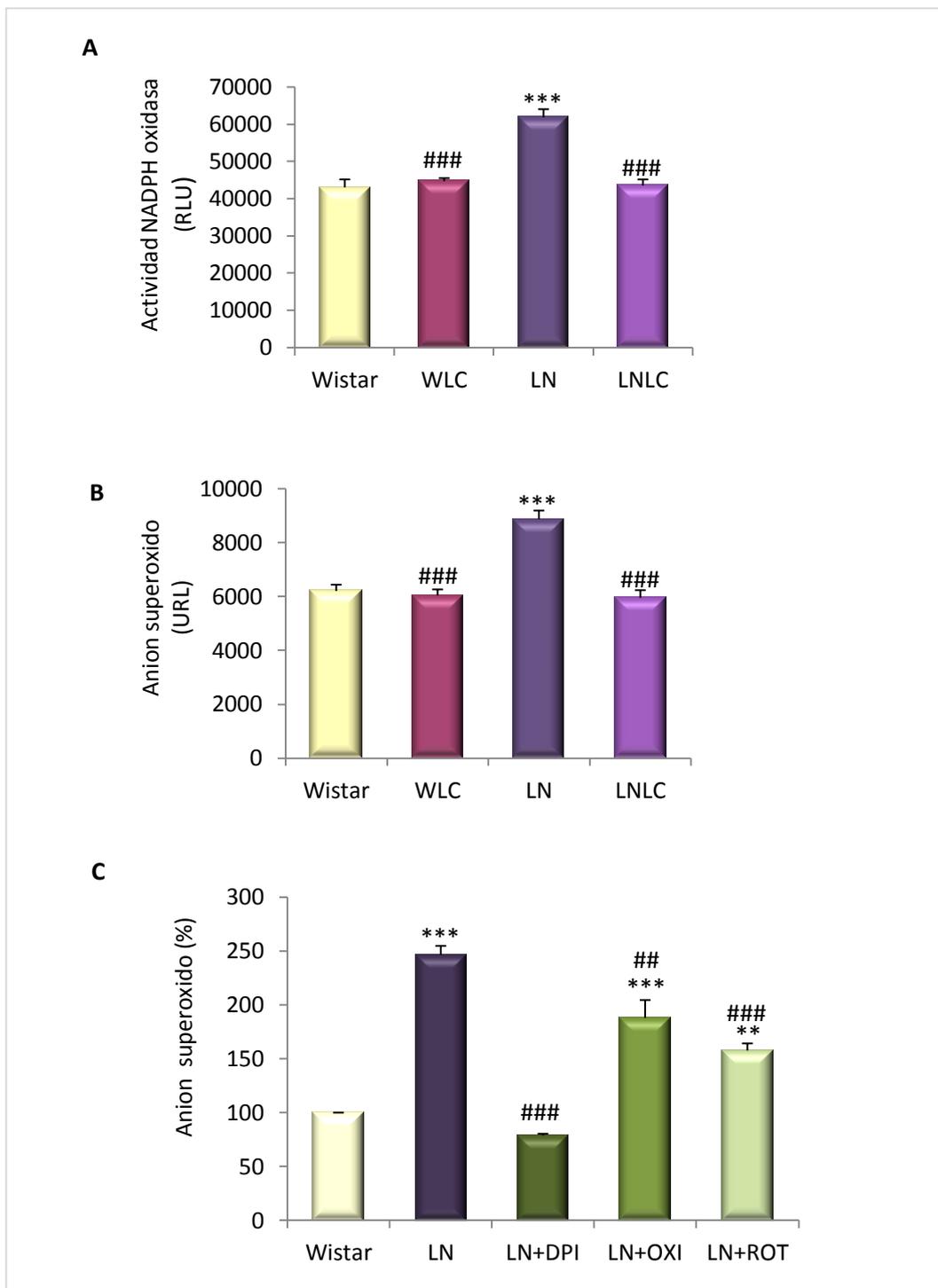


Figura 23. Actividad NADPH oxidasa y niveles de anión superóxido. (A) actividad de la enzima NADPH oxidasa de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). (B) niveles de anión superóxido en homogeneizados de corteza renal en los mismos grupos experimentales. (C) caracterización de la fuente de anión superóxido implicada en la administración de L-NAME. Todos los valores están expresados en URL (Unidades Relativas de Luz) y representan la media de \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con Wistar; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparado con LN. DPI = difenileno yodonio.

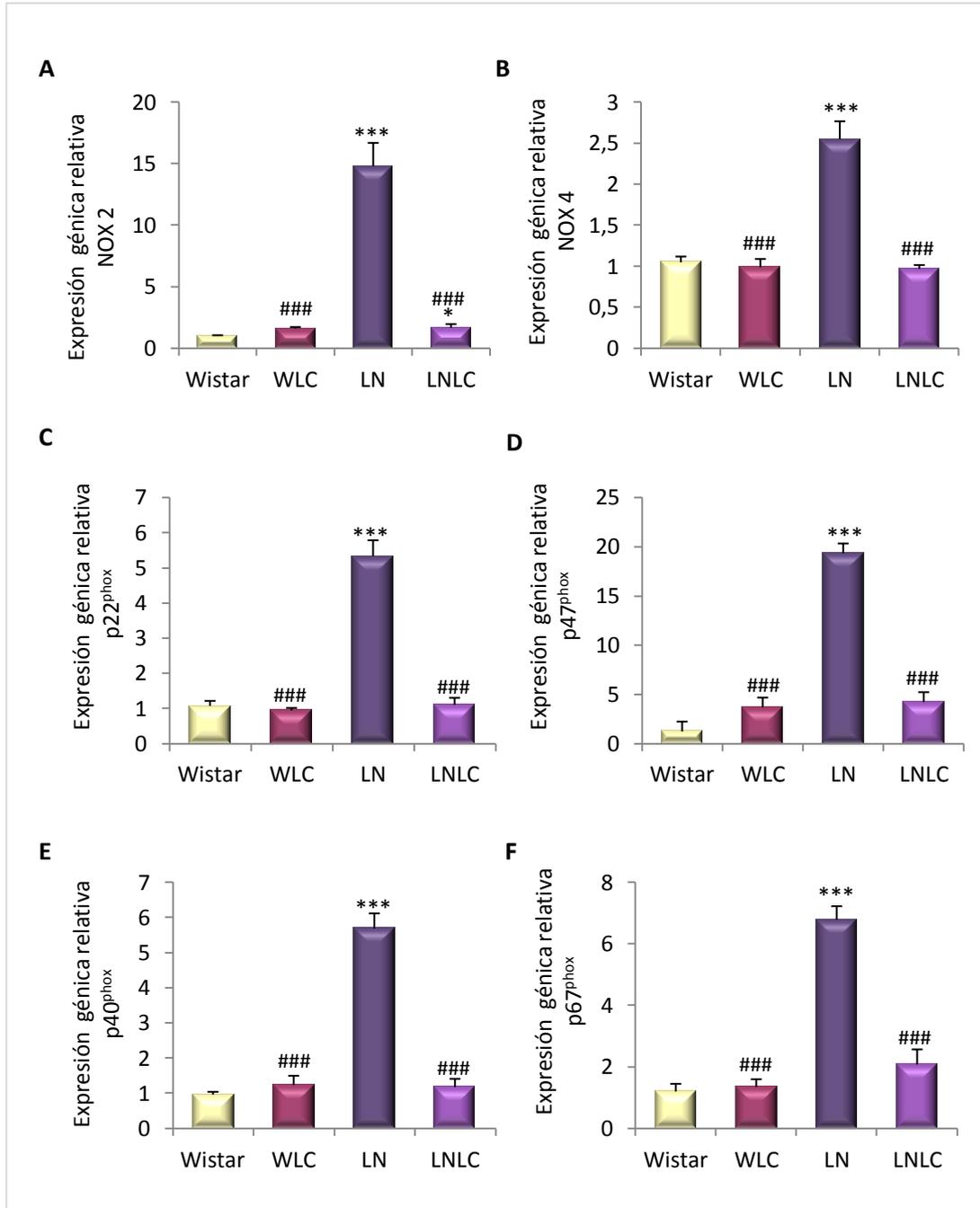


Figura 24. Expresión génica de las subunidades de la NADPH oxidasa. Expresión génica de las distintas subunidades de la NADPH oxidasa en corteza renal de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Los cambios cuantitativos en la expresión génica fueron determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo y calculados según el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los resultados representan la media de \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ comparado con Wistar; ### $p < 0,001$ comparado con LN.

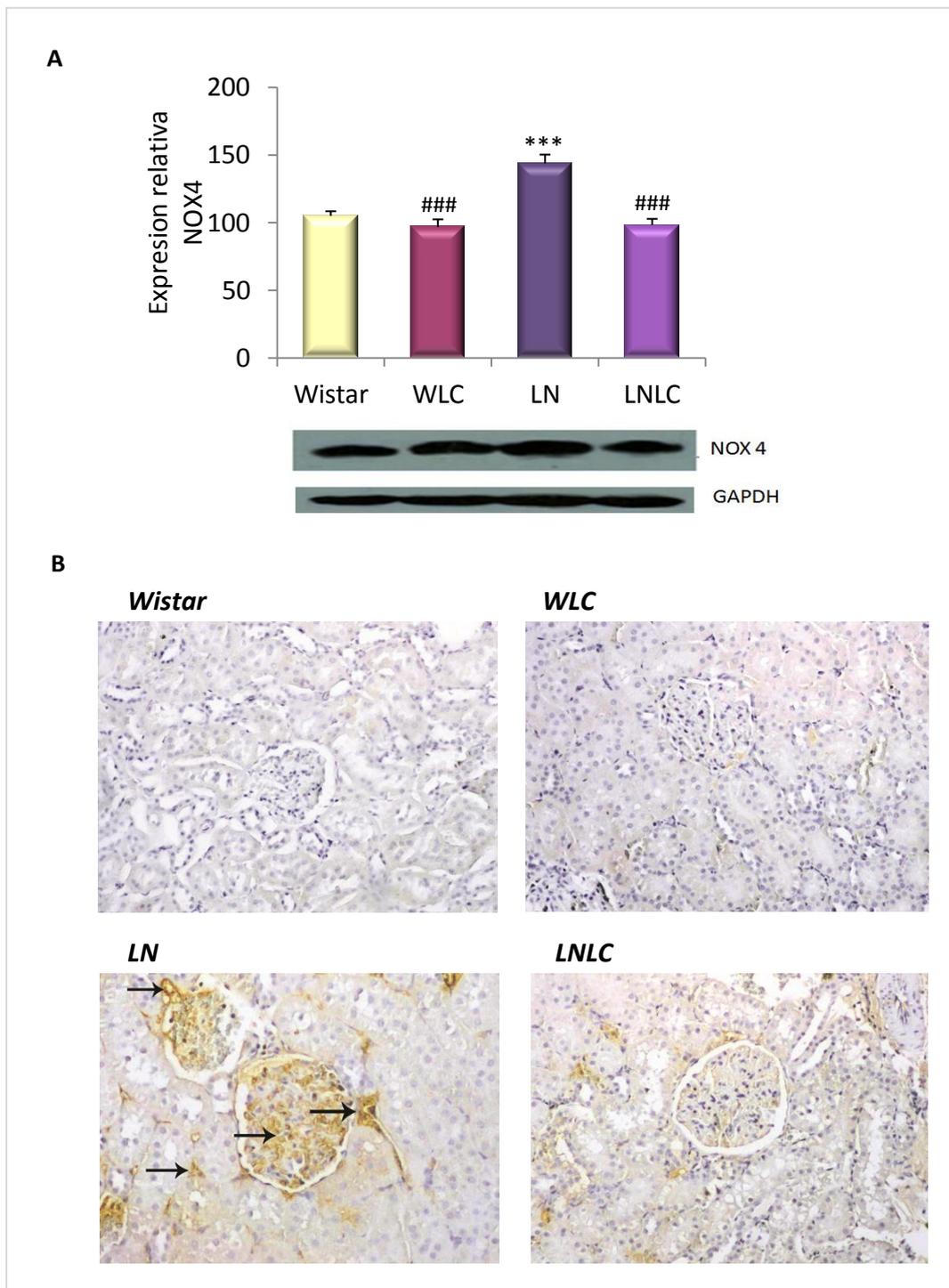


Figura 25. Expresión proteica de la subunidad NOX4 en corteza renal. (A) expresión proteica relativa de NOX4, en corteza renal de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Los valores representan la media de \pm S.E.M. de al menos 3 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con Wistar; ### $p < 0,001$ comparado con LN. (B) micrografías representativas del estudio inmunohistoquímico de la subunidad NOX4 en riñón de nuestros 4 grupos de animales. Las flechas negras señalan los puntos de expresión intensa de NOX4. Aumento original 100x.

1.3.4. Actividades y expresión génica y proteica de las enzimas antioxidantes

Las actividades de las enzimas GPx y SOD disminuyeron un 47,6% y un 34,6%, respectivamente, en la corteza renal de las ratas tratadas con L-NAME. El tratamiento simultáneo con LC revirtió esta alteración hasta alcanzar los valores observados en el grupo control (figura 26 A y C). Por el contrario, la actividad de la enzima GR se incrementó 1,7 veces en ratas hipertensas, lo cual fue también prevenido por el tratamiento con LC (figura 26 B). En cuanto a la expresión proteica de estas enzimas, se observó un descenso significativo de la GPx y SOD en las ratas hipertensas (figura 26 D y F), valores que se revirtieron hasta los niveles alcanzados en las ratas controles tras el tratamiento con LC. La expresión proteica de GR también siguió un patrón similar a su actividad, aumentando en las ratas tratadas con L-NAME y recuperándose los valores normales tras la administración de LC (figura 26 E).

Con el fin de explorar si los cambios a nivel funcional y proteico son debidos a cambios en la expresión génica, realizamos un estudio de PCR a tiempo real de las tres enzimas antioxidantes. Estos resultados muestran el mismo patrón que el encontrado para la actividad enzimática y la expresión proteica. Como podemos observar en la figura 27, tanto la GPx como la SOD presentan niveles de expresión génica significativamente disminuidos en ratas tratadas con L-NAME respecto al grupo control, justo lo contrario que sucede para la expresión de GR. Para todas las enzimas, el tratamiento simultáneo con LC restauró los niveles normales, demostrándose la capacidad reguladora de la LC en la homeostasis del sistema redox del organismo.

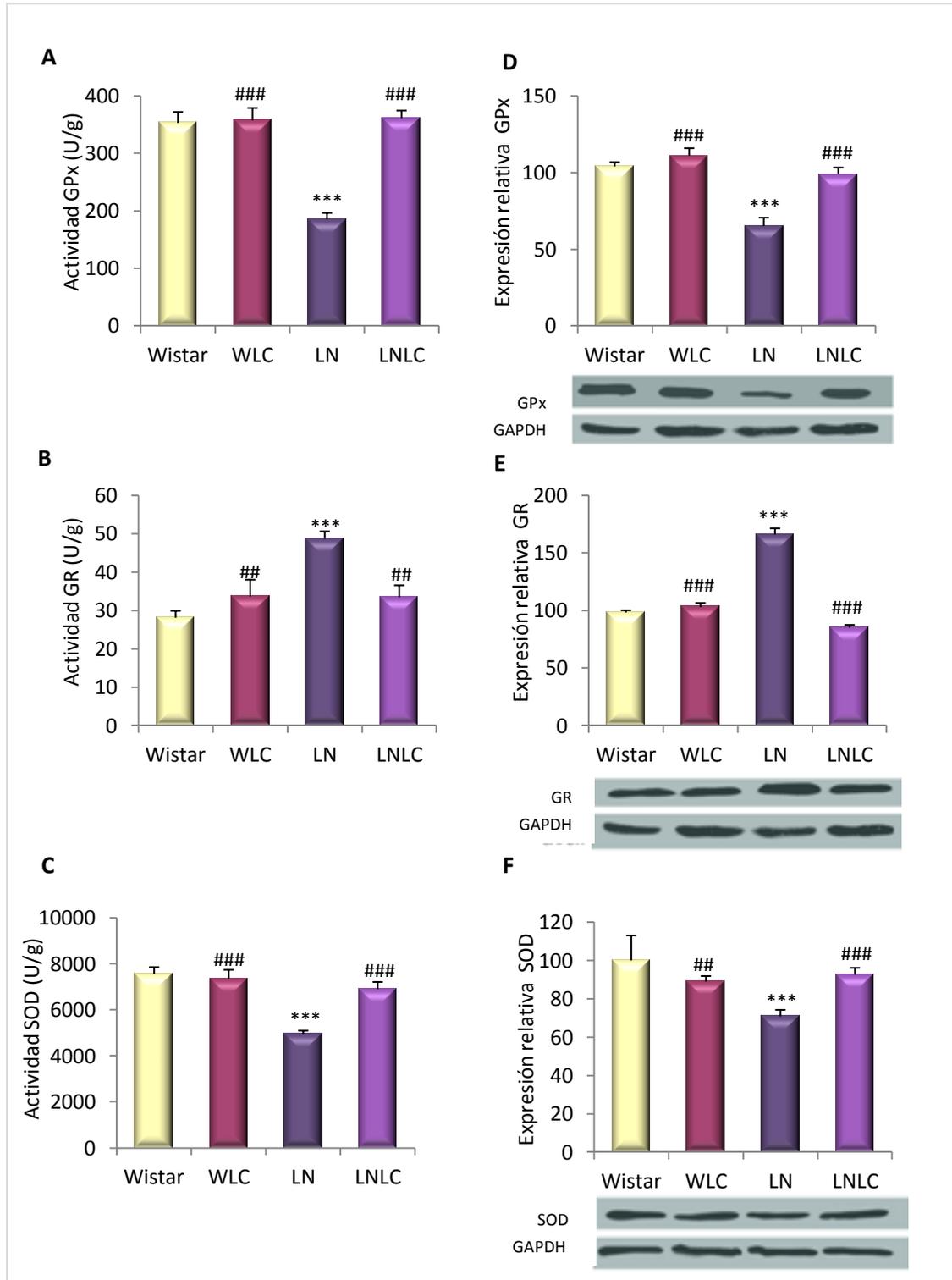


Figura 26. Actividad y expresión proteica de las enzimas antioxidantes en corteza renal. (A), (B) y (C), actividad de GPx, GR y SOD, respectivamente, en corteza renal de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Los valores están expresados en unidades de actividad enzimática por gramo (U/g). (D), (E) y (F) expresión proteica de GPx, GR y SOD, respectivamente. Los valores representan la media \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con Wistar; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparado con LN.

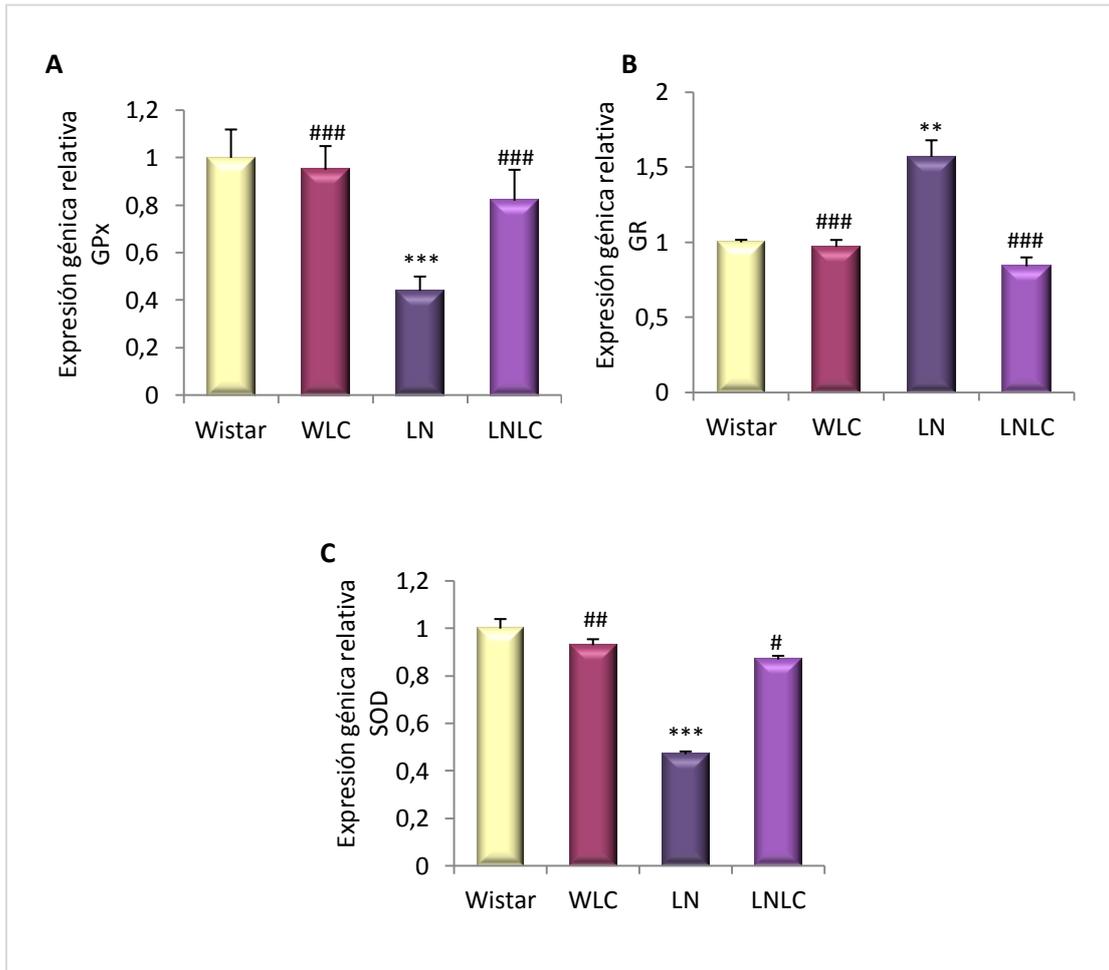


Figura 27. Expresión génica de las enzimas antioxidantes en corteza renal. (A), (B) y (C), expresión génica de GPx, GR y SOD, respectivamente, en corteza renal de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Los cambios cuantitativos en la expresión génica fueron determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo y calculados según el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los resultados representan la media \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ comparado con Wistar; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ comparado con LN.

1.3.5. Expresión génica del factor de transcripción Nrf-2

Nrf-2 es un factor de transcripción sensible a ROS, que actúa activando la expresión génica de los componentes del sistema antioxidante. Como muestra la figura 28, se observa un descenso importante en la expresión de Nrf-2 en ratas hipertensas con respecto al grupo control, valor que se revierte en las ratas hipertensas tratadas con LC. El tratamiento con LC no tuvo efectos significativos en ratas Wistar.

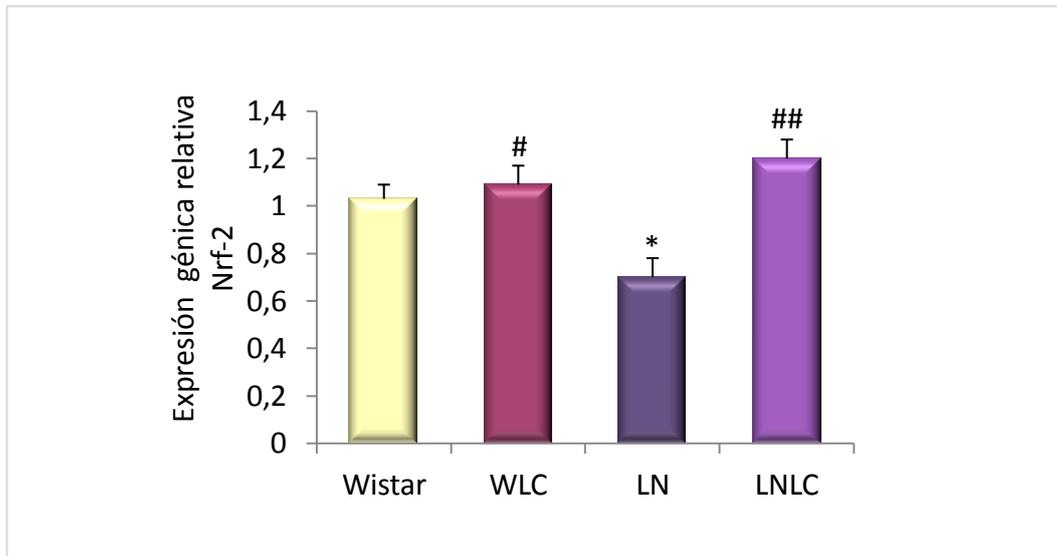


Figura 28. Expresión génica del factor Nrf-2 en corteza renal. Expresión génica de Nrf-2 en corteza renal de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Los cambios cuantitativos en la expresión génica fueron determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo y calculados según el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los resultados representan la media \pm S.E.M. de al menos 6 animales por grupo. Significación estadística: * $p < 0,05$ comparado con Wistar; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ comparado con LN.

1.4. Capacidad antiinflamatoria de la L-carnitina en riñón

1.4.1. Expresión génica de marcadores inflamatorios

Con el fin de estudiar la capacidad antiinflamatoria de LC en riñón de ratas con hipertensión arterial, determinamos la expresión génica de 2 interleukinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6), y de una interleukina antiinflamatoria (IL-10).

Como se observa en la figura 29, las ratas hipertensas presentaron una mayor expresión de las interleukinas proinflamatorias (2,7 y 6,8 veces para IL-1 β e IL-6, respectivamente), junto con una disminución en la expresión de la IL-10 (2,3 veces), al comparar con los valores observados en las ratas normotensas. La administración simultánea de LC consiguió revertir estos valores, aproximándolos a los encontrados en el grupo control.

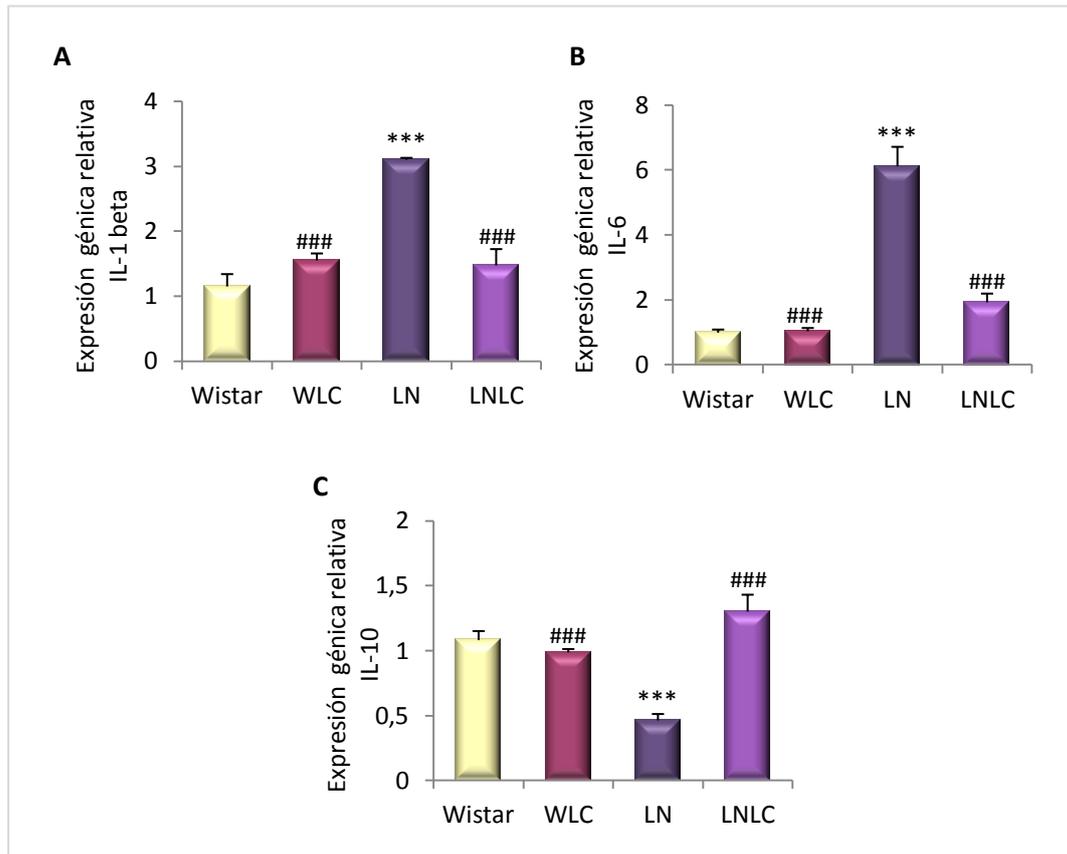


Figura 29. Expresión génica de las interleukinas IL-1 β , IL-6, y IL-10 en corteza renal. (A), (B) y (C), expresión génica de IL-1 β , IL-6 y IL-10, respectivamente, en corteza renal de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Los cambios cuantitativos en la expresión génica fueron determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo y calculados según el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los resultados representan la media \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con Wistar; ### $p < 0,001$ comparado con LN.

1.4.2. Expresión génica del factor de transcripción NF- κ B

La expresión génica del factor NF- κ B aumenta de forma significativa (11 veces) en las ratas hipertensas con respecto al grupo control. Cuando las ratas hipertensas fueron tratadas con LC, se consiguió una reversión en la expresión de este factor, llegándose a alcanzar valores similares a los animales hipertensos. Por su parte, las ratas WLC no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control (figura 30).

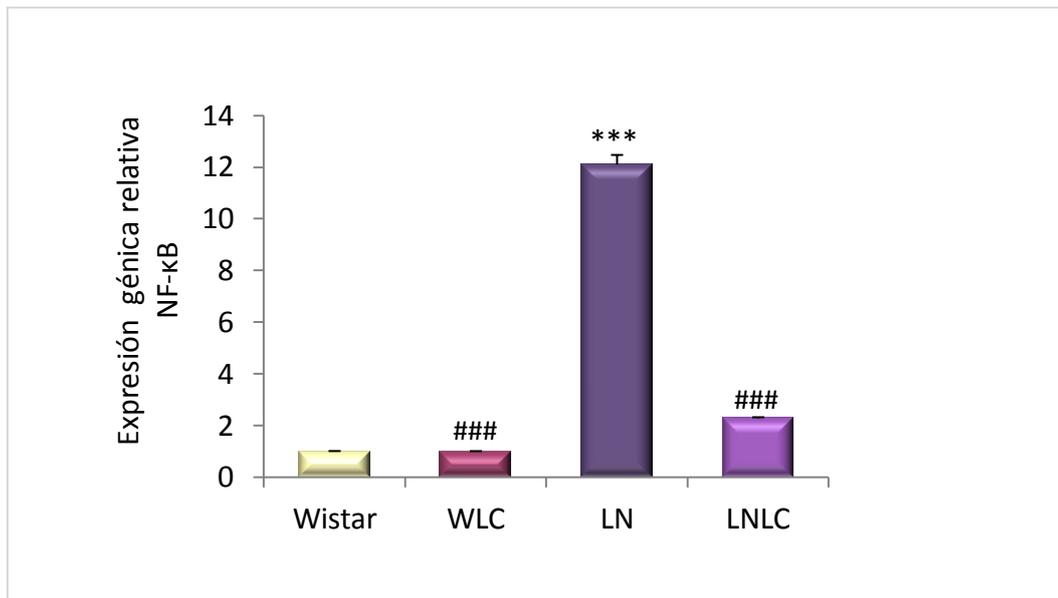


Figura 30. Expresión génica del factor de transcripción NF- κ B en corteza renal. Expresión génica de NF- κ B en corteza renal de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Los cambios cuantitativos en la expresión génica fueron determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo y calculados según el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los resultados representan la media \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con Wistar; ### $p < 0,001$ comparado con LN.

1.5. Capacidad antifibrótica de la L-carnitina en riñón

1.5.1. Estudio morfológico de la corteza renal

Las micrografías que se muestran en la figura 31 corresponden a cortes de corteza renal representativos de nuestros cuatro grupos experimentales, teñidos con hematoxilina-eosina. En la imagen correspondiente a la rata tratada con L-NAME, se observan cilindros hialinos en la luz de algunos túbulos, lo que indica que estas ratas presentan daño tubular; también se aprecian glomérulos esclerosados. Este tipo de alteraciones no se observan en los otros tres grupos de ratas.

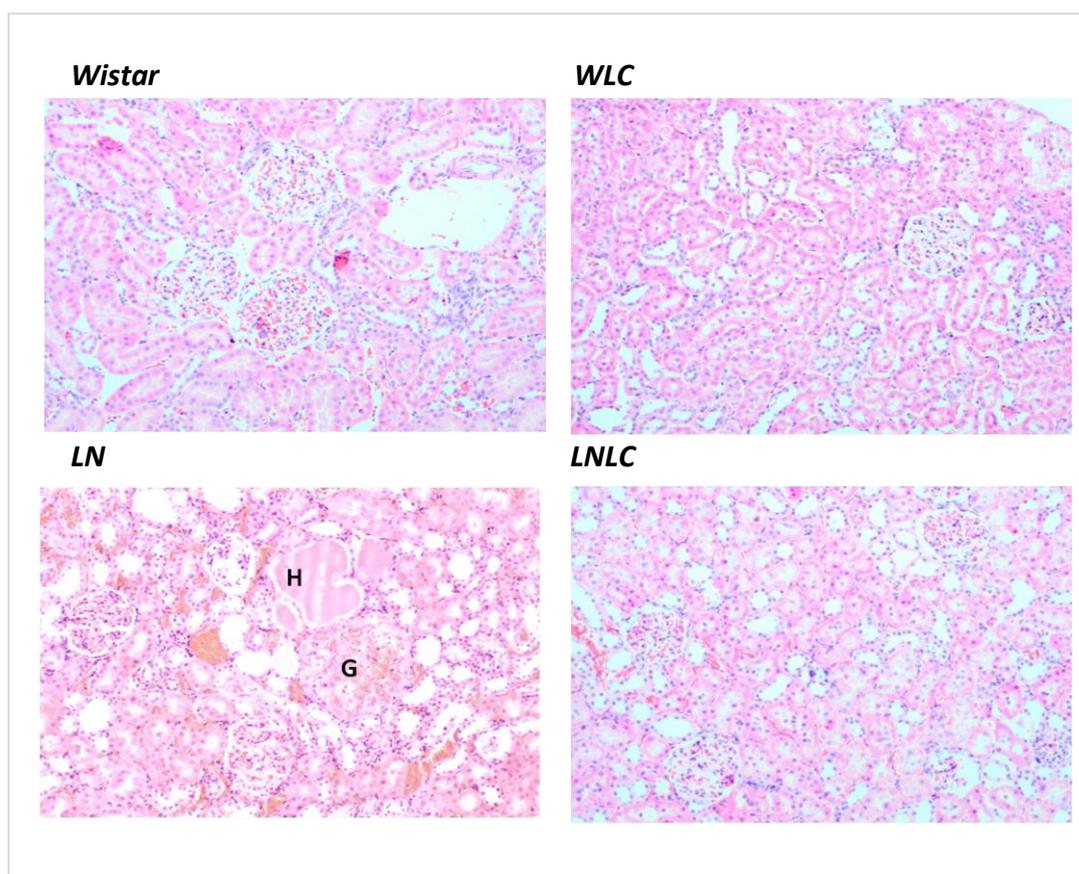


Figura 31. Microfotografías a microscopía óptica. Micrografías de corteza renal de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Las muestras están teñidas con hematoxilina-eosina. En la micrografía perteneciente a la rata tratada con L-NAME se aprecian depósitos hialinos tubulares (H) y un glomérulo con esclerosis global (G). Aumento 100x.

1.5.2. Estudio morfométrico del grado de fibrosis renal

Como muestra la figura 32, las muestras teñidas con Tricómico de Masson revelaron un gran incremento del tejido conectivo a nivel tubulointersticial, mesangial y perivascular, en ratas tratadas con L-NAME. Lo que se traduce en fibrosis renal en las aéreas mencionadas. Sin embargo, las ratas tratadas con LC y L-NAME simultáneamente, no mostraron esta fibrosis, ofreciendo un aspecto similar al observado en los grupos Wistar y WLC.

Con el fin de cuantificar el grado de fibrosis, realizamos un estudio morfométrico en el que analizamos muestras teñidas con Rojo Sirio mediante un sistema de análisis computerizado. No se encontraron cambios significativos entre el grupo control y el grupo WLC, en cuanto al grado de fibrosis tanto intersticial como glomerular. Sin embargo, a nivel tubulointersticial (figura 33) y mesangial (figura 34), el espacio ocupado por la matriz extracelular fue significativamente mayor en las ratas hipertensas con respecto a las controles, aunque cuando se realizó la administración simultánea de L-NAME con L-Carnitina, el tejido fibroso detectado fue similar al encontrado en las ratas normotensas. Por otro lado, determinamos el área corpuscular en nuestros cuatro grupos experimentales de animales. Como muestra la figura 35, el área corpuscular disminuye significativamente en ratas tratadas con L-NAME con respecto a las ratas control, disminución que desaparece tras el tratamiento adicional con LC. No se observaron cambios significativos entre las ratas normotensas y aquellas tratadas con LC.

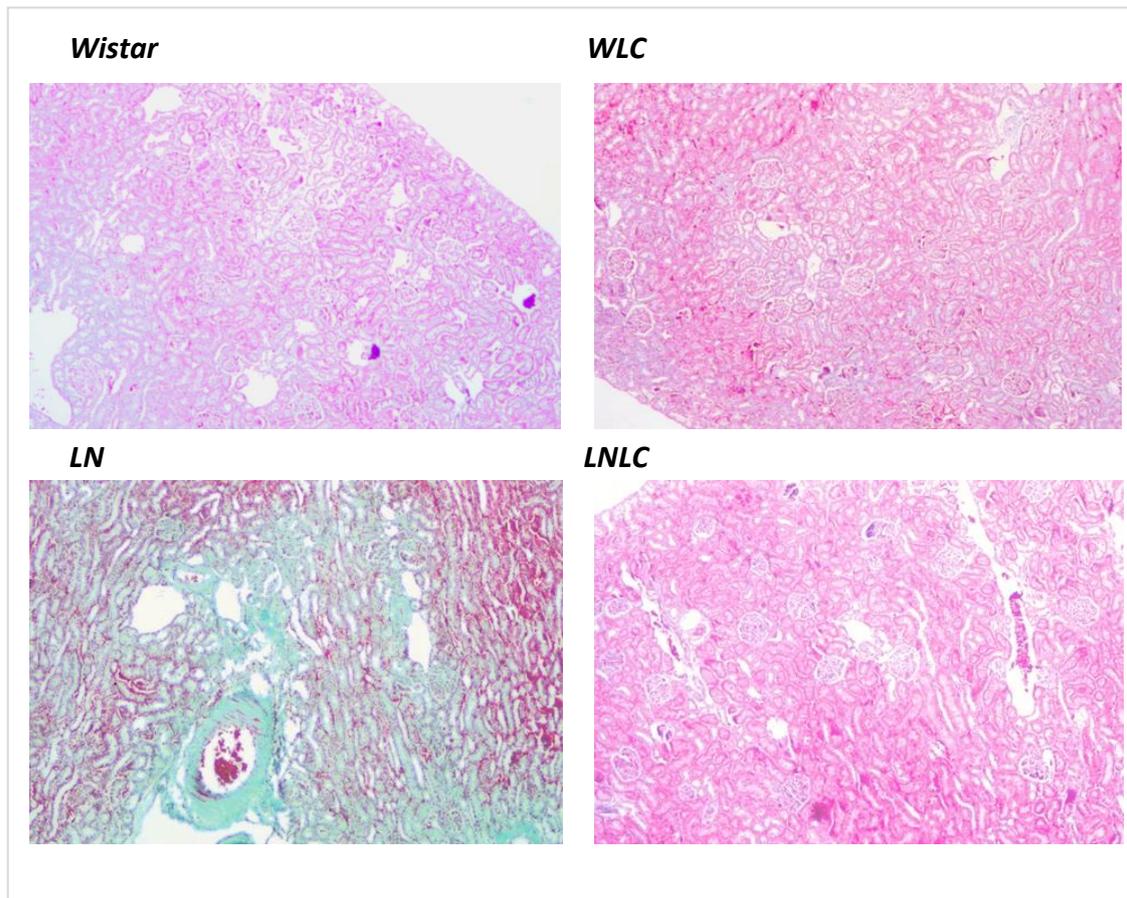


Figura 32. Estudio de la fibrosis en muestras de riñón teñidas con Tricromico de Masson. Micrografías representativas de muestras teñidas con la técnica Tricómico de Masson en corteza renal de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Aumento 40x.

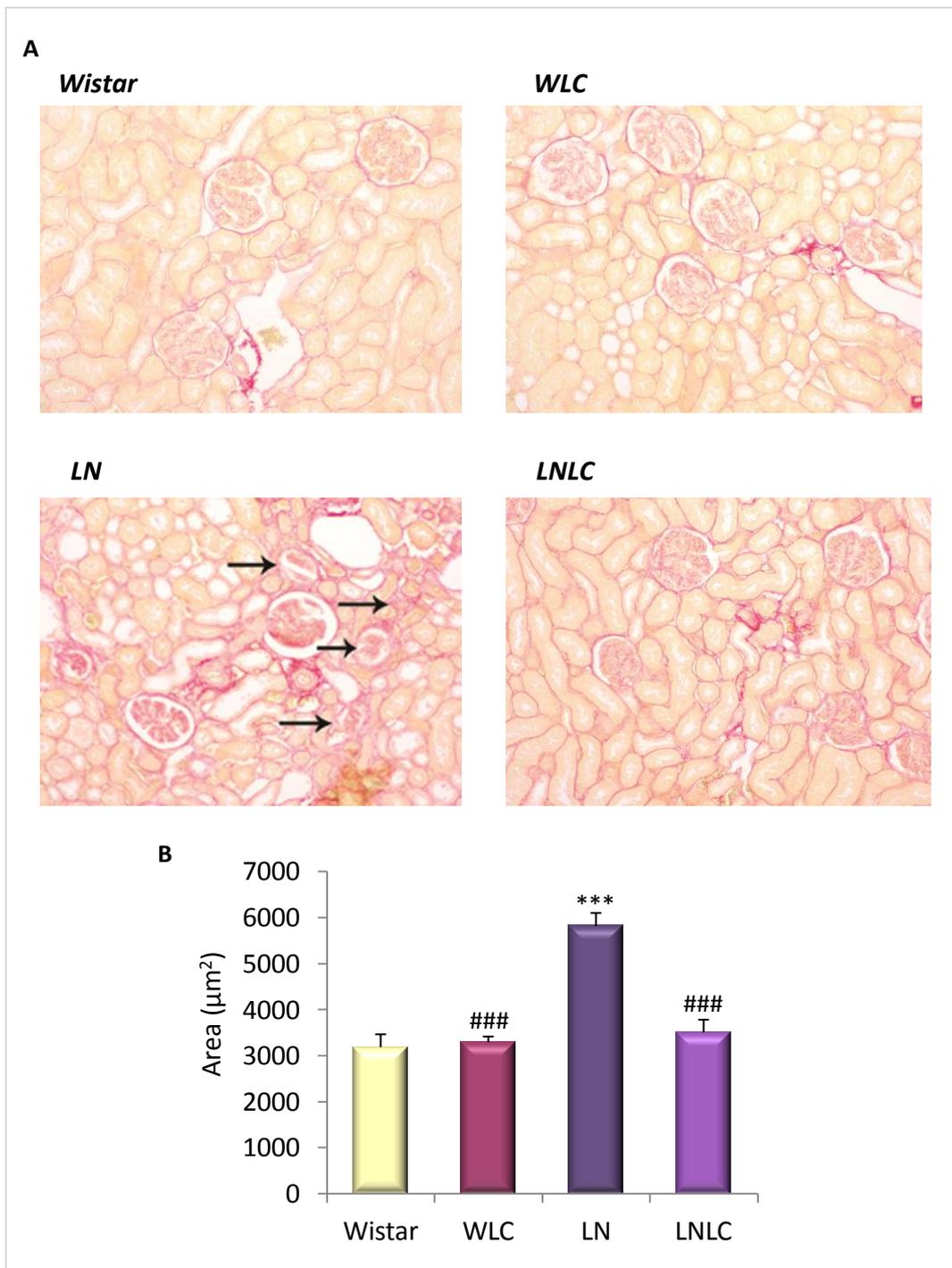


Figura 33. Estudio morfométrico de la fibrosis a nivel intersticial. (A) micrografías representativas de muestras de corteza renal teñidas con Rojo Sirio en ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). (B) análisis de imagen, muestra la cuantificación de la fibrosis intersticial. Los valores representan la media \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con Wistar; ### $p < 0,001$ comparado con LN. Aumento 100x.

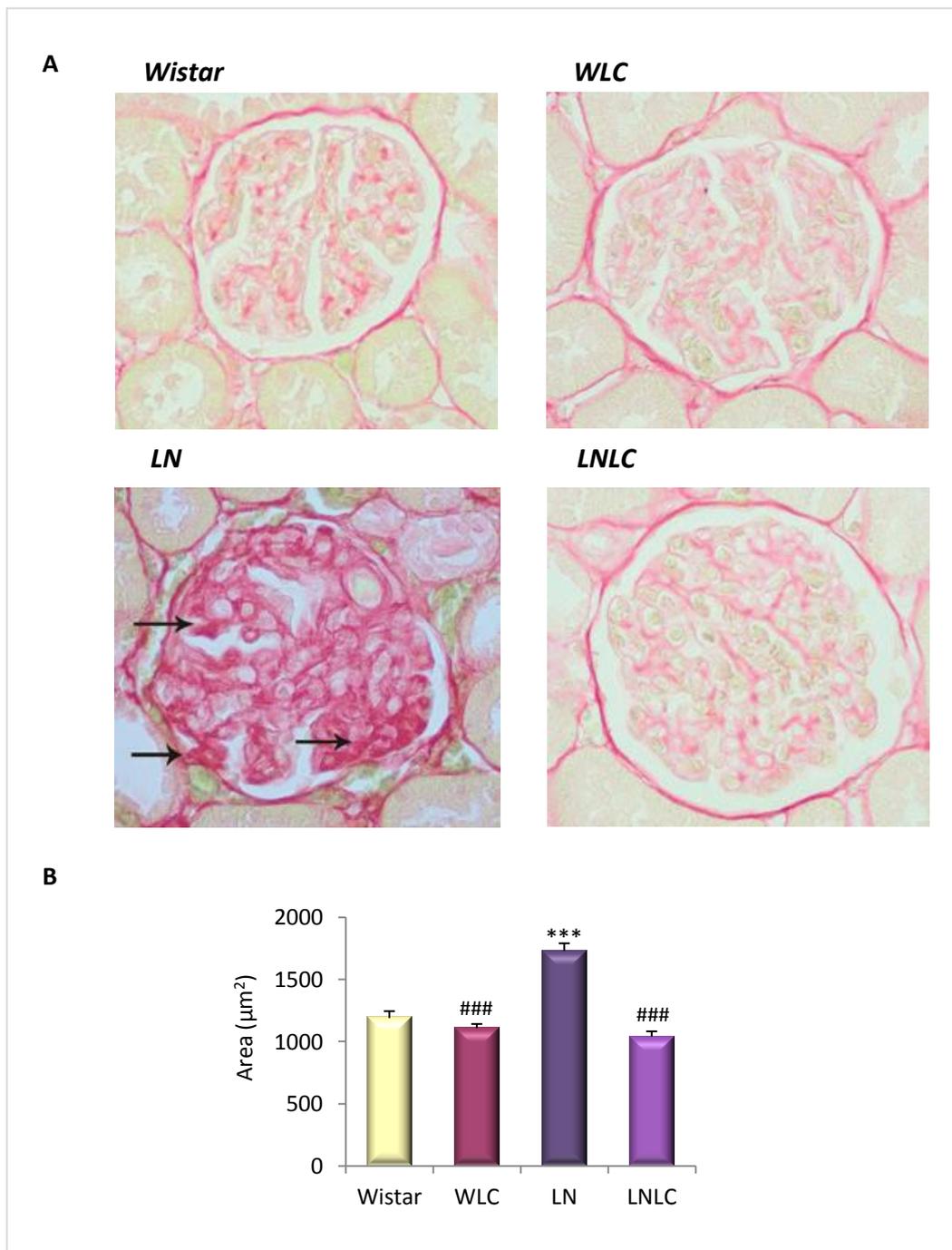


Figura 34. Estudio morfométrico de la fibrosis a nivel mesangial. (A) micrografías representativas de muestras teñidas con Rojo Sirio, y muestran la corteza renal de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). (B) análisis de imagen, muestra la cuantificación de la fibrosis mensagial (B) Los valores representan la media \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con Wistar; ### $p < 0,001$ comparado con LN. Aumento 400x.

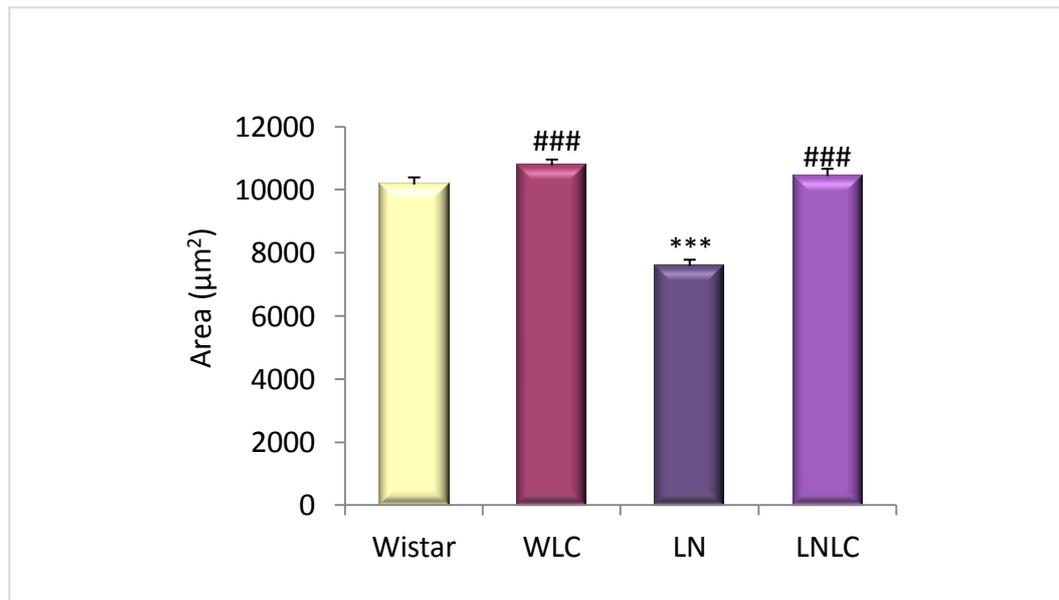


Figura 35. Estudio del área corpuscular. Análisis de imagen a nivel del área corpuscular de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Los valores representan la media \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con Wistar; ### $p < 0,001$ comparado con LN.

1.5.3. Expresión génica de colágeno

Con el fin de verificar los efectos de la LC en la fibrosis renal, se determinó la expresión génica de las moléculas de colágeno tipos I y III. Así, como se puede apreciar en la figura 36, las ratas tratadas con L-NAME mostraron una elevación significativa en los niveles de expresión génica de ambos tipos de colágeno con respecto al grupo Wistar (aproximadamente 3 y 2,5 veces, respectivamente). Tras el tratamiento con LC, los valores vuelven a la normalidad. Tampoco en este caso se observaron variaciones entre las ratas Wistar y las tratadas con LC.

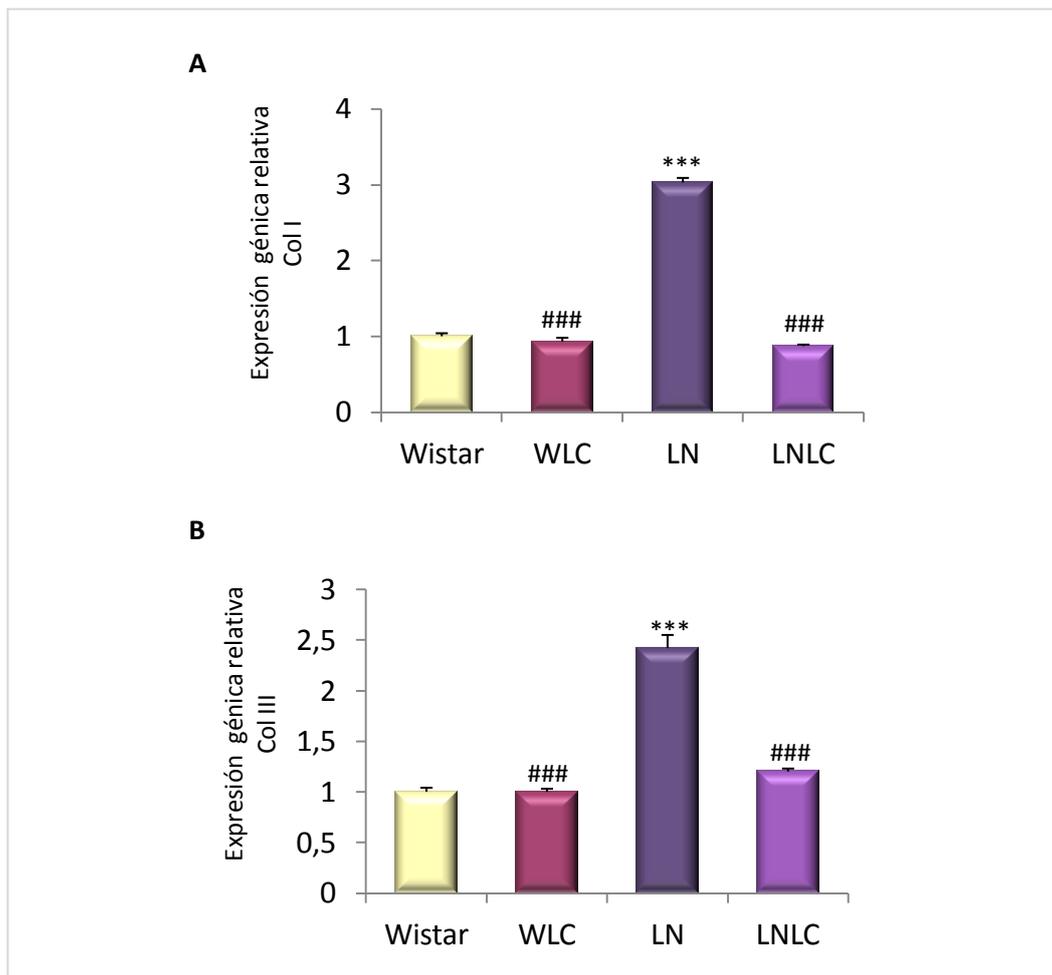


Figura 36. Expresión génica de colágeno I y III en corteza renal. (A) y (B) expresión génica de colágeno tipo I y tipo III respectivamente, en corteza renal de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Los cambios cuantitativos en la expresión génica fueron determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo y calculados según el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los resultados representan la media \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $P < 0,001$ comparado con Wistar; ### $p < 0,001$ comparado con LN.

1.5.4. Expresión génica de marcadores profibróticos

Con el fin de estudiar las vías implicadas en el efecto antifibrótico de la LC, determinamos la expresión génica de los factores profibróticos TGF- β_1 y CTGF. En ambos casos, no se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo WLC. Sin embargo, las ratas hipertensas presentaron un claro aumento en la expresión génica de ambos factores profibróticos (3 y 2,3 veces, respectivamente). Además, el tratamiento simultáneo con LC condujo a la normalización de estos valores (figura 37).

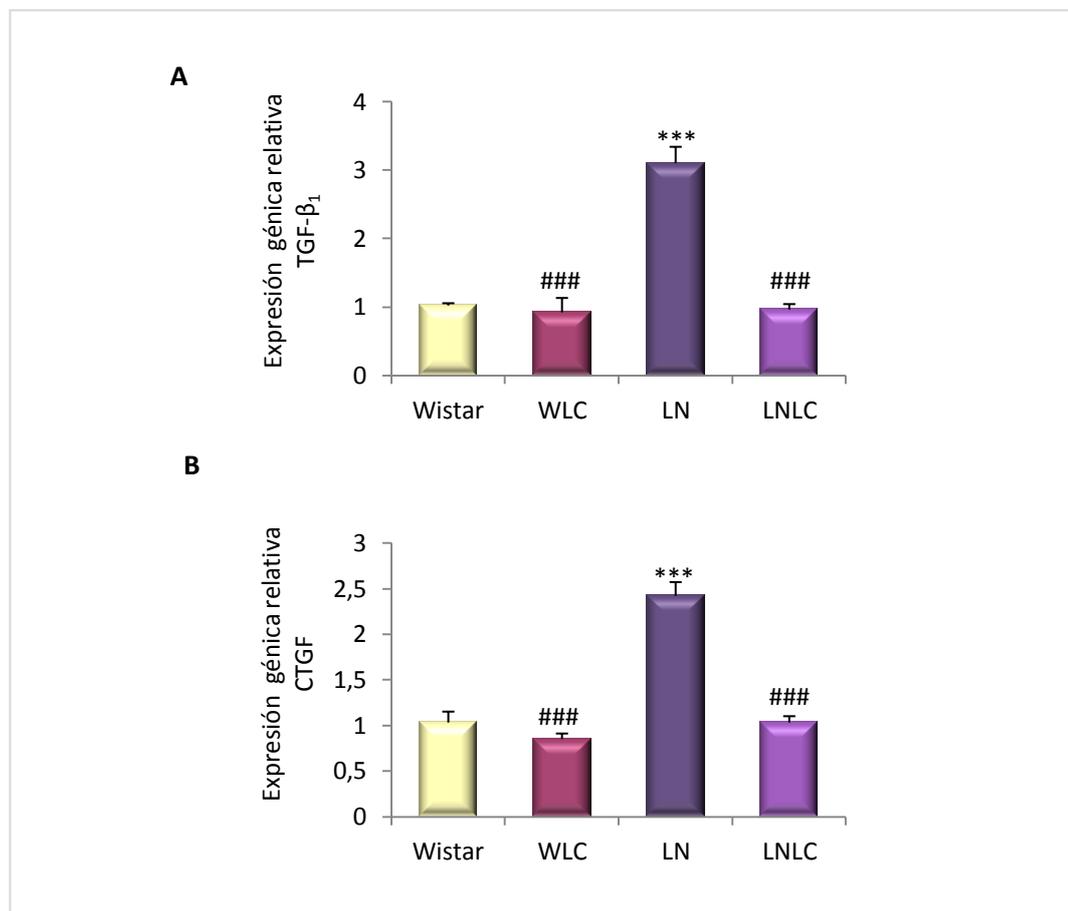


Figura 37. Expresión génica de los factores profibróticos TGF- β_1 y CTGF en corteza renal. (A) y (B) expresión génica de TGF- β_1 y CTGF, respectivamente, en corteza renal de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Los cambios cuantitativos en la expresión génica fueron determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo y calculados según el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los resultados representan la media \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $P < 0,001$ comparado con Wistar; ### $p < 0,001$ comparado con LN.

1.5.5. Estudio inmunohistoquímico de TGF- β_1

En ratas control y ratas Wistar tratadas con LC, se observó una ligera expresión del anticuerpo anti-TGF- β_1 . Sin embargo, las ratas tratadas con L-NAME mostraron un aumento importante en la inmunolocalización de TGF- β_1 , tanto a nivel intersticial como a nivel glomerular. Cuando se administró LC a las ratas hipertensas, se observó una reducción en la expresión de este factor (figura 38).

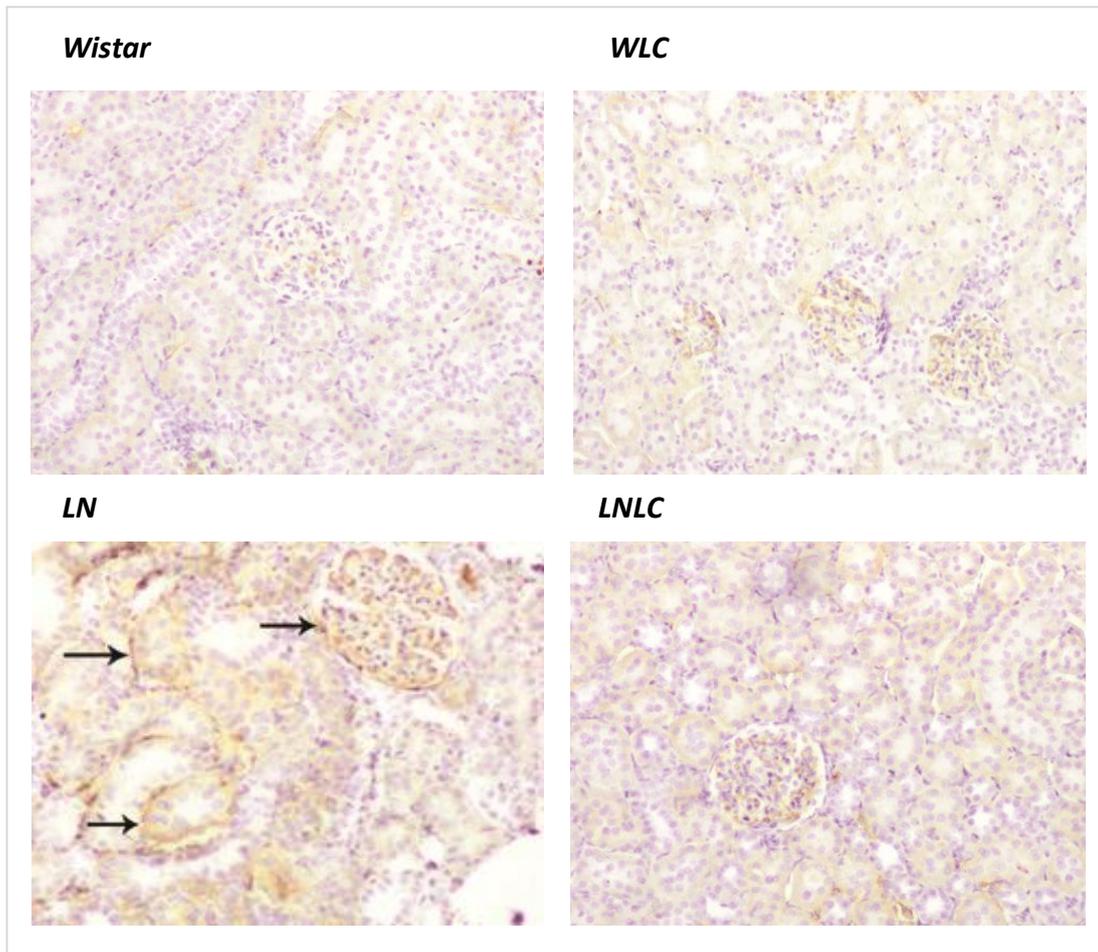


Figura 38. Estudio inmunohistoquímico de TGF- β_1 en riñón. Micrografías representativas del estudio inmunohistoquímico del TGF- β_1 en riñón de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Las flechas negras señalan los puntos de expresión intensa de TGF- β_1 . Aumento 100x.

1.6. Implicación del sistema renina angiotensina

Para determinar si los efectos beneficiosos de la LC guardan relación con el SRA, se determinó la expresión génica de dos componentes de este sistema, la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y el receptor tipo 1 de AngII, AT1. Observamos un aumento significativo en la expresión génica de ambas moléculas en ratas hipertensas con respecto a las controles (2,7 veces aproximadamente). La administración de LC a ratas hipertensas fue capaz de normalizar estos valores (figura 39).

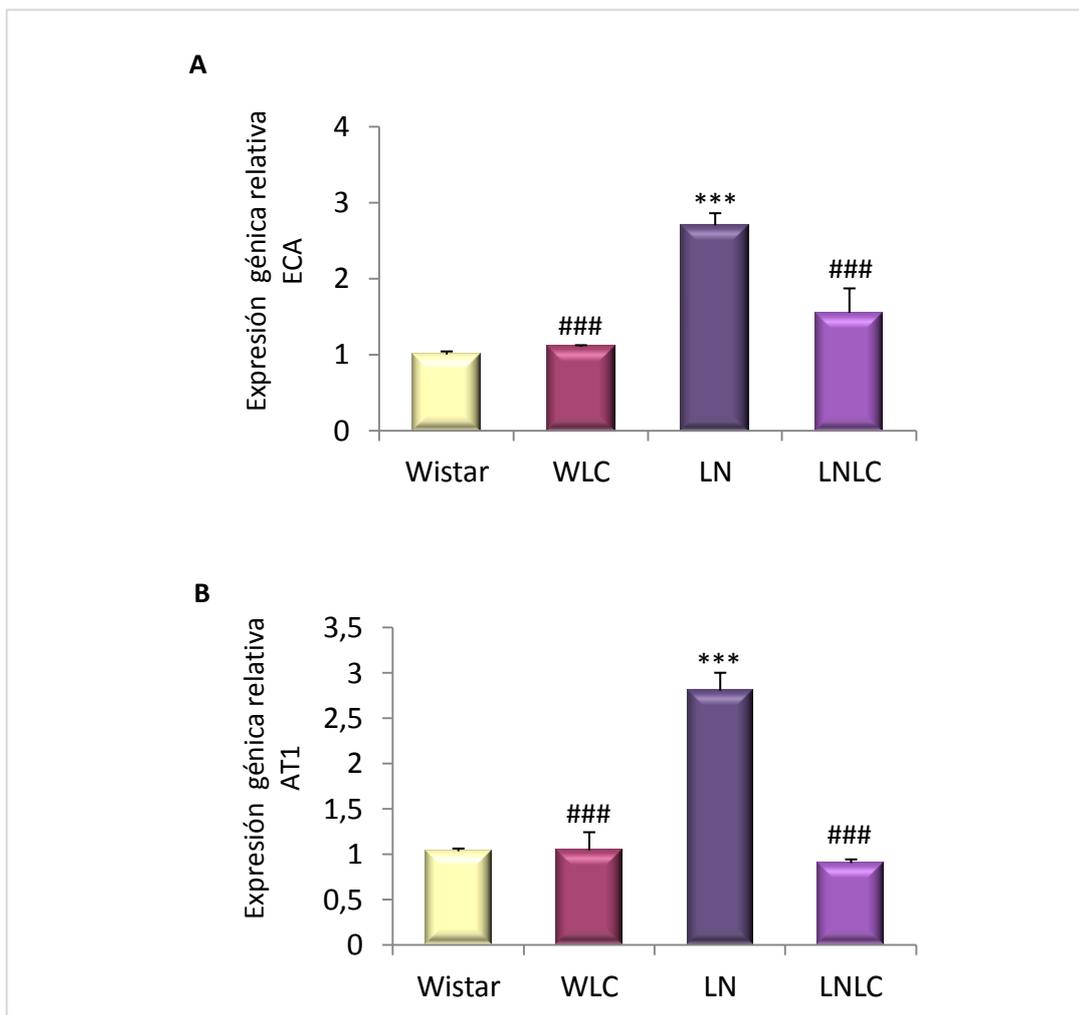


Figura 39. Expresión génica de ECA y AT1 en corteza renal. (A) y (B) expresión génica de ECA y AT1, respectivamente, en corteza renal de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Los cambios cuantitativos en la expresión génica fueron determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo y calculados según el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los resultados representan la media \pm E.S.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $P < 0,001$ comparado con Wistar; ### $p < 0,001$ comparado con LN.

1.7. Implicación de los factores de transcripción PPAR α y PPAR γ

1.7.1. Expresión génica de PPAR α y PPAR γ

La expresión de PPAR α y PPAR γ disminuyó de forma significativa en las ratas hipertensas con respecto a las ratas Wistar (4,2 y 2,2 veces, respectivamente). La administración crónica de LC revirtió estos valores hasta alcanzar aquellos observados en las ratas normotensas (figura 40).

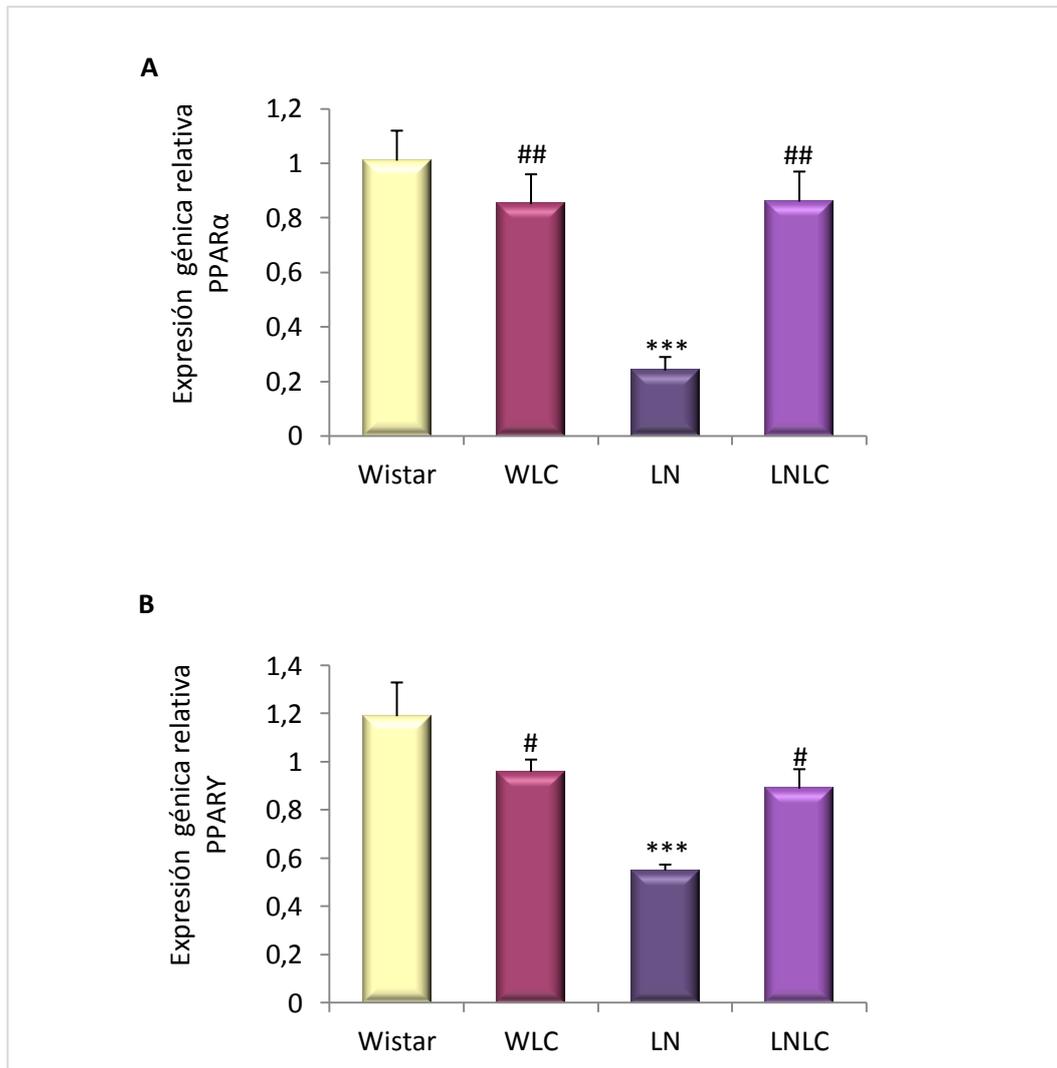


Figura 40. Expresión génica de los factores PPAR α y PPAR γ en corteza renal. (A) y (B) expresión génica de PPAR α y PPAR γ , en corteza renal de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Los cambios cuantitativos en la expresión génica fueron determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo y calculados según el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los resultados representan la media \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $P < 0,001$ comparado con Wistar; # $P < 0,05$, ## $p < 0,01$ comparado con LN.

1.7.2. Expresión proteica de PPAR γ

Al igual que el análisis de expresión génica, el experimento de *Western blotting* relativo a PPAR γ mostró una disminución de un 20% en la expresión proteica de este factor en el grupo L-NAME con respecto al control. De nuevo estos valores se restablecieron tras el tratamiento simultáneo con LC (figura 41).

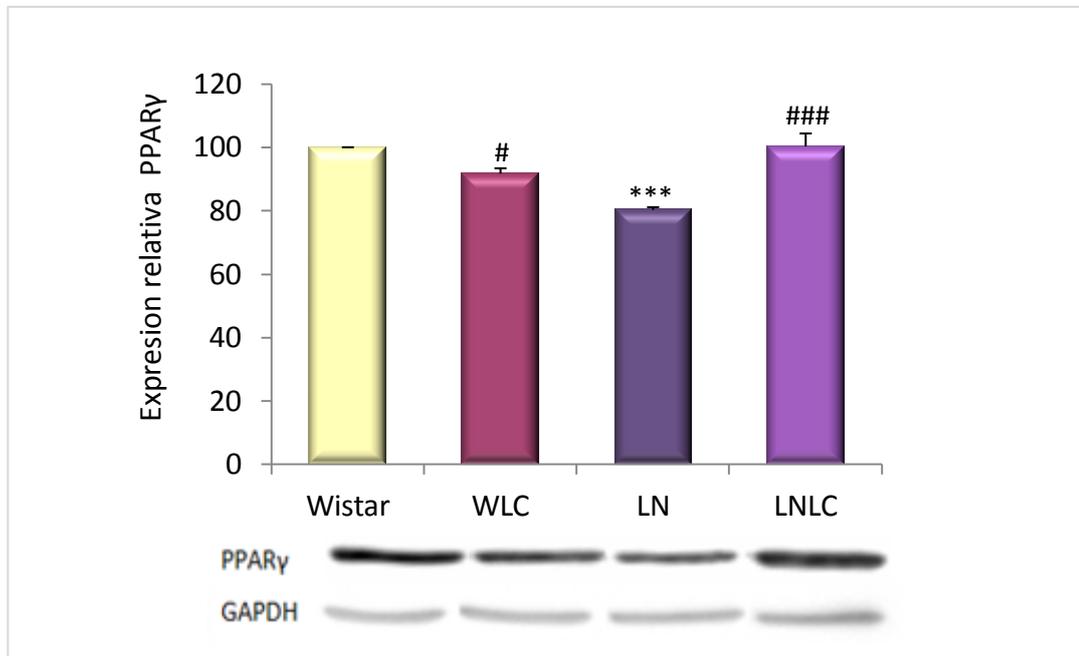


Figura 41. Expresión proteica de PPAR γ en corteza renal. Expresión proteica relativa en corteza renal de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Los valores representan la media \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: *** $p < 0,001$ comparado con Wistar; # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ comparado con LN.

1.8. Expresión génica del transportador de L-carnitina OCTN2 y del gen BBOX-1 en corteza renal

La expresión génica del transportador OCTN2 está significativamente disminuida en las ratas tratadas con L-NAME con respecto al grupo control. En cambio, en las ratas tratadas con L-NAME y LC simultáneamente, se produce un aumento de la expresión de este gen hasta recuperar los valores normales. En cuanto a la síntesis de LC, hemos determinado la expresión del gen BBOX-1, que codifica para la enzima γ -butirotbetaína dioxigenasa (γ -BBD), enzima limitante en la biosíntesis de LC. Hemos encontrado un claro descenso en la expresión de este gen en las ratas hipertensas, alcanzándose valores normales tras el tratamiento con LC. Como de costumbre, no encontramos diferencias significativas entre el grupo control y el grupo WLC en ninguno de estos dos parámetros.

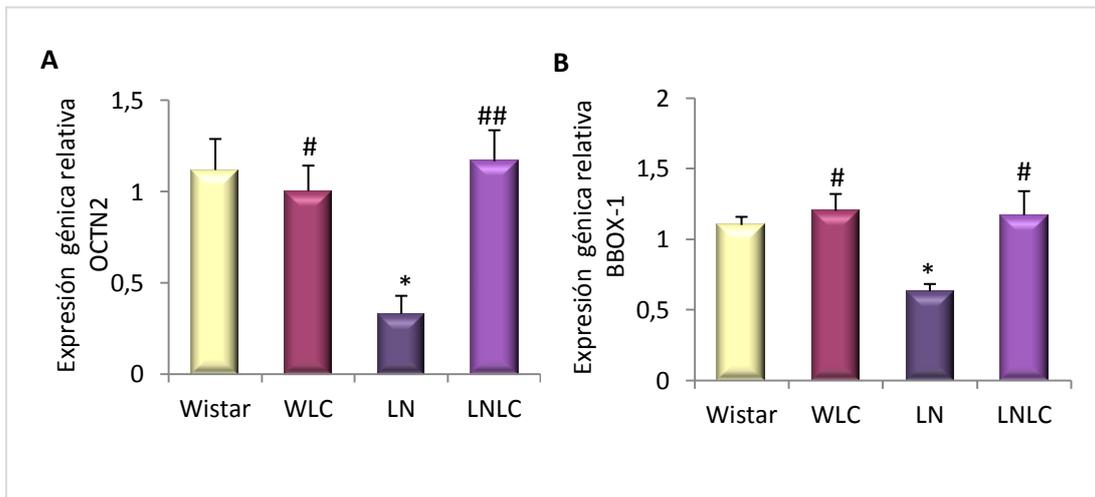


Figura 42. Expresión génica de OCTN2 y BBOX-1 en corteza renal. (A) y (B) expresión génica de OCTN2 y BBOX-1, respectivamente, en corteza renal de ratas que han recibido una dieta normal (Wistar), ratas tratadas con L-carnitina (WLC), ratas tratadas con L-NAME (LN), y ratas tratadas con L-NAME y L-carnitina simultáneamente (LNLC). Los cambios cuantitativos en la expresión génica fueron determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo y calculados según el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los resultados representan la media \pm S.E.M. de al menos 6 animales en cada grupo. Significación estadística: * $p < 0,05$ comparado con Wistar; # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ comparado con LN.

2. Estudios en cultivos celulares

2.1. Concentración de L-carnitina necesaria para revertir el efecto profibrótico de TGF- β_1

Con el fin de identificar las vías a través de las cuales la LC ejerce su acción antifibrótica en el riñón de ratas hipertensas, se realizaron estudios *in vitro* con células NRK-52E. En primer lugar, determinamos la concentración de LC necesaria para revertir la estimulación de la expresión génica de CTGF inducida por TGF- β_1 . Como muestra la figura 43, las tres concentraciones de LC utilizadas en el ensayo (100 μ M, 1 mM y 10 mM) revirtieron a valores normales la expresión génica del factor profibrótico CTGF. Tras estos resultados, decidimos elegir la concentración de 1 mM de LC para continuar con las determinaciones.

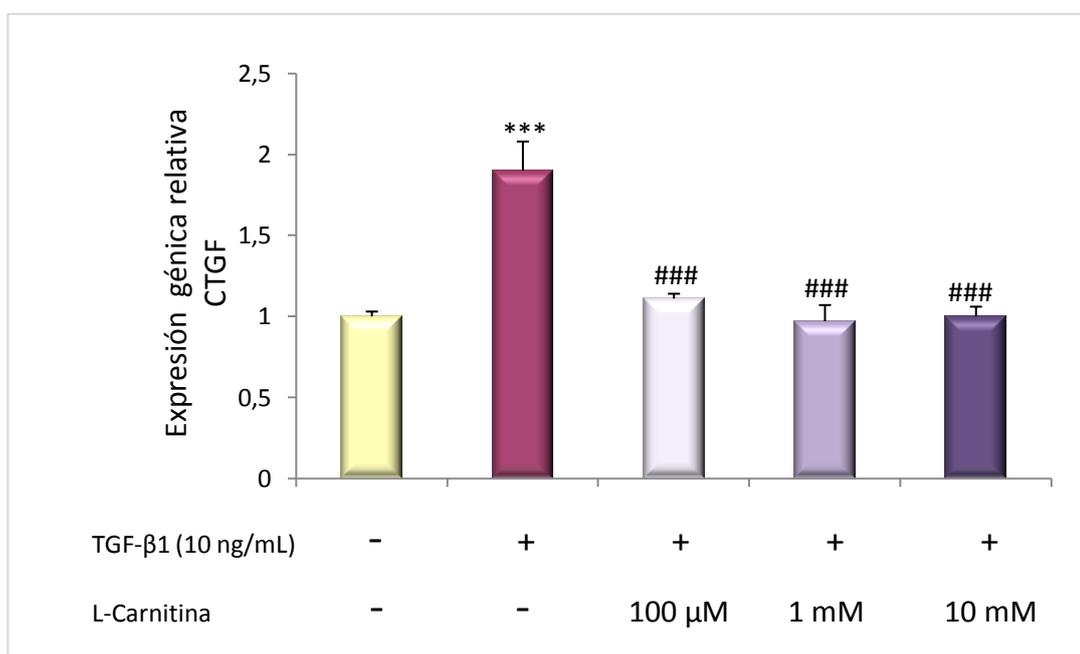


Figura 43. Determinación de la concentración de L-carnitina necesaria para revertir el efecto profibrótico de TGF- β_1 . Expresión génica de CTGF en células NRK-52E tratadas con TGF- β_1 (a una concentración de 10 ng/mL y durante 24 h), y distintas concentraciones de L-carnitina (100 μ M, 1 mM y 10 mM). Los cambios cuantitativos en la expresión génica fueron determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo y calculados según el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los resultados representan la media \pm S.E.M. de dos experimentos independientes. Significación estadística: *** $P < 0,001$ comparado con el estado basal (columna amarilla); ### $p < 0,001$ comparado con el grupo tratado solamente con TGF- β_1 (columna roja).

2.2. Participación de PPAR γ en la acción antifibrótica de la L-carnitina

Para determinar el papel de PPAR γ en el efecto antifibrótico de la LC, utilizamos un inhibidor de PPAR γ denominado GW9662. Las células NRK-52E fueron tratadas con TGF- β_1 en presencia y en ausencia de LC. Como sucede en el experimento anterior, la LC revierte la estimulación de la expresión génica de CTGF tras el tratamiento con TGF- β_1 . Sin embargo, cuando tratamos simultáneamente con TGF- β_1 , LC y el inhibidor de PPAR γ a diferentes concentraciones (10, 30 y 100 μ M), se observó que una concentración de 100 μ M de GW9662 aumentaba significativamente la expresión de CTGF, revirtiendo así el efecto antifibrótico de la LC y demostrando la participación de PPAR γ en dicho efecto (figura. 44).

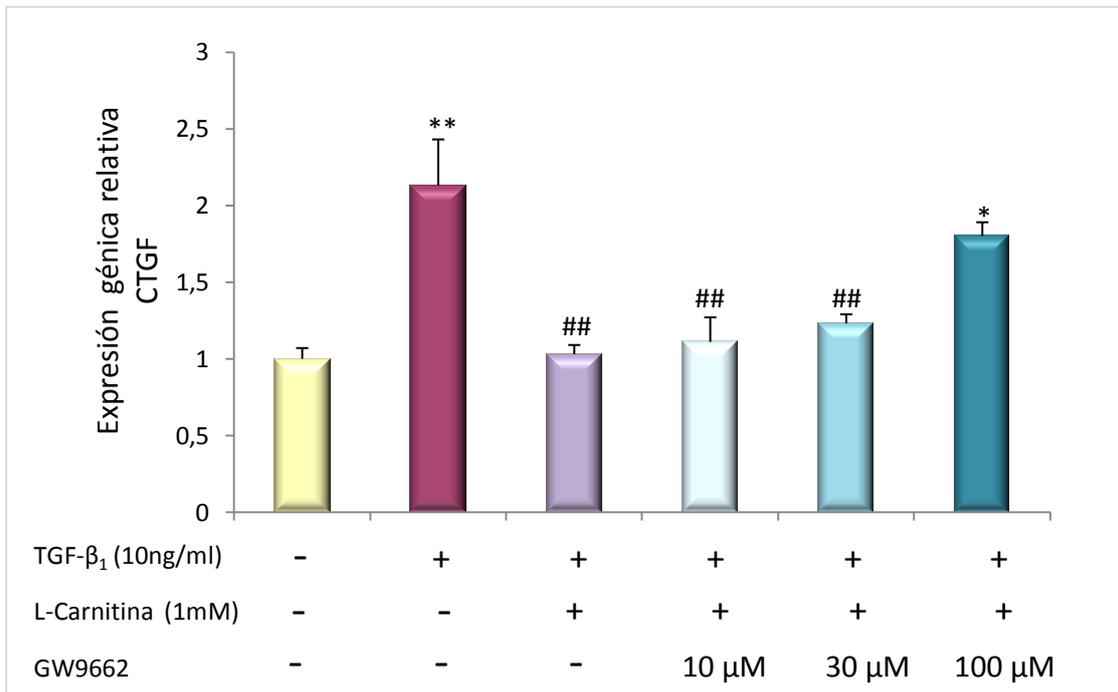


Figura 44. Determinación de la participación de PPAR γ en el efecto antifibrótico de la LC. Expresión génica de CTGF en células NRK-52E tratadas con TGF- β_1 (a una concentración de 10 ng/mL y durante 24 h), TGF- β_1 mas L-carnitina 1mM y TGF- β_1 mas LC mas el inhibidor de PPAR γ (GW9662,) a distintas concentraciones (10 μ M, 30 μ M, 100 μ M). Los cambios cuantitativos en la expresión génica fueron determinados en relación a los niveles de ARNm del GAPDH en cada grupo y calculados según el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Los resultados representan la media \pm S.E.M. de dos experimentos independientes. Significación estadística: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparado con el estado basal (columna amarilla); ## $p < 0,01$ comparado con el grupo tratado solamente con TGF- β_1 (columna roja).

DISCUSIÓN

1. Modelos experimentales

1.1. Modelo animal

Con el fin de comprender los mecanismos implicados en el origen, desarrollo y mantenimiento de la hipertensión arterial (HTA), se han desarrollado diferentes modelos experimentales en los últimos años. Este trabajo se ha desarrollado en ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar, nuestro modelo de hipertensión arterial consiste en el tratamiento de estos animales con N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). El L-NAME es un compuesto que produce vasoconstricción gracias a la inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), con la consecuente disminución en la síntesis de una de las principales sustancias vasodilatadoras del organismo, el óxido nítrico (NO). La administración crónica de L-NAME causa hipertensión persistente, que se asocia a un daño renal caracterizado por el desarrollo de glomeruloesclerosis, isquemia glomerular e infiltración intersticial del sistema inmune.¹⁵⁷ Todo ello se desarrolla con la participación del sistema renina angiotensina (SRA).^{158,159} Por lo tanto, las ratas con hipertensión inducida por L-NAME constituyen un buen modelo experimental para el estudio de nuevas estrategias terapéuticas, en especial aquellas cuyo objetivo sea evaluar la capacidad de una molécula para prevenir el desarrollo del daño renal en el contexto de la HTA.

En este estudio no se han encontrado diferencias significativas en cuanto al peso corporal de los animales tras el tratamiento con L-NAME, coincidiendo con lo observado por otros autores.¹⁶⁰⁻¹⁶² Sin embargo, sí se ha observado un aumento significativo del peso del riñón en las ratas hipertensas con respecto al grupo control, indicando la existencia de hipertrofia renal inducida por el L-NAME. Estos resultados no coinciden con aquellos observados por Rodríguez-Gómez y col. y Gómez-Guzmán y col.^{160,162} Las diferencias podrían deberse a la duración del tratamiento, ya que en el caso de estos autores el tratamiento con L-NAME se llevó a cabo durante 4 semanas, mientras que en nuestro estudio la duración del tratamiento ha sido de 10 semanas. Por otra parte, nuestros resultados muestran cómo el tratamiento con L-carnitina (LC) es capaz de prevenir la hipertrofia renal desarrollada en las ratas hipertensas. Estos resultados coinciden por los obtenidos por Rajasekar y col. en ratas con síndrome metabólico inducido por una dieta rica en fructosa.¹⁶³

Tal y como cabía esperar, basándonos en la literatura previa al respecto,¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ las cifras de presión arterial (PA) aumentan en las ratas tratadas con L-NAME al compararlas con los valores observados en ratas controles. Cuando las ratas con hipertensión inducida por L-NAME recibieron un tratamiento crónico simultáneo con LC, observamos una disminución significativa de los valores de PA, que al final del periodo experimental llegan a alcanzar una reducción de 42 y 44 mmHg para la PAD y PAS, respectivamente, con respecto al grupo L-NAME. Estos resultados muestran de nuevo el efecto hipotensor de la LC, ya descrito por nuestro grupo de investigación en distintos modelos de hipertensión,^{88,92,115,117} aunque no llegan a normalizarse las cifras de presión arterial con respecto a los valores observados en las ratas control. Estos datos sugieren que la disminución en los valores de PA encontrada en las ratas tratadas con LC solo explica, en parte, los efectos nefroprotectores de la LC observados en este trabajo. Esta reducción parcial de las cifras de PA por la administración de LC también ha sido observada por otros autores, entre ellos O'Brien y col.,¹¹² en ratas con hipertensión generada por la administración de mineralocorticoides, y Rajasekar y col.,¹⁶³ utilizando ratas con síndrome metabólico inducido por una dieta rica en fructosa.

Función renal

Las ratas tratadas con L-NAME se caracterizan por sufrir alteraciones en la función renal, que se traducen en un aumento en los niveles de proteinuria y una disminución en la tasa de filtrado glomerular, como se muestra en numerosos trabajos de investigación.^{160,162,164,167-169} En este estudio, las ratas hipertensas presentan un aumento en los niveles de proteinuria y una disminución en la tasa de filtración glomerular. Sin embargo, cuando estas ratas fueron tratadas con LC, se observó una reversión en los valores de ambos parámetros. Este efecto nefroprotector de la LC concuerda con los resultados obtenidos por Aydogdu y col.¹⁷⁰ y Ustundag y col.¹⁷¹ en ratas con insuficiencia renal mioglobínica provocada por el tratamiento con glicerol, así como en ratas Wistar con nefrotoxicidad causada por el tratamiento con cisplatin.¹⁷²

Síntesis y transporte de L-carnitina

La proteína transportadora OCTN2 es esencial para la reabsorción de LC al interior de las células renales, ya que más del 98% de la LC filtrada en los glomérulos se recupera

gracias a la presencia de este transportador en el epitelio renal.^{90,93,173} Los resultados de nuestro estudio muestran cómo las ratas con hipertensión inducida por L-NAME presentan una disminución significativa en la expresión génica de OCTN2 a nivel renal. El tratamiento crónico con LC en estas ratas revirtió esta disminución, alcanzándose niveles normales para este parámetro.

Además de lo anterior, el tratamiento con L-NAME provocó un descenso en la expresión génica renal del gen BBOX-1; este gen codifica para la enzima γ -butirotetrahidropterina dioxigenasa (γ -BBD), enzima limitante en la biosíntesis de LC. Esta alteración desapareció en el grupo de ratas tratadas simultáneamente con LC. Todo ello nos lleva a pensar que las ratas hipertensas podrían presentar una menor biodisponibilidad de LC a nivel renal (tanto por su menor síntesis como por alteraciones en su recaptación tubular), situación ésta que se ve mejorada tras el tratamiento con LC.

1.2. Modelo celular

La línea celular NRK-52E representa un modelo útil para el estudio de los procesos celulares y moleculares regulados por células epiteliales, así como para observar su reacción frente a diferentes estímulos que reproduzcan determinadas situaciones patológicas. Además, el uso de líneas celulares resulta óptimo para analizar exclusivamente el efecto de los factores humorales en el proceso fibrótico, sin la participación de la sobrecarga hemodinámica presente en los estudios con modelos *in vivo*.

En la bibliografía podemos encontrar numerosos estudios que utilizan la línea celular NRK-52E para dilucidar las vías moleculares implicadas en la fibrogénesis tras la estimulación de estas células con TGF- β_1 .¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ También, en un estudio llevado a cabo por Peng y col. en 2009,¹⁷⁷ se utiliza esta línea celular para mostrar cómo la fluorofenidona previene el aumento de síntesis de colágeno I inducido por Ang II, a través de mecanismos relacionados con la actividad de la enzima NADPH oxidasa. Recientemente, en un trabajo llevado a cabo por Chen y col.,¹⁷⁸ se muestra que las células NRK-52E estimuladas con TGF- β_1 presentan un aumento de la expresión de CTGF, y cómo el telmisartán (fármaco antagonista del SRA) previene este hecho a través de un efecto mediado por PPAR γ . Como se discute en el apartado 6 de esta sección, en nuestro estudio hemos usado esta línea celular para confirmar el efecto

antifibrótico de la LC y, de manera más específica, para demostrar la mediación del factor de transcripción PPAR γ en dicho efecto.

2. Capacidad antioxidante de la L-carnitina en la nefropatía hipertensiva

La elevación de las especies reactivas del oxígeno (ROS; ver apartado 1.3.1 de la sección Introducción) en la hipertensión es una consecuencia tanto de su síntesis como de la disminución de su degradación por el sistema antioxidante. En este estudio se muestra la capacidad antioxidante de la LC en la corteza renal de ratas hipertensas, lo cual podría estar mediado por la modulación de factores de transcripción implicados en la generación y/o disipación del estrés oxidativo. Nuestros resultados muestran que las actividades de las enzimas antioxidantes GPx y SOD están reducidas en las ratas tratadas con L-NAME con respecto al grupo control. Este efecto del L-NAME sobre el sistema antioxidante queda patente en un gran número de trabajos.^{166,179,180} Por el contrario, la actividad de la enzima GR se ve aumentada en ratas hipertensas, coincidiendo con lo observado por Cediel y col.¹⁸¹ en el hígado de ratas genéticamente hipertensas (*spontaneously hypertensive rats*, SHR). Las ratas tratadas con L-NAME suelen presentar una relación entre el glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG) menor que las ratas normotensas,^{88,181-183} probablemente debido al alto grado de estrés oxidativo presente en las primeras. Dado que la enzima GR es regulada por el balance entre GSH/GSSH, esto podría explicar por qué la actividad de esta enzima está aumentada en las ratas tratadas con L-NAME. Como se ha indicado anteriormente, el tratamiento crónico con la LC en las ratas tratadas con L-NAME fue capaz de prevenir todas las variaciones que se observan en el sistema antioxidante, restaurando los valores de actividad a los observados en el grupo de ratas control. Este efecto de la LC sobre el sistema antioxidante se ha observado con anterioridad en hepatocitos humanos tratados con H₂O₂, en un estudio llevado a cabo por Li y col.¹⁴³ Este grupo de investigación mostró cómo el tratamiento con LC restauró la actividad de SOD en hepatocitos sometidos a estrés oxidativo, mejorando así la peroxidación lipídica observada en dichas células, y aumentando su viabilidad. Además, la suplementación con LC incrementó la actividad GPx en pacientes con enfermedad renal crónica.¹⁸⁴ Para explicar los cambios observados en las actividades de las diferentes enzimas antioxidantes, realizamos estudios de expresión proteica y génica, y los resultados presentaron patrones similares, indicando que los cambios funcionales observados en

las actividades enzimáticas son debidos a alteraciones de su expresión génica y proteica. Existe abundante literatura que muestra la capacidad de la LC para restaurar el sistema antioxidante en diferentes modelos experimentales,^{92,113,143,185} pero nuestro trabajo muestra por primera vez la capacidad de la LC para combatir el estrés oxidativo en la nefropatía hipertensiva. Recientemente se ha sugerido que la suplementación con LC mejora la actividad antioxidante en sujetos sanos. Concretamente, en un estudio realizado por Cao y col.,¹⁸⁶ se muestra cómo la administración de 2 gramos diarios de LC a sujetos sanos, fue capaz de aumentar la concentración plasmática de la SOD y GPx, mejorando así la capacidad antioxidante en estos individuos.

La enzima NADPH oxidasa, como se ha descrito con anterioridad, es la principal fuente de radicales libres del sistema cardiovascular y renal. Esta enzima está altamente relacionada con la fisiopatología de la HTA, y su actividad se ha mostrado elevada tanto en pacientes hipertensos¹⁸⁷ como en modelos experimentales de HTA.^{162,188} Estos datos concuerdan con nuestros resultados en el riñón de ratas tratadas con L-NAME, en las que encontramos una elevación significativa de los valores de actividad NADPH oxidasa, así como un aumento en la cantidad de $O_2^{\cdot-}$ a nivel renal. Además, estas ratas presentaron alteraciones en la expresión génica y proteica de las diferentes subunidades de la NADPH oxidasa. El tratamiento con LC revirtió todos estos parámetros hasta alcanzar valores normales, lo que demuestra que, además de la normalización de las enzimas antioxidantes, el efecto antioxidante de la LC en corteza renal está también mediado por su capacidad para regular la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa y la actividad de esta enzima. Estos datos están en consonancia con lo observado por nuestro grupo de investigación en el corazón de ratas hipertensas tras el tratamiento crónico con LC.^{92,183} En un estudio llevado a cabo en pacientes sometidos a cirugía abdominal, el tratamiento con LC redujo los niveles de la subunidad NOX2 a nivel plaquetario, modulando así los niveles circulantes de ROS y mejorando el estado oxidativo de estos pacientes.¹¹³

Si bien es cierto que existe una gran cantidad de resultados que muestran los efectos antioxidantes de la suplementación con LC, los mecanismos de acción al respecto continúan siendo un misterio. Es bien sabido que un aumento de las ROS desencadena multitud de vías sensibles a redox; tal es el caso de los factores de transcripción NF- κ B y Nrf-2. Como mencionamos en el apartado 1.3.4 de la sección Introducción, la actividad de Nrf-2 se ha relacionado con un aumento de la expresión génica de las enzimas del

sistema antioxidante, mientras que la activación de NF- κ B promueve la expresión génica de enzimas proinflamatorias (apartado 1.4 de la sección Introducción). Además, la elevación de ROS provoca un aumento en la expresión génica de NF- κ B,^{25,36,37,44} mientras que la expresión génica de Nrf-2 se ve afectada negativamente con el aumento del estrés oxidativo. También se ha sugerido que la activación de NF- κ B trae como consecuencia una inhibición en la expresión génica de Nrf-2.¹⁸⁹ Estos hallazgos están en consonancia con nuestros resultados en corteza renal de ratas hipertensas, en las que se aprecia una elevación importante en la expresión génica de NF- κ B, y una disminución en la expresión génica del factor Nrf-2. El tratamiento con la LC revirtió ambos parámetros a cifras normales, mostrando como los efectos beneficiosos de la LC están en parte mediados por su acción sobre estas vías moleculares.

La biodisponibilidad de NO tiene un papel fundamental en el desarrollo del estrés oxidativo. Como hemos comentado anteriormente, en nuestro modelo experimental existe una disminución en la biodisponibilidad de NO por la administración de L-NAME, lo que causa vasoconstricción, aumento en la concentración de ROS y desarrollo de elevadas cifras de presión arterial. El hecho de que el tratamiento con la LC mejore los valores de presión arterial y el estado oxidativo renal en ratas tratadas con L-NAME sugiere que la LC está, al menos en parte, realizando su acción mediante un incremento en la biodisponibilidad del NO. En efecto, cuando determinamos los niveles de NO en corteza renal, comprobamos que existe una normalización de estos valores en las ratas hipertensas tratadas con LC. Este efecto puede deberse a la disminución de los niveles de anión superóxido y/o al aumento de la expresión de la enzima eNOS observado en estos animales. En un estudio llevado a cabo por Pechanova y Simko,²⁵ se pone de manifiesto que, para contrarrestar el aumento de la presión arterial generado por el L-NAME, no es suficiente con disminuir las ROS, sino que además es necesario favorecer la síntesis de NO. Por lo tanto, podemos añadir que el tratamiento con LC está ejerciendo algo más que un efecto antioxidante: está favoreciendo la síntesis de NO gracias a la regulación de la enzima responsable de su síntesis. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos por los cuales la LC provoca este aumento en la expresión génica de eNOS.

3. Capacidad antiinflamatoria de la L-carnitina en la nefropatía hipertensiva

Aparte del aumento de estrés oxidativo, el modelo experimental de hipertensión arterial que hemos seleccionado para llevar a cabo el presente estudio se caracteriza por presentar inflamación renal.^{162,190} Así, las ratas hipertensas del presente estudio presentan altos niveles de expresión génica para las interleukinas proinflamatorias IL-6 e IL-1 β a nivel renal, así como una disminución en la expresión génica de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Estos resultados coinciden con los observados por otros grupos de investigación en el riñón y plasma de ratas SHR,^{83,191-193} y por nuestro grupo de investigación en el corazón y plasma de diferentes modelos de ratas hipertensas.^{129,194}

Cuando la LC fue administrada a las ratas hipertensas, se observó una disminución en cuanto a la expresión génica de IL-6 e IL-1 β , así como un aumento en la expresión génica de IL-10, volviendo los valores de estas citoquinas a la normalidad y sugiriendo un efecto antiinflamatorio de la LC a nivel renal. Estos hallazgos concuerdan con los observados en anteriores investigaciones, donde se muestra el efecto antiinflamatorio de la LC a nivel sistémico y cardíaco.^{88,129,195} En un estudio realizado en ratas con cáncer, el tratamiento con 250 mg de LC /kg/día trajo consigo una mejora en el estado de caquexia observado en estos animales, y los autores asociaron este efecto beneficioso de la LC a la reducción de los niveles plasmáticos de citoquinas y consiguiente mejora del estado inflamatorio.¹⁹⁶

Al igual que ocurre con el estrés oxidativo, el efecto antiinflamatorio de la LC parece estar mediado, al menos en parte, por el factor de transcripción NF- κ B, factor clave para el desarrollo de la inflamación. Existen varios trabajos que apoyan esta teoría.^{197,198} Así, en un estudio reciente realizado por Ozkan y col.,¹⁹⁹ se muestra cómo el tratamiento con la LC reduce la actividad NF- κ B en macrófagos de ratón estimulados con lipopolisacárido.

4. Capacidad antifibrótica de la L-carnitina en la nefropatía hipertensiva

Existe abundante literatura que muestra las alteraciones estructurales y funcionales que la HTA causa a nivel renal en diferentes modelos animales de experimentación.^{68,200} Estas alteraciones pueden dirigir a la generación de fibrosis y, eventualmente, al desarrollo de fallo renal de consecuencias fatales. En lo que respecta a nuestro modelo experimental, diferentes autores han puesto de manifiesto el desarrollo de fibrosis renal en ratas tratadas con L-NAME.^{78,165,169,201} Coincidiendo con estos estudios, nuestras ratas hipertensas presentan un incremento en el área de fibrosis, tanto a nivel tubulointersticial como a nivel mesangial, junto con una reducción significativa del área corpuscular. La presencia de estos cambios estructurales fue acompañada por cambios en la expresión génica de Col I y Col III. La asociación entre el grado de fibrosis y el aumento en la expresión de TGF β_1 es un hecho aceptado,^{60,61,63,65,74} de forma más concreta, el TGF β_1 se ha relacionado con la fibrogénesis renal ligada a la HTA, tanto en ratas SHR,²⁰² como en ratas tratadas con L-NAME.^{164,168,169}

Nuestras ratas hipertensas tratadas con LC mostraron una clara reducción en el grado de fibrosis, tanto a nivel mesangial como a nivel tubulointersticial, además de una reducción en la expresión génica y proteica de los marcadores profibróticos. De este modo, este estudio muestra un papel antifibrótico y nefroprotector de la LC en el riñón sometido a HTA, gracias a una reducción en la síntesis de Col I y III, a través de la acción de la LC sobre la vía del TGF β_1 . En un reciente estudio, Omori y col.²⁰³ describen el efecto antifibrótico de la LC en ratas con hipertensión e insuficiencia cardíaca con fracción de eyección preservada. En dicho estudio, el tratamiento con 390 mg de LC/kg/día, durante 17 semanas, fue capaz de restaurar los niveles cardíacos de componentes de la matriz extracelular hasta valores normales. Estos hallazgos concuerdan con lo observado por O'Brien y col.¹¹² en ratas con HTA generada por el tratamiento con acetato de desoxicorticosterona y sal (*DOCA-salt*). En este estudio, el tratamiento con LC redujo los altos depósitos de colágeno observados en ratas *DOCA-salt*, reduciendo así la hipertrofia ventricular y mejorando la función cardíaca en dichos animales.

5. Implicación del sistema renina angiotensina en el efecto mediado por la L-carnitina

Una gran cantidad de estudios, tanto en humanos como en modelos experimentales, han demostrado la participación del SRA en la fisiopatología involucrada en el desarrollo de la nefropatía hipertensiva (NH).^{3,5,7} Por esta razón, se considera el bloqueo de la producción de Ang II como una de las mejores dianas terapéuticas para el tratamiento de la NH.^{71,202} El tratamiento con L-NAME produce un aumento de la expresión génica de la ECA y de AT1, conduciendo de esta forma a un aumento en la síntesis y el efecto biológico de la Ang II a nivel renal.^{204,205} Como indicamos en el apartado 1.3.4 de la sección Introducción, esta activación del SRA trae consigo un aumento en la actividad de la enzima NADPH oxidasa, con el consiguiente aumento en la producción de ROS. Los resultados de nuestro estudio apoyan esta asociación, ya que nuestras ratas hipertensas presentan una mayor expresión génica de ECA y AT1 y, como consecuencia, una mayor actividad NADPH oxidasa. En el grupo de animales que recibieron un tratamiento simultáneo con L-NAME y LC, se estabilizaron los niveles de expresión génica de estos dos parámetros hasta valores similares a los controles, mostrando de esta forma que la LC también ejerce su acción nefroprotectora por medio de su acción sobre el SRA. Esta asociación entre LC y el SRA ha sido puesta de manifiesto con anterioridad por diferentes grupos de investigación, entre ellos el nuestro, a nivel cardiovascular.^{92,124,131}

6. Papel de la familia PPAR en el efecto mediado por la L-carnitina

Como anteriormente hemos mencionado, la familia de factores de transcripción PPAR, y en concreto sus miembros PPAR α y PPAR γ , están siendo altamente estudiados por su implicación en enfermedades cardiovasculares.^{48,206,207} En la última década, se ha sugerido una asociación entre la familia PPAR y la LC. Por un lado, existen trabajos que ponen de manifiesto la participación de miembros de la familia PPAR en la homeostasis de la LC. Así, en un estudio realizado por Wen y col.,¹³⁷ se muestra la relación entre PPAR γ y la expresión génica de enzimas que participan en la biosíntesis de la LC. Además, PPAR α ha mostrado estar involucrado en la regulación de la expresión génica del transportador OCTN2 en el intestino de ratas, ratones y humanos.^{132,136} Por otro

lado, tanto PPAR α como PPAR γ se han relacionado con la expresión de la enzima carnitina palmitoiltransferasa I (CPT I), regulando de este modo el paso de ácidos grasos de cadena larga al interior de la mitocondria (ver apartado 2.2 de la sección Introducción).^{139,140}

Además de todo lo mencionado anteriormente, existen teorías que apuntan que los efectos de la LC están mediados por la familia PPAR. En un estudio realizado en 2012 por Li y col.,¹⁴³ se muestra cómo el efecto antioxidante de LC en hepatocitos humanos expuestos a H₂O₂ está mediado por la acción de PPAR α . De la misma forma, otros trabajos han puesto de manifiesto la participación de la familia PPAR en los efectos antiapoptótico y cardioprotector de LC.^{141,142}

Por todo lo anteriormente expuesto, y teniendo en cuenta que la activación de los estos miembros de la familia PPAR ha mostrado tener efectos antifibróticos, antiinflamatorios y antioxidantes,^{48,49} nuestro grupo de investigación ha planteado la hipótesis de que los efectos nefroprotectores de la LC en la HTA podrían estar, al menos en parte, mediados por la acción de PPAR α y PPAR γ . Por ello hemos determinado la expresión génica de PPAR α y PPAR γ , y la expresión proteica de este último, en la corteza renal de nuestros 4 grupos experimentales. Los resultados mostraron una disminución significativa en la expresión de ambos miembros de la familia PPAR en las ratas hipertensas, y el tratamiento con LC restableció los valores a cifras normales.

Para profundizar en la relación existente entre el efecto antifibrótico de la LC y PPAR γ , realizamos por último un estudio *in vitro*, en el cual tratamos células NRK-52E con un inhibidor de PPAR γ (GW9662), estimulando dichas células a continuación con el agente profibrótico TGF- β ₁. En estas condiciones, el tratamiento con LC no fue capaz de revertir el grado de fibrosis en células tratadas con 100 μ M de GW9662, lo que demuestra que PPAR γ está actuando como mediador en el efecto antifibrótico de la LC. De hecho, esta relación entre los efectos de la LC y la familia PPAR ha sido también puesta de manifiesto por Chao y col.¹³¹ en fibroblastos cardiacos, donde el tratamiento con la LC redujo la proliferación generada por el tratamiento con Ang II, y todo ello por un efecto mediado por PPAR α .

CONCLUSIONES

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

1. El tratamiento crónico con L-carnitina previene la hipertrofia y pérdida de función renal observada en ratas tratadas con L-NAME.
2. La suplementación con L-carnitina ejerce un efecto antioxidante en el riñón de ratas tratadas con L-NAME. Esta acción es debida, por un lado, a la capacidad de la L-carnitina para restaurar la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, GPx y GR), y, por otro lado, a la capacidad de la L-carnitina para evitar el aumento de ROS asociado a la hiperactividad de la enzima NADPH oxidasa, regulando la expresión génica de las subunidades que conforman dicha enzima, todo ello con la mediación de los factores de transcripción Nrf-2 y NF- κ B.
3. El tratamiento crónico con L-carnitina produce un efecto antiinflamatorio en el riñón de ratas tratadas con L-NAME, reduciendo el aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias observada en estos animales. La L-carnitina ejerce esta acción mediante la regulación de la expresión génica del factor de transcripción NF- κ B.
4. La administración de L-carnitina previene el desarrollo de fibrosis renal asociado al tratamiento con L-NAME, reduciendo la expresión génica y proteica de las citoquinas profibróticas TGF- β y CTGF. Además, los estudios realizados *in vitro*, en células renales NRK-52E, demuestran que el efecto antifibrótico de la L-carnitina está mediado por el factor de transcripción nuclear PPAR γ .
5. En el efecto nefroprotector de la L-carnitina juega un papel muy importante el sistema renina angiotensina, normalizándose los valores de sus componentes enzima convertidora de angiotensina (ECA) y receptor AT1 de angiotensina II.

BIBLIOGRAFÍA

1. Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F, de la Cruz Troca JJ, Guallar-Castillon P, del Rey Calero J. Blood pressure in Spain: Distribution, awareness, control, and benefits of a reduction in average pressure. *Hypertension*. 1998;32(6):998-1002.
2. Banegas JR, Rodriguez-Artalejo F, Ruilope LM, et al. Hypertension magnitude and management in the elderly population of Spain. *J Hypertens*. 2002;20(11):2157-2164.
3. Tylicki L, Rutkowski B, Horl WH. Multifactorial determination of hypertensive nephroangiosclerosis. *Kidney Blood Press Res*. 2002;25(6):341-353.
4. Mancia G, De Backer G, Dominiczak A, et al. ESH/ESC 2007 guidelines for the management of arterial hypertension. *Rev Esp Cardiol*. 2007;28:1462-1536.
5. Palm F, Nordquist L. Renal oxidative stress, oxygenation, and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;301(5):R1229-41.
6. Whitworth JA. Progression of renal failure -- the role of hypertension. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*. 2005;34(1):8-15.
7. Toto RD. Lessons from the African-American study of kidney disease and hypertension: An update. *Curr Hypertens Rep*. 2006;8(5):409-412.
8. Wright JT, Jr, Kusek JW, Toto RD, et al. Design and baseline characteristics of participants in the African American study of kidney disease and hypertension (AASK) pilot study. *Control Clin Trials*. 1996;17(4 Suppl):3S-16S.
9. Schlessinger SD, Tankersley MR, Curtis JJ. Clinical documentation of end-stage renal disease due to hypertension. *Am J Kidney Dis*. 1994;23(5):655-660.
10. Bello AK, Hemmelgarn B, Lloyd A, et al. Associations among estimated glomerular filtration rate, proteinuria, and adverse cardiovascular outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(6):1418-1426.
11. Bleyer AJ, Appel RG. Risk factors associated with hypertensive nephrosclerosis. *Nephron*. 1999;82(3):193-198.
12. Ozbek E. Induction of oxidative stress in kidney. *Int J Nephrol*. 2012;2012:1-9.
13. Behl C. Brain aging and late-onset Alzheimer's disease: Many open questions. *Int Psychogeriatr*. 2012;24 Suppl 1:S3-9.
14. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: Updating a personal view. *Nutr Rev*. 2012;70(5):257-265.
15. Selman C, Blount JD, Nussey DH, Speakman JR. Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: Where now? *Trends Ecol Evol*. 2012;27(10):570-577.
16. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004;142(2):231-255.
17. 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.
18. Brandes RP, Takac I, Schroder K. No superoxide--no stress?: Nox4, the good NADPH oxidase! *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(6):1255-1257.
19. Wardman P, Candeias LP. Fenton chemistry: An introduction. *Radiat Res*. 1996;145(5):523-531.

20. Kehrer JP. The haber-weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 2000;149(1):43-50.
21. Kalinowski L, Malinski T. Endothelial NADH/NADPH-dependent enzymatic sources of superoxide production: Relationship to endothelial dysfunction. *Acta Biochim Pol*. 2004;51(2):459-469.
22. Onozato ML AT. Role of NADHP oxidase in hypertension and diabetic nephropaty. *Curr Hypertens Rev*. 2005;1:15-20.
23. Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829-37.
24. Dikalova AE, Gongora MC, Harrison DG, Lambeth JD, Dikalov S, Griendling KK. Upregulation of Nox1 in vascular smooth muscle leads to impaired endothelium-dependent relaxation via eNOS uncoupling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(3):H673-9.
25. Pechanova O, Simko F. Chronic antioxidant therapy fails to ameliorate hypertension: Potential mechanisms behind. *J Hypertens Suppl*. 2009;27(6):S32-6.
26. Greiber S, Munzel T, Kastner S, Muller B, Schollmeyer P, Pavenstadt H. NAD(P)H oxidase activity in cultured human podocytes: Effects of adenosine triphosphate. *Kidney Int*. 1998;53(3):654-663.
27. San Jose G, Fortuno A, Beloqui O, Diez J, Zalba G. NADPH oxidase CYBA polymorphisms, oxidative stress and cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond)*. 2008;114(3):173-182.
28. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87(1):245-313.
29. Opitz N, Drummond GR, Selemidis S, Meurer S, Schmidt HH. The 'A's and 'O's of NADPH oxidase regulation: A commentary on "subcellular localization and function of alternatively spliced Noxo1 isoforms". *Free Radic Biol Med*. 2007;42(2):175-179.
30. Montezano AC, Burger D Ceravolo G,S., Ceravolo GS, Yusuf H, Montero M Touyz R,M., Touyz RM. Novel nox homologues in the vasculature: Focusing on Nox4 and Nox5. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2011;120(4):131-41.
31. Gorin Y, Ricono JM, Kim NH, Bhandari B, Choudhury GG, Abboud HE. Nox4 mediates angiotensin II-induced activation of akt/protein kinase B in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(2):F219-29.
32. Massey KJ, Hong NJ, Garvin JL. Angiotensin II stimulates superoxide production in the thick ascending limb by activating NOX4. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;303(7):C781-9.
33. Zhai L, Ballinger SW, Messina JL. Role of reactive oxygen species in injury-induced insulin resistance. *Mol Endocrinol*. 2011;25(3):492-502.
34. Serrander L, Cartier L, Bedard K, et al. NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation. *Biochem J*. 2007;406(1):105-114.
35. 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.
36. Touyz RM. Recent advances in intracellular signalling in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2003;12(2):165-174.
37. Navar LG, Prieto MC, Satou R, Kobori H. Intrarenal angiotensin II and its contribution to the genesis of chronic hypertension. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11(2):180-186.
38. Zhuo JL, Li XC. New insights and perspectives on intrarenal renin-angiotensin system: Focus on intracrine/intracellular angiotensin II. *Peptides*. 2011;32(7):1551-1565.

39. Brandes RP. A new PIXel in the puzzle: How increased vascular pressure induces oxidative stress. *Hypertension*. 2009;54(5):964-965.
40. Vecchione C, Carnevale D, Di Pardo A, et al. Pressure-induced vascular oxidative stress is mediated through activation of integrin-linked kinase 1/betaPIX/rac-1 pathway. *Hypertension*. 2009;54(5):1028-1034.
41. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95.
42. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(1-2):269-285.
43. Yan Y, Wei CL, Zhang WR, Cheng HP, Liu J. Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacol Sin*. 2006;27(7):821-826.
44. Liao TD, Yang XP, Liu YH, et al. Role of inflammation in the development of renal damage and dysfunction in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*. 2008;52(2):256-263.
45. Hu C, Dandapat A, Sun L, et al. Regulation of TGFbeta1-mediated collagen formation by LOX-1: Studies based on forced overexpression of TGFbeta1 in wild-type and lox-1 knock-out mouse cardiac fibroblasts. *J Biol Chem*. 2008;283(16):10226-10231.
46. Tan RJ, Liu Y. Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;302(11):F1351-61.
47. Brigelius-Flohe R, Flohe L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(8):2335-2381.
48. Yousefipour Z, Oyekan A, Newaz M. Interaction of oxidative stress, nitric oxide and peroxisome proliferator activated receptor gamma in acute renal failure. *Pharmacol Ther*. 2010;125(3):436-445.
49. Sugawara A, Uruno A, Kudo M, Matsuda K, Yang CW, Ito S. Effects of PPARgamma on hypertension, atherosclerosis, and chronic kidney disease. *Endocrine journal*. 2010;57(10):847-52.
50. Gao Z, Li YH. Antioxidant stress and anti-inflammation of PPARalpha on warm hepatic ischemia-reperfusion injury. *PPAR Res*. 2012;2012:738-785.
51. Hong KM, Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Strieter RM. Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor-beta and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*. 2007;282(31):22910-22920.
52. Millar JS. Novel benefits of peroxisome proliferator-activated receptors on cardiovascular risk. *Curr Opin Lipidol*. 2013; 24(3):233-8.
53. Kawai T, Masaki T, Doi S, et al. PPAR-gamma agonist attenuates renal interstitial fibrosis and inflammation through reduction of TGF-beta. *Lab Invest*. 2009;89(1):47-58.
54. Balakumar P, Kadian S, Mahadevan N. Are PPAR alpha agonists a rational therapeutic strategy for preventing abnormalities of the diabetic kidney? *Pharmacol Res*. 2012;65(4):430-436.
55. Toyozaki T, Hiroe M, Tanaka M, Nagata S, Ohwada H, Marumo F. Levels of soluble fas ligand in myocarditis. *Am J Cardiol*. 1998;82(2):246-248.
56. Morillas P, de Andrade H, Castillo J, et al. Inflammation and apoptosis in hypertension. relevance of the extent of target organ damage. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2012;65(9):819-825.

57. Therrien FJ, Agharazii M, Lebel M, Lariviere R. Neutralization of tumor necrosis factor-alpha reduces renal fibrosis and hypertension in rats with renal failure. *Am J Nephrol.* 2012;36(2):151-161.
58. Harrison DG, Marvar PJ, Titze JM. Vascular inflammatory cells in hypertension. *Front Physiol.* 2012;3:128.
59. Montecucco F, Pende A, Quercioli A, Mach F. Inflammation in the pathophysiology of essential hypertension. *J Nephrol.* 2011;24(1):23-34.
60. Barnes JL, Gorin Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: Role of NAD(P)H oxidases. *Kidney Int.* 2011;79(9):944-956.
61. Chuang PY, Menon MC, He JC. Molecular targets for treatment of kidney fibrosis. *J Mol Med (Berl).* 2012. 91(5):549-59
62. Chatziantoniou C, Boffa JJ, Tharaux PL, Flamant M, Ronco P, Dussaule JC. Progression and regression in renal vascular and glomerular fibrosis. *Int J Exp Pathol.* 2004;85(1):1-11.
63. Pohlers D, Brenmoehl J, Loffler I, et al. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(8):746-756.
64. Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(12):684-696.
65. Harris RC, Neilson EG. Toward a unified theory of renal progression. *Annu Rev Med.* 2006;57:365-380.
66. Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(2):212-222.
67. Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res.* 2010. 11;106(11):1675-80.
68. Zhao W, Chen SS, Chen SS, Chen YA, Ahokas R, Sun Y. Kidney fibrosis in hypertensive rats: Role of oxidative stress. *Am Journal Nephrol.* 2008;28(4):548-54.
69. Zeisberg M, Bonner G, Maeshima Y, et al. Renal fibrosis: Collagen composition and assembly regulates epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Am J Pathol.* 2001;159(4):1313-1321.
70. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(1):a004978.
71. Wolf G. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int.* 2006;70(11):1914-1919.
72. Mehta JL, Attramadal H. The TGFbeta superfamily in cardiovascular biology. *Cardiovasc Res.* 2007;74(2):181-183.
73. Jain M, Rivera S, Monclus EA, et al. Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem.* 2013;288(2):770-777.
74. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 2):217-224.
75. Lan HY. Diverse roles of TGF-beta/smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci.* 2011;7(7):1056-1067.
76. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 2003;425(6958):577-584.

77. Qi W, Twigg S, Chen X, et al. Integrated actions of transforming growth factor-beta1 and connective tissue growth factor in renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288(4):F800-9.
78. Yang F C, Arthur CK, Chung AC, Huang XR, Lan HY. Angiotensin II induces connective tissue growth factor and collagen I expression via transforming growth factor-beta-dependent and -independent smad pathways: The role of Smad3. *Hypertension*. 2009;34(1)(0194-911):8-15.
79. Daniels A, van Bilsen M, Goldschmeding R, van der Vusse GJ, van Nieuwenhoven FA. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009;195(3):321-338.
80. Reifenberg K, Cheng F, Orning C, et al. Overexpression of TGF-ss1 in macrophages reduces and stabilizes atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice. *PLoS One*. 2012;7(7):e40990.
81. Jia L, Jin H, Zhou J, et al. A potential anti-tumor herbal medicine, corilagin, inhibits ovarian cancer cell growth through blocking the TGF-beta signaling pathways. *BMC Complement Altern Med*. 2013;13(1):33.
82. Yano S, Li C, Pavlova Z. The transforming growth factor-beta signaling pathway involvement in cardiovascular lesions in mucopolysaccharidosis-I. *JIMD Rep*. 2013;7:55-58.
83. Miana M, de Las Heras N, Rodriguez C, et al. Effect of eplerenone on hypertension-associated renal damage in rats: Potential role of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR-gamma). *J Physiol Pharmacol*. 2011;62(1):87-94.
84. Martin MM, Buckenberger JA, Jiang J, et al. TGF-beta1 stimulates human AT1 receptor expression in lung fibroblasts by cross talk between the smad, p38 MAPK, JNK, and PI3K signaling pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293(3):L790-9.
85. Miguel-Carrasco JL, Baltanas A, Cebrian C, et al. Blockade of TGF-beta 1 signalling inhibits cardiac NADPH oxidase overactivity in hypertensive rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:726940.
86. 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.
87. Fritz IB, Arrigoni-Martelli E. Sites of action of carnitine and its derivatives on the cardiovascular system: Interactions with membranes. *Trends Pharmacol Sci*. 1993;14(10):355-360.
88. Mate A, Miguel-Carrasco JL, Monserrat MT, Vazquez CM. Systemic antioxidant properties of L-carnitine in two different models of arterial hypertension. *J Physiol Biochem*. 2010;66(2):127-136.
89. Ringseis R, Keller J, Eder K. Role of carnitine in the regulation of glucose homeostasis and insulin sensitivity: Evidence from in vivo and in vitro studies with carnitine supplementation and carnitine deficiency. *Eur J Nutr*. 2012;51(1):1-18.
90. Rebouche CJC. Kinetics, pharmacokinetics, and regulation of L-carnitine and acetyl-L-carnitine metabolism. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1033:30-41.
91. Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J, Willcox MD, Garrett Q. Role of carnitine in disease. *Nutr Metab (Lond)*. 2010; 16:7-30.
92. 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.

93. Tamai II, Ohashi RR, Nezu JIJ, et al. Molecular and functional characterization of organic cation/carnitine transporter family in mice. *J Biol Chem*. 2000;275(51):40064-40072.
94. Marzo AA, Curti SS. L-carnitine moiety assay: An up-to-date reappraisal covering the commonest methods for various applications. *J Chromatogr*. 1997;702(1-2):1-20.
95. Sgambat K, Frank L, Ellini A, Sable C, Moudgil A. Carnitine supplementation improves cardiac strain rate in children on chronic hemodialysis. *Pediatr Nephrol*. 2012;27(8):1381-1387.
96. Foster DW. The role of the carnitine system in human metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;42(11):941-67.
97. Mingrone G, Greco AV, Capristo E, et al. L-carnitine improves glucose disposal in type 2 diabetic patients. *J Am Coll Nutr*. 1999;18(1):77-82.
98. Evans A, Fornasini G. Pharmacokinetics of L-carnitine. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(11):941-67.
99. Crill CM, Helms RA. The use of carnitine in pediatric nutrition. *Nutr Clin Pract*. 2007;22(2):204-213.
100. Magoulas PL, El-Hattab AW. Systemic primary carnitine deficiency: An overview of clinical manifestations, diagnosis, and management. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7(1):68.
101. Rasmussen J, Nielsen OW, Lund AM, Kober L, Djurhuus H. Primary carnitine deficiency and pivalic acid exposure causing encephalopathy and fatal cardiac events. *J Inherit Metab Dis*. 2012;36(1):35-41.
102. Cuturic M, Abramson RK, Moran RR, Hardin JW. Carnitine and metabolic correlates in hospitalized psychiatric patients: A follow-through report. *J Psychiatr Pract*. 2011;17(1):35-40.
103. Csiky B, Bene J, Wittmann I, Sulyok E, Meleg B. Effect of hemodialysis session on the dynamics of carnitine ester profile changes in L- Carnitine pretreated end-stage renal disease patients. *Int Urol Nephrol*. 2012. 45(3):847-55.
104. Kraft M, Kraft K, Gartner S, et al. L-carnitine-supplementation in advanced pancreatic cancer (CARPAN) - a randomized multicentre trial. *Nutr J*. 2012;11:52.
105. Szefel J, Kruszewski WJ, Ciesielski M, et al. L-carnitine and cancer cachexia. II. effects of lipid emulsion used in total parenteral nutrition on parameters of hemostasis and inflammatory state in L-carnitine deficiency in myocytes. *Oncol Rep*. 2012;28(1):324-329.
106. Fukusako T, Negoro K, Tsuda N, Kato M, Morimatsu M. A case of secondary carnitine deficiency due to anorexia nervosa and severe liver damage. *Rinsho Shinkeigaku*. 1995;35(1):34-37.
107. Ling P, Lee DJ, Yoshida EM, Sirrs S. Carnitine deficiency presenting with encephalopathy and hyperammonemia in a patient receiving chronic enteral tube feeding: A case report. *J Med Case Rep*. 2012;6(1):227.
108. Busquets S, Serpe R, Toledo M, et al. L-carnitine: An adequate supplement for a multi-targeted anti-wasting therapy in cancer. *Clin Nutr*. 2012;31(6):889-95.
109. Ramsay RR, Zammit VA. Carnitine acyltransferases and their influence on CoA pools in health and disease. *Mol Aspects Med*. 2004;25(5-6):475-493.
110. Mate AA, Miguel-Carrasco JLJ, Vázquez CMC. The therapeutic prospects of using L-carnitine to manage hypertension-related organ damage. *Drug Discov Today*. 2010;15(11-12):484-492.

111. Serati AR, Motamedi MR, Emami S, Varedi P, Movahed M, R. L-carnitine treatment in patients with mild diastolic heart failure is associated with improvement in diastolic function and symptoms. *Cardiology*. 2010;116(3):178-82.
112. O'Brien D, Chunduri P, Iyer A, Brown L. L-carnitine attenuates cardiac remodelling rather than vascular remodelling in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2010;106(4):296-301.
113. Pignatelli P, Tellan G, Marandola M, et al. Effect of L-carnitine on oxidative stress and platelet activation after major surgery. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2011;55(8):1022-1028.
114. Keller J, Ringseis R, Koc A, Lukas I, Kluge H, Eder K. Supplementation with L-carnitine downregulates genes of the ubiquitin proteasome system in the skeletal muscle and liver of piglets. *Animal*. 2012;6(1):70-8.
115. Gomez-Amores L, Mate A, Miguel-Carrasco JL, et al. L-carnitine attenuates oxidative stress in hypertensive rats. *J Nutr Biochem*. 2007;18(8):533-540.
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*. 2012.
117. 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):937-44.
118. Malaguarnera M, Vacante M, Motta M, et al. Acetyl-L-carnitine improves cognitive functions in severe hepatic encephalopathy: A randomized and controlled clinical trial. *Metab Brain Dis*. 2011;26(4):281-9.
119. Owen L, Sunram-Lea SI. Metabolic agents that enhance ATP can improve cognitive functioning: A review of the evidence for glucose, oxygen, pyruvate, creatine, and L-carnitine. *Nutrients*. 2011;3(8):735-755.
120. Fahmy A, F., El-hamamsya MH, Zakib OK, Badarya OA. L-carnitine supplementation improves the behavioral symptoms in autistic children. *Res Autism Spectr Disord*. 2011;7:159-166.
121. Cuturic M, Abramson RK, Moran RR, Hardin JW, Frank EM, Sellers AA. Serum carnitine levels and levocarnitine supplementation in institutionalized huntington's disease patients. *Neuro Sci*. 2012;34(1):93-8.
122. Brass EP. Carnitine and sports medicine: Use or abuse? *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1033:67-78.
123. Sahlin K. Boosting fat burning with carnitine: An old friend comes out from the shadow. *J Physiol (Lond)*. 2011;589(7):1509-1510.
124. Rajasekar P, Palanisamy N, Anuradha CV. Increase in nitric oxide and reductions in blood pressure, protein kinase C beta II and oxidative stress by L-carnitine: A study in the fructose-fed hypertensive rat. *Clinical and experimental hypertension (New York, N.Y.: 1993)*. 2007;29(8):517-30.
125. Ruggenenti P, Cattaneo D, Loriga G, et al. Ameliorating hypertension and insulin resistance in subjects at increased cardiovascular risk: Effects of acetyl-L-carnitine therapy. *Hypertension*. 2009;54(3):567-574.
126. Bueno R, Alvarez de Sotomayor M, Perez-Guerrero C, Gomez-Amores L, Vazquez CM, Herrera MD. L-carnitine and propionyl-L-carnitine improve endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: Different participation of NO and COX-products. *Life Sci*. 2005;77(17):2082-2097.

127. Cipolla MJ, Nicoloff A, Rebello T, Amato A, Porter JM. Propionyl-L-carnitine dilates human subcutaneous arteries through an endothelium-dependent mechanism. *J Vasc Surg.* 1999;29(6):1097-1103.
128. Famularo G, De Simone C. A new era for carnitine? *Immunol Today.* 1995;16(5):211-213.
129. Miguel-Carrasco JL, Mate A, Monserrat MT, Arias JL, Aramburu O, Vazquez CM. The role of inflammatory markers in the cardioprotective effect of L-carnitine in L-NAME-induced hypertension. *Am J Hypertens.* 2008;21(11):1231-1237.
130. Savica V, Calvani M, Benatti P, et al. Carnitine system in uremic patients: Molecular and clinical aspects. *Semin Nephrol.* 2004;24(5):464-468.
131. 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.
132. Ringseis R, Ludi S, Hirche F, Eder K. Treatment with pharmacological peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist clofibrate increases intestinal carnitine absorption in rats. *Pharmacol Res.* 2008;58(1):58-64.
133. Makowski L, Noland RC, Koves TR, et al. Metabolic profiling of PPARalpha^{-/-} mice reveals defects in carnitine and amino acid homeostasis that are partially reversed by oral carnitine supplementation. *FASEB J.* 2009;23:586-604.
134. Sharma S, Sun X, Rafikov R, et al. PPAR-gamma regulates carnitine homeostasis and mitochondrial function in a lamb model of increased pulmonary blood flow. *PLoS One.* 2012;7(9):e41555.
135. van Vlies N, Ferdinandusse S, Turkenburg M, Wanders RJ, Vaz FM. PPAR alpha-activation results in enhanced carnitine biosynthesis and OCTN2-mediated hepatic carnitine accumulation. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1767(9):1134-1142.
136. D'Argenio G, Petillo O, Margarucci S, et al. Colon OCTN2 gene expression is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in humans and mice and contributes to local and systemic carnitine homeostasis. *J Biol Chem.* 2010;285(35):27078-27087.
137. Wen G, Kuhne H, Rauer C, Ringseis R, Eder K. Mouse gamma-butyrobetaine dioxygenase is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha through a PPRE located in the proximal promoter. *Biochem Pharmacol.* 2011;82(2):175-183.
138. Wen G, Ringseis R, Rauer C, Eder K. The mouse gene encoding the carnitine biosynthetic enzyme 4-N-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1819(5):357-365.
139. Song S, Attia RR, Connaughton S, et al. Peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha) and PPAR gamma coactivator (PGC-1alpha) induce carnitine palmitoyltransferase IA (CPT-1A) via independent gene elements. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;325(1-2):54-63.
140. Laghezza A, Pochetti G, Lavecchia A, et al. New 2-(aryloxy)-3-phenylpropanoic acids as peroxisome proliferator-activated receptor alpha/gamma dual agonists able to upregulate mitochondrial carnitine shuttle system gene expression. *J Med Chem.* 2013;56(1):60-72.
141. Chen HH, Sue YM, Chen CH, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha plays a crucial role in L-carnitine anti-apoptosis effect in renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(10):3042-9.

142. Jing L, Zhou LJ, Zhang FM, et al. Carnitine regulates myocardial metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) in alcoholic cardiomyopathy. *Medical science monitor*. 2011;17(1):BR1-9.
143. Li JL, Wang QY, Luan HY, Kang ZC, Wang CB. Effects of L-carnitine against oxidative stress in human hepatocytes: Involvement of peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Biomed Sci*. 2012;19:32-0127-19-32.
144. Pesce V, Nicassio L, Fracasso F, Musicco C, Cantatore P, Gadaleta MN. Acetyl-L-carnitine activates the peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivators PGC-1 α /PGC-1 β -dependent signaling cascade of mitochondrial biogenesis and decreases the oxidized peroxiredoxins content in old rat liver. *Rejuvenation Res*. 2012;15(2):136-139.
145. Seelig HP. The jaffé reaction with creatinine. Reaction product and general reaction conditions. *Z Klin Chem Klin Biochem*. 1969;7(6):581-5.
146. Murray R. L., Kaplan A. Creatinine. *Clin Chem*. 1984;418(418):1261-1226.
147. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1974. 7;72:248-54.
148. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*. 1990;9(6):515-540.
149. Jentsch AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(2):251-256.
150. Griess P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. weselsky und benedikt "Ueber einige azoverbindungen.". *Chem. Ber*. 1879;12:426-8.
151. Camera E, Picardo M. Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;781(1-2):181-206.
152. Carlberg I, Mannervik B. Purification by affinity chromatography of yeast glutathione reductase, the enzyme responsible for the NADPH-dependent reduction of the mixed disulfide of coenzyme A and glutathione. *Biochim Biophys Acta*. 1977;484(2):268-274.
153. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*. 1967;70(1):158-169.
154. Austin L, Arthur H, de Niese M, Gurusinge A, Baker MS. Micromethods in single muscle fibers. 2. determination of glutathione reductase and glutathione peroxidase. *Anal Biochem*. 1988;174(2):575-579.
155. Baltanas A, Miguel-Carrasco JL, San Jose G, et al. A synthetic peptide from transforming growth factor- β type III receptor inhibits NADPH oxidase and prevents oxidative stress in the kidney of spontaneously hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal*. 2013. [Epub ahead of print]
156. Leesnitzer LM, Parks DJ, Bledsoe RK, et al. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry*. 2002;41(21):6640-6650.
157. Dornas W.C. SME. Animal models for the study of arterial hypertension. *J Biosci*. 2011;36(4):731-737.
158. Cachofeiro V, Maeso R, Munoz-Garcia R, Lahera V. The potential role of nitric oxide in angiotensin II-receptor blockade. *Blood Press Suppl*. 1996;2:29-35.

159. Jover B, Mimran A. Nitric oxide inhibition and renal alterations. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001;38 Suppl 2:S65-70.
160. Rodriguez-Gomez I, Wangenstein R, Atucha NM, et al. Effects of omapatrilat on blood pressure and renal injury in L-NAME and L-NAME plus DOCA-treated rats. *Am J Hypertens*. 2003;16(1):33-38.
161. Kurus M, Esrefoglu M, Bay A, Ozturk F. Protective effect of oral L-arginine supplementation on cyclosporine induced nephropathy in rats. *Int Urol Nephrol*. 2005;37(3):587-594.
162. Gomez-Guzman M, Jimenez R, Sanchez M, et al. Chronic (-)-epicatechin improves vascular oxidative and inflammatory status but not hypertension in chronic nitric oxide-deficient rats. *Br J Nutr*. 2011;106(9):1337-1348.
163. Rajasekar P, Viswanathan P, Anuradha CV. Renoprotective action of L-carnitine in fructose-induced metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*. 2008;10(2):171-180.
164. Kashiwagi M, Shinozaki M, Hirakata H, et al. Locally activated renin-angiotensin system associated with TGF-beta1 as a major factor for renal injury induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(4):616-624.
165. Delle H, Rocha JR, Cavaglieri RC, Vieira JM, Jr, Malheiros DM, Noronha IL. Antifibrotic effect of tamoxifen in a model of progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(1):37-48.
166. Cardoso AM, Martins CC, Fiorin Fda S, et al. Physical training prevents oxidative stress in L-NAME-induced hypertension rats. *Cell Biochem Funct*. 2013;31(2):136-151.
167. Francois H, Placier S, Flamant M, et al. Prevention of renal vascular and glomerular fibrosis by epidermal growth factor receptor inhibition. *FASEB J*. 2004;18(7):926-928.
168. Takahashi T, Ono H, Ono Y, Ishimitsu T, Matsuoka H. Combination therapy with telmisartan and spironolactone alleviates L-NAME exacerbated nephrosclerosis with an increase in PPAR-gamma and decrease in TGF-beta(1). *Int Heart J*. 2007;48(5):637-647.
169. Ikeda H, Tsuruya K, Toyonaga J, et al. Spironolactone suppresses inflammation and prevents L-NAME-induced renal injury in rats. *Kidney Int*. 2009;75(2):147-155.
170. Aydogdu N, Atmaca G, Yalcin O, Taskiran R, Tastekin E, Kaymak K. Protective effects of L-carnitine on myoglobinuric acute renal failure in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33(1-2):119-124.
171. Ustundag S, Sen S, Yalcin O, Ciftci S, Demirkan B, Ture M. L-carnitine ameliorates glycerol-induced myoglobinuric acute renal failure in rats. *Ren Fail*. 2009;31(2):124-133.
172. Yurekli Y, Unak P, Yenisey C, Ertay T, Biber Muftuler FZ, Medine EI. L-carnitine protection against cisplatin nephrotoxicity in rats: Comparison with amifostin using quantitative renal tc 99m DMSA uptake. *Mol Imaging Radionucl Ther*. 2011;20(1):1-6.
173. Gomez-Amores L, Mate A, Vazquez CM. L-carnitine transport in kidney of normotensive, wistar-kyoto rats: Effect of chronic L-carnitine administration. *Pharm Res*. 2003;20(8):1133-1140.
174. Djamali A, Vidyasagar A, Adulla M, Hullett D, Reese S. Nox-2 is a modulator of fibrogenesis in kidney allografts. *Am J Transplant*. 2009;9(1):74-82.
175. Takakuta K, Fujimori A, Chikanishi T, et al. Renoprotective properties of pirfenidone in subtotaly nephrectomized rats. *Eur J Pharmacol*. 2010;629(1-3):118-124.
176. Zhou Q, Zeng R, Xu C, et al. Erbin inhibits TGF-beta1-induced EMT in renal tubular epithelial cells through an ERK-dependent pathway. *J Mol Med (Berl)*. 2012;90(5):563-574.

177. 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.
178. Chen Y, Luo Q, Xiong Z, Liang W, Chen L, Xiong Z. Telmisartan counteracts TGF-beta1 induced epithelial-to-mesenchymal transition via PPAR-gamma in human proximal tubule epithelial cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;5(6):522-529.
179. Oktem F, Kirbas A, Armagan A, et al. Lisinopril attenuates renal oxidative injury in L-NAME-induced hypertensive rats. *Mol Cell Biochem*. 2011;352(1-2):247-253.
180. Kumar S, Prahalathan P, Raja B. Syringic acid ameliorates (L)-NAME-induced hypertension by reducing oxidative stress. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2012;385(12):1175-1184.
181. Cediél E, Sanz-Rosa D, Oubina MP, et al. Effect of AT1 receptor blockade on hepatic redox status in SHR: Possible relevance for endothelial function? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285(3):R674-81.
182. Husain K, Hazelrigg SR. Oxidative injury due to chronic nitric oxide synthase inhibition in rat: Effect of regular exercise on the heart. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1587(1):75-82.
183. Gomez-Amores L, Mate A, Revilla E, Santa-Maria C, Vazquez CM. Antioxidant activity of propionyl-L-carnitine in liver and heart of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 2006;78(17):1945-1952.
184. Fatouros IG, Douroudos I, Panagoutsos S, et al. Effects of L-carnitine on oxidative stress responses in patients with renal disease. *Med Sci Sports Exerc*. 2010;42(10):1809-1818.
185. Síktar EE, Ekinci DD, Síktar EE, Beydemir SS, Gülçin II, Günay MM. Protective role of L-carnitine supplementation against exhaustive exercise induced oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol*. 2011;668(3):407-413.
186. Cao Y, Qu HJ, Li P, Wang CB, Wang LX, Han ZW. Single dose administration of L-carnitine improves antioxidant activities in healthy subjects. *Tohoku J Exp Med*. 2011;224(3):209-213.
187. Touyz RM, Schiffrin EL. Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: Role of phospholipase D-dependent NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens*. 2001;19(7):1245-1254.
188. Zalba G, Beaumont FJ, San Jose G, et al. Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2000;35(5):1055-1061.
189. Bolati D, Shimizu H, Yisireyli M, Nishijima F, Niwa T. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, downregulates renal expression of Nrf2 through activation of NF-kappaB. *BMC Nephrol*. 2013;4:14-56.
190. Girardi JM, Farias RE, Ferreira AP, Raposo NR. Rosuvastatin prevents proteinuria and renal inflammation in nitric oxide-deficient rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(8):1457-1462.
191. Sanz-Rosa D, Oubina MP, Cediél E, et al. Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: Role of NF-kappaB/IkappaB system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(1):H111-5.
192. Wang Y, Sun Z. Klotho gene delivery prevents the progression of spontaneous hypertension and renal damage. *Hypertension*. 2009;54(4):810-817.
193. Romero-Vasquez F, Chavez M, Perez M, et al. Overexpression of HGF transgene attenuates renal inflammatory mediators, Na(+)-ATPase activity and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(10):1590-1599.

194. Miguel-Carrasco JL, Zambrano S, Blanca AJ, Mate A, Vazquez CM. Captopril reduces cardiac inflammatory markers in spontaneously hypertensive rats by inactivation of NF- κ B. *J Inflamm (Lond)*. 2010;7:21-9255-7-21.
195. Calo LA, Davis PA, Pagnin E, et al. Carnitine-mediated improved response to erythropoietin involves induction of haem oxygenase-1: Studies in humans and in an animal model. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(3):890-895.
196. Laviano A, Molino A, Seelaender M, et al. Carnitine administration reduces cytokine levels, improves food intake, and ameliorates body composition in tumor-bearing rats. *Cancer Invest*. 2011;29(10):696-700.
197. Baek JE, Yang WS, Chang JW, et al. Fatty acid-bearing albumin induces VCAM-1 expression through c-src kinase-AP-1/NF- κ B pathways: Effect of L-carnitine. *Kidney Blood Press Res*. 2010;33(1):72-84.
198. Orlandi A, Francesconi A, Marcellini M, Di Lascio A, Spagnoli LG. Propionyl-L-carnitine reduces proliferation and potentiates bax-related apoptosis of aortic intimal smooth muscle cells by modulating nuclear factor- κ B activity. *J Biol Chem*. 2007;282(7):4932-4942.
199. Koc A, Ozkan T, Karabay AZ, Sunguroglu A, Aktan F. Effect of L-carnitine on the synthesis of nitric oxide in RAW 264.7 murine macrophage cell line. *Cell Biochem Funct*. 2011;29(8):679-685.
200. Hisaki R, Fujita H, Saito F, Kushiro T. Tempol attenuates the development of hypertensive renal injury in Dahl salt-sensitive rats. *Ame J Hypertens*. 2005;18(5 Pt 1):707-13.
201. Guerrot D, Dussaule JC, Mael-Ainin M, et al. Identification of periostin as a critical marker of progression/reversal of hypertensive nephropathy. *PLoS One*. 2012;7(3):e31974.
202. Ruiz-Ortega MF, Ruperez MF, Esteban VF, et al. Angiotensin II: A key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(1):16-20.
203. 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.
204. Rivera-Jardon FF, Castro-Moreno P, Figueroa-Guillen ES, Gallardo-Ortiz IA, Godinez-Hernandez D, Ibarra-Barajas M. Angiotensin II augments renal vasoconstriction via AT1 receptors in L-NAME-induced hypertensive rats. *Proc West Pharmacol Soc*. 2009;52:47-49.
205. Graciano ML, Cavaglieri Rde C, Delle H, et al. Intrarenal renin-angiotensin system is upregulated in experimental model of progressive renal disease induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(7):1805-1815.
206. Duan SZ, Usher MG, Mortensen RM. PPARs: The vasculature, inflammation and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2009;18(2):128-133.
207. Qin YW, Ye P, He JQ, Sheng L, Wang LY, Du J. Simvastatin inhibited cardiac hypertrophy and fibrosis in apolipoprotein E-deficient mice fed a "western-style diet" by increasing PPAR alpha and gamma expression and reducing TC, MMP-9, and cat S levels. *Acta Pharmacol Sin*. 2010;31(10):1350-1358.