
Universidad de Santiago de Compostela

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Medicina



**Efectos moleculares de los productos
finales de glicación avanzada en la célula
endotelial humana**

Memoria experimental que presenta para optar al grado de doctor en biología:

Bruno K. Rodiño Janeiro

Santiago de Compostela, 2011

ISBN 978-84-9887-764-9 (Edición digital PDF)

Portada: Imagen de microscopía confocal obtenida por inmunofluorescencia de HUVEC incubadas con anticuerpos anti-Nox4 (verde) y los núcleos marcados con TO-PRO[®] (Rojo).



DEPARTAMENTO DE MEDICINA

El doctor D. Ezequiel Álvarez Castro, investigador contratado de la Universidad de Santiago de Compostela y el profesor doctor José Ramón González Juanatey, Catedrático de Cardiología de la Universidad de Santiago de Compostela,

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral “Efectos moleculares de los productos finales de glicación avanzada en la célula endotelial humana” del Licenciado en Biología Molecular D. Bruno K. Rodiño Janeiro, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Medicina, Facultad de Medicina y Odontología, considerándola en condiciones para optar al Grado de Doctor y autorizándola para su defensa ante el Tribunal correspondiente.

Y para que conste, se expide el presente certificado en Santiago de Compostela, a 10 de Mayo de 2011.

Fdo. Dr Ezequiel Álvarez Castro

Fdo. Dr José R. González Juanatey

Agradecimientos

Antes de empezar a agradecer a los conocidos, tengo el deber de agradecer a todos los genios y fenómenos que han dado las pistas y las herramientas necesarias para que yo pudiera llegar a los resultados y conclusiones de esta tesis.

De entre los conocidos, empiezo agradeciendo a mis directores por darme la oportunidad de continuar en el negocio, guiarme en el trabajo, darme lugar y medios para este estudio y por enseñarme nuevas maneras de bailar.

A mi jefe, por que es de las mejores personas que conozco y además se le da bien luchar por causas perdidas (una de ellas soy yo).

A los compañeros de laboratorio, por todas las buenas horas que pasamos allí en el zulo, aunque bueno, antes de mudarnos allí ya eran grandes consejeros, amigos, risas y soportadores de mis disertaciones.

A todos los del IDIS por los encuentros pasilleros, los cafés, las comidas, los viernes pizza, los cumpleaños multitudinarios, las cañejas...ah! y por mantener vivo aquel sitio sin luz.

Al servicio de obstetricia, donde presencié el primer parto, y a las madres que, amablemente, han cedido los cordones umbilicales.

A las señoras de la limpieza, por que son fundamentales y por dejarme pisar los fregados sin darme con la escoba.

A los que compartimos la planta cero, espero que mantengamos el contacto para que haya más debates, risas y tardes sin jefes.

A los inolvidables e imprescindibles de la carrera, cinco años aguantándome y aún en contacto.

A los colegas de Ponte, por darme tantos buenos ratos durante más de 20 años y por estar ahí, siempre igual, aunque yo desaparezca algunas temporadas.

A mi familia por acompañarme desde siempre, invitarme a sus mesas, sus casas y sus momentos especiales. Además, es un placer ver como vamos creciendo.

A mis dos chicas especiales. La que me dejó un montón de tupperes con ideales, me vistió con una adecuada educación y me dejó un bonito álbum de recuerdos. Y la que es una digna sucesora, una mano al alcance y un futuro prometedor.

A todos los que, sin compartir ningún apellido conmigo, se han convertido en parte de mi familia, lejos del hogar. He compartido pisos, mesas, fiestas, películas, camas, vida...y que sea así por mucho más tiempo. Tan cómodo como en casa, así da gusto.

A los errores, metas no conseguidas, ciencia *fast food* y a los momentos tristes por enseñarme como se puede aprender, continuar, perfeccionar y ser feliz.

Estos agradecimientos, aunque no contienen ningún nombre, contienen los hechos por los que doy las gracias. A quién considere o sepa que se encuentra uno o varios de estos grupos, pues eso, muchísimas gracias.

Dedicada, por supuesto, a mi madre

Índice

Listado de abreviaturas.....	11
Introducción.....	17
La disfunción endotelial como origen de la enfermedad cardiovascular.....	17
Factores vasoconstrictores	18
Factores inflamatorios y de adhesión.....	18
Factores protrombóticos	20
Factores de crecimiento celular	20
Biodisponibilidad del óxido nítrico	21
Asociación entre la <i>diabetes mellitus</i> y la disfunción endotelial	23
Posibles mecanismos de las complicaciones vasculares diabéticas	27
Estrés oxidativo y diabetes	30
Fuentes de ROS	32
NADPH oxidasa y diabetes.....	36
Efectos del aumento de ROS.....	36
Proteínas con glicaciones no enzimáticas.....	37
Relación de los productos de Amadori con la disfunción endotelial	41
Productos de Amadori y estrés oxidativo: las NADPH oxidasas.....	44
Hipótesis y Objetivos	51
Material y métodos	55
Cultivo de HUVEC	55
Caracterización de las células endoteliales.....	56
Medida de la proliferación celular	56
Medida de ROS en HUVEC.....	57
Estudio del nivel de expresión mediante RT-PCR en tiempo real	59
Electroforesis en gel de agarosa	62
Inmunofluorescencia celular	62
Fraccionamiento de la proteína de núcleo y citoplasma	63
Estudio de las fracciones de proteínas del núcleo y el citoplasma mediante <i>Western Blot</i>	64
Cuantificación de proteína en medio de cultivo mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.	65
Fármacos y reactivos.....	65
Análisis estadístico	66
Resultados	69
Caracterización del modelo celular endotelial.....	69
Producción de ROS en HUVEC tratadas con albúmina glicada	73
Expresión de las subunidades de NADPH oxidasa en HUVEC tratadas con albúmina glicada	81
Rutas implicadas en el aumento de ROS por albúmina glicada	84
Estudio de los factores de transcripción implicados en el cambio de expresión de las subunidades de NADPH oxidasa en HUVEC	87
Papel de la eNOS en los cambios inducidos por la albúmina glicada en las HUVEC	91

La albúmina glicada en la producción de moléculas de adhesión y citocinas inflamatorias	95
Discusión.....	101
Resumen	101
Estudio del modelo endotelial.....	103
Producción de ROS en HUVEC tratadas con albúmina glicada	105
Expresión de las subunidades de NADPH oxidasa en HUVEC tratadas con albúmina glicada	111
Rutas implicadas en el aumento de ROS por albúmina glicada	113
Factores de transcripción implicados en la expresión de las subunidades de NADPH oxidasa.....	116
Papel de la óxido nítrico sintasa endotelial en los cambios inducidos por albúmina glicada en HUVEC	118
La albúmina glicada en la producción de moléculas de adhesión y citocinas inflamatorias	123
Estrés oxidativo, productos de Amadori y disfunción endotelial	126
Conclusiones.....	135
Bibliografía	139

Listado de abreviaturas

- 4-HNE: 4-hidroxi-2, 3-nonenal
- 8-OHdG: 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
- ADMA: Dimetil arginina asimétrica, del inglés *Asymmetric dimethylarginine*
- ADN: Ácido desoxiribonucleico
- AMPK: cinasa activada por AMP, del inglés *adenosine monophosphate*
- AP-1: proteína activadora, del inglés *activator protein-1*
- ARE: elementos de respuesta antioxidante, del inglés *antioxidant response element*
- ARN: Ácido ribonucleico
- BH₂: Dihidrobiopterina
- BH₃: Trihidrobiopterina
- BH₄: Tetrahidrobiopterina
- BSA: Albúmina sérica bovina, del inglés *Bovine serum albumin*
- CCD: carga acoplada, del inglés *charge-coupled device*
- CD: *Cluster of differentiation*
- cH₂-DCF-DA: 5(6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato
- CHOP: Proteína homóloga al C/EBP, del inglés *C/EBP-homologous protein*
- DDAH: Dimetilarginina dimetilaminohidrolasa, del inglés *Dimethylarginine dimethylaminohydrolase*
- DIDS: Ácido 4,4'-Diisotiociano-2,2'-estilbenedisulfónico, del inglés *4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid*
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DPI: yoduro de difenileno, del inglés *diphenyleneiodonium*
- DTT: ditioneol
- ECA: Enzima convertidora de la angiotensina
- EDTA: ácido etilenediaminatetraacético sal de tetrasodio, del inglés *Ethylenediaminetetraacetic acid tetrasodium salt*
- EGF: factor de crecimiento endotelial, del inglés *Endothelial growth factor*
- ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
- eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial, del inglés *Endothelial nitric oxide synthase*

ERK 1/2: Cinasas reguladas por señal extracelular, del inglés *Extracellular signal-regulated kinases*

FAD: flavín adenín dinucleótido

FITC: isotiocianato de fluoresceína, del inglés *fluorescein isothiocyanate*

FMN: Mononucleótido de flavina, del inglés *Flavin mononucleotide*

GAPDH: Glicealdehído 3-fosfato dehidrogenasa, del inglés *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GFAT: glutamina:fructosa 6-fosfatasa amidotransferasa

gHSA: Albúmina sérica humana glicada, del inglés *glycated human serum albumin*

GLUT4: Transportador de la glucosa 4, del inglés *glucose transporter type 4*

GMP: Monofosfato de guanosina, del inglés *Guanosin monophosphate*

GTPasa: Trifosfato de guanosina, del inglés *Guanosin triphosphate*

HbA1c: hemoglobina glicosilada

HBS: Tampón salina HEPES, del inglés *HEPES buffered saline*

HEPES: ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazineetanosulfónico, del inglés *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

HIF-1: Factor Inducible por Hipoxia-1, del inglés *Hypoxia-inducible factor-1*

HSA: Albúmina sérica humana, del inglés *human serum albumin*

HOMA-IR: modelo de homeostasis de resistencia a la insulina, del inglés *homeostasis model assessment insulin resistance*

HUVEC: Células endoteliales de la vena umbilical humana, del inglés *human umbilical vein endothelial cells*

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1, del inglés *Intercellular adhesion molecule-1*

IKK-B: I κ B cinasa

IL: Interleucina

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible, del inglés *Inducible nitric oxide synthase*

IP₃: Inositol trifosfato

IRS-1: sustrato del receptor de la insulina-1, del inglés *Insulin receptor substrate-1*

JNK/SAPK: Cinasa N-terminal c-Jun/Proteína cinasa activada por estrés, del inglés *c-Jun N-terminal kinases/Stress-activated protein kinase*

Keap1: proteína asociada a ECH similar a Kelch, del inglés *Kelch-like ECH-associated protein 1*

KLF2: el factor similar al factor Krüppel, del inglés *factor Krüppel-like factor 2*

LAM: Molécula de adhesión de leucocitos, del inglés *Leukocyte adhesion molecule-1*

LDL: Lipoproteína de baja densidad, del inglés *low density lipoprotein*

L-NAME: Ester metilo L-N^G-Nitroarginina, del inglés *L-N^G-Nitroarginine methyl ester*

MAPK: proteína cinasa activada por mitógeno, del inglés *Mitogen activated protein kinase*

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos-1, del inglés *Monocyte chemotactic protein-1*

MEK 1/2: Proteína cinasa cinasa activada por mitógeno 1/2, del inglés *Mitogen activated protein kinase kinase*

MMLV: virus de la leucemia murina Moloney, del inglés *Moloney murine leukemia virus*

MTT: 3-[4,5-dimetiltiazol-2-1]-2,5-difeniltetrazolio bromuro

NADH: β-nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NADPH: β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NF-κB: Factor Nuclear kappa B, del inglés *Nuclear factor kappa B*

NOS: óxido nítrico sintasa, del inglés *nitric oxide synthase*

Nrf2: Factor similar al factor eritroide nuclear, del inglés *nuclear factor erythroid 2-like 2*

O-GlcNac: N-acetilglucosamina unida serinas o treoninas, del inglés *serine threonine O-linked N-acetylglucosamine*

PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno, del inglés *Plasminogen activator inhibitor-1*

PAK: cinasa activada por p21, del inglés *p21 activated kinase*

PBS: Tampón salino fosfato, del inglés *Phosphate buffered saline*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés *Polymerase chain reaction*

PKC: Proteína cinasa c, del inglés *Protein kinase C*

PGI2: Prostaciclina

PI3K: fosfoinosítido-3 cinasa, del inglés *Phosphoinositide 3-kinase*

Poldip2: Proteína de interacción con la polimerasa delta 2, del inglés *Polymerase delta-interacting protein 2*

- PVDF: Polivinilideno difluorido, del inglés *Polyvinylidene difluoride*
- RAGE: Receptor para los productos avanzados de glicación, del inglés *receptor advanced glycation end products*
- ROS: Especies reactivas del oxígeno, del inglés *Reactive oxygen species*
- RT-PCR: Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa, del inglés *Reverse transcription polymerase chain reaction*
- SDS: dodecil sulfato de sodio, del inglés *sodium dodecyl sulfate*
- SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
- SOD: Superóxido dismutasa, del inglés *Superoxide dismutases*
- Sp1: Proteína específica 1, del inglés *Specificity Protein 1*
- TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, del inglés *thiobarbituric acid-reactive substances*
- TBE: EDTA-ácido bórico tris, del inglés *Tris Boric acid EDTA*
- TBS-T: Tampón salino con tween 20, del inglés *Tris-Buffered Saline Tween-20*
- TGF: Factor de crecimiento transformante, del inglés *Transforming growth factor*
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés *Tumor necrosis factor alpha*
- t-PA: Activador tisular del plasminógeno, del inglés *Tissue plasminogen activator*
- VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular-1, del inglés *Vascular cellular adhesion molecule-1*
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés *Vascular endothelial growth factor*
- VEGFR2: Receptor factor de crecimiento endotelial vascular 2, del inglés *Vascular endothelial growth factor receptor 2*

Introducción

Introducción

La disfunción endotelial como origen de la enfermedad cardiovascular

La disfunción endotelial es definida como la pérdida de la capacidad del endotelio de regular de forma adecuada la homeostasis vascular. Las funciones más importantes que se conocen del endotelio son: la regulación del tono vascular, la actuación como barrera selectiva de macromoléculas, la modulación de la inflamación, la regulación del crecimiento vascular y el control de la agregación plaquetaria y la coagulación [1]. Así que, los principales cambios ocurridos en las células endoteliales que impiden que éstas cumplan con sus funciones habituales serían: la producción aumentada de factores vasoconstrictores, inflamatorios, protrombóticos o de crecimiento celular y la pérdida de biodisponibilidad del óxido nítrico en el tejido vascular [2].

Una de las funciones del endotelio que hemos mencionado es la regulación del tono vascular, actuando directamente en la vasodilatación y en la vasoconstricción, y en consecuencia, controlando el flujo sanguíneo [3]. En el diagnóstico clínico se utiliza la pérdida de control de la vasodilatación del endotelio para medir su disfunción y se puede analizar por diferentes métodos: la infusión intracoronaria de acetilcolina, la dilatación mediada por flujo en la arteria braquial y la pletismografía del antebrazo o del pulso de los dedos [1]. Se ha observado por estos métodos que la vasodilatación mediada por el endotelio está reducida en los pacientes hipertensos, pacientes con enfermedad coronaria y en pacientes que presentan distintos factores de riesgo cardiovascular tales como *diabetes mellitus*, dislipemias o tabaquismo, y este descenso en la vasodilatación se hace más pronunciado de una manera proporcional al número de factores de riesgo [2]. Por otro lado, la disfunción endotelial está relacionada con enfermedad coronaria [4], con insuficiencia cardíaca [5] y con enfermedad arterial periférica [1]. De esta manera nos encontramos que la disfunción endotelial se encuentra relacionada con los distintos factores de riesgo cardiovascular y también se asocia con las distintas patologías cardiovasculares, siendo un elemento importante y común en este tipo de enfermedades.

Los distintos mecanismos moleculares que modulan los cambios que sufre el endotelio disfuncional ya han sido mencionados: factores vasoconstrictores, factores inflamatorios y de adhesión, factores protrombóticos, factores de crecimiento celular y la biodisponibilidad del óxido nítrico (Figura 1).

Factores vasoconstrictores

El tono vascular esta regido por un equilibrio entre los elementos vasodilatadores y los vasoconstrictores. Entre los primeros podemos mencionar el óxido nítrico, la prostaciclina y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio. Entre los vasoconstrictores podríamos destacar la endotelina-1 y la angiotensina II [3]. En la disfunción endotelial prevalecen los factores vasoconstrictores frente a los vasodilatadores [2]. En este desequilibrio toma un gran protagonismo la angiotensina II, que es en sí misma una potente molécula vasoconstrictora, pero que además es capaz de activar a la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH, del inglés *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxidasa y producir especies reactivas del oxígeno (ROS del inglés *reactive oxygen species*) que afectan al sistema vascular en general y a la producción de óxido nítrico en particular [6]. La producción de óxido nítrico ocupa un papel especial en la vasodilatación, pero será comentado de una forma más detallada más adelante.

Factores inflamatorios y de adhesión

En la disfunción endotelial existe una activación inflamatoria de las células endoteliales, que podría estar relacionada con el estado inflamatorio presente en la aterosclerosis [3]. En relación a la inflamación, las infecciones bacterianas y la administración de citocinas inflamatorias reducen la función endotelial [2]. En humanos, los estados agudos inflamatorios inducidos por la infusión de lipopolisacárido en bajas dosis o las vacunaciones empeoran la vasodilatación dependiente del endotelio [3]. La vasodilatación provocada por acetilcolina en las arterias del antebrazo se correlaciona negativamente con los valores de proteína c reactiva en pacientes con enfermedad coronaria [7]. Por el contrario, el tratamiento con medicamentos antiinflamatorios, como por ejemplo los inhibidores de la ciclooxigenasa mejora la función endotelial en pacientes con aterosclerosis [2].

In vitro, las células endoteliales son estimuladas por factores pro-inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , del inglés *Tumor necrosis factor alpha*) y la proteína c reactiva y en consecuencia estas células expresan factores de adhesión e inflamatorios. En este estado se alteran los niveles de activación y expresión de factores de transcripción implicados en la reacción inflamatoria, como por ejemplo, el factor nuclear kappa B (NF-kB, del inglés *nuclear factor kappa B*). Se ha observado en células endoteliales aisladas de individuos ancianos u obesos una activación del NF-kB a través de una expresión incrementada de la subunidad activa de NF-kB p65 y una disminución del regulador de NF-kB (I κ B). Esta activación se ha relacionado con una peor vasodilatación dependiente del endotelio [3]. Es un hecho a destacar que se ha visto que las ROS pueden activar al factor de transcripción NF-kB [8].

A su vez, los factores inflamatorios activan a las moléculas de adhesión. Las principales moléculas de adhesión son la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1 del inglés *Intercellular adhesion molecule-1*), la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1 del inglés *Vascular cellular adhesion molecule-1*), la molécula de adhesión de leucocitos (LAM del inglés *Leukocyte adhesion molecule-1*) y la E-selectina. La acción combinada de las moléculas de adhesión y citocinas como la molécula quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) atrae células del sistema inmune y permite que se unan a las células endoteliales, infiltrándose a través de ellas y produciendo inflamación. La expresión de estas moléculas de adhesión está íntimamente ligada al estado inflamatorio del endotelio. El NF-kB regula los genes de la ICAM-1, la VCAM-1 y la E-selectina [9]. La proteína c reactiva aumenta la expresión de ICAM-1, VCAM-1, E-selectina y MCP-1 [1, 9]. Como hemos comentado anteriormente, las ROS tienen un papel en la regulación de la inflamación y también se pueden relacionar con el aumento de los factores de adhesión. El peróxido de hidrógeno, producido por la dismutación del anión superóxido proveniente de la NADPH oxidasa, puede activar el NF-kB para aumentar la expresión de ICAM-1 en la membrana de las células endoteliales. De forma recíproca, tanto ICAM-1 como VCAM-1 median la generación de ROS para regular la permeabilidad del endotelio, intensificando la inflamación inicial al permitir la infiltración de los monocitos a través de la íntima vascular [8].

Factores protrombóticos

El endotelio en su estado basal expresa factores con actividades anticoagulantes. Cuando el endotelio es disfuncional presenta propiedades procoagulantes. Las células endoteliales juegan un papel fundamental en la regulación de la generación de la plasmina, que es la enzima fundamental para la disolución de los coágulos. El endotelio también regula la fibrinólisis por producir el activador del plasminógeno del tejido (t-PA del inglés *Tissue plasminogen activator*) y el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1 del inglés *Plasminogen activator inhibitor-1*). Además, el endotelio limita la activación de la cascada de coagulación por la trombomodulina y por la antitrombina. También se regula a nivel del endotelio las interacciones entre el factor tisular-inhibidor del factor tisular y la síntesis o liberación del inhibidor del factor tisular está positivamente regulado por la heparina, el flujo sanguíneo y la trombina [9]. La inflamación y el desequilibrio de estas rutas provocan una disfunción de la regulación de la coagulación por parte de las células endoteliales, siendo uno de los pasos fundamentales en las etapas avanzadas de la aterosclerosis [10].

Factores de crecimiento celular

La célula endotelial regula el crecimiento de las células cercanas, como las células del músculo liso vascular, por lo que la pérdida de la función de la célula endotelial lleva a un descontrol en la proliferación. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*) es uno de los factores más importantes en el control de esta función del endotelio y se ha visto que es capaz de regular la actividad de la NADPH oxidasa y la producción de ROS. El VEGF estimula la NADPH oxidasa y la migración de las células endoteliales, siendo modulado este efecto por la presencia de antioxidantes [11]. El VEGF actúa a través del receptor de VEGF de tipo 2 (VEGFR2 del inglés *Vascular endothelial growth factor receptor 2*). Este receptor se une a la IQGAP1, que es un regulador fundamental de la producción de ROS inducida por VEGF [12]. La actividad de la NADPH oxidasa es necesaria para la proliferación, la supervivencia y la apoptosis de las células endoteliales [13]. Dos isoformas de la familia de las NADPH oxidasa, la Nox2 y la Nox4, contribuyen de igual manera a la generación de ROS y al aumento de

proliferación en condiciones basales en células endoteliales [14]. Es más, las ROS puede señalizar tanto el incremento de proliferación como el de apoptosis en células endoteliales, dependiendo de la concentración y del tipo celular [15].

Biodisponibilidad del óxido nítrico

Uno de los principales factores que regulan la función endotelial es la producción y la biodisponibilidad del óxido nítrico, el cual relaja los vasos sanguíneos, previene la agregación y la adhesión plaquetaria, limita la oxidación del colesterol de la lipoproteína de baja densidad (LDL del inglés *low density lipoprotein*), inhibe la proliferación de las células del músculo liso vascular y reduce la expresión de genes proinflamatorios. Por todas estas acciones, una deficiencia en la producción del óxido nítrico es una de las principales causas de disfunción endotelial. El óxido nítrico se produce a través de la conversión del aminoácido L-arginina a L-citrulina por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS, del inglés *nitric oxide synthase*). Hay varias isoformas: la NOS1 aislada del cerebro, la NOS2, o óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, del inglés *Inducible nitric oxide synthase*), encontrada en macrófagos y la NOS3 o óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, del inglés *Endothelial nitric oxide synthase*) de las células endoteliales. La NOS1 y la eNOS poseen actividad constitutiva mientras que la actividad de la iNOS es inducida por distintos estímulos. Todas las NOS son homodímeros que comparten un dominio homólogo a la citocromo reductasa P-450 en el extremo carboxílico de la proteína, tiene lugares de unión para NADPH, Mononucleótido de flavina (FMN del inglés *Flavin mononucleotide*), tetrahidrobiopterina (BH4), y calmodulina, siendo necesarios todos los coenzimas para el correcto funcionamiento de la enzima [16].

La eNOS, es la NOS más importante en el tejido vascular y toma un protagonismo especial en la disfunción endotelial. Es una enzima activada por el flujo pulsátil de la sangre a través de los vasos y el estrés de cizalla. El estrés de cizalla se relaciona de manera directamente proporcional con el flujo arterial e inversamente con el diámetro arterial, teniendo mucha más relevancia este último parámetro. La eNOS es generalmente activada por un incremento de la concentración intracelular de Ca^{+2} , que a través de la calmodulina, incrementa la transferencia de electrones en el dominio reductasa del enzima

(desde el NADPH a las flavinas) necesaria para reducir la L-arginina. La administración de acetilcolina en las arterias, causa una dilatación de la arteria debido a un incremento intracelular de Ca^{+2} en el endotelio. El óxido nítrico producido difunde a las células del músculo liso vascular donde se activa la guanilato ciclasa, aumentando el monofosfato de guanosina (GMP del inglés *Guanosin monophosphate*) cíclico, que participa en la relajación de las células del músculo liso vascular [1-3, 9, 16].

Uno de los principales factores que influye en la biodisponibilidad del óxido nítrico es la reacción de éste con el anión superóxido, para formar peroxinitrito. Otra posibilidad es la incapacidad de las NOS para producir óxido nítrico por efectos del estrés oxidativo o el agotamiento de la tetrahidrobiopterina, que conducen al desacoplamiento de la NOS, pasando a producir aniones superóxido en vez de óxido nítrico [16].

Como se ha visto en todos los cambios que presentan las células endoteliales en la disfunción endotelial, la producción de radicales libres del oxígeno tiene un protagonismo especial. La producción de ROS a niveles bajos tiene funciones indispensables en la fisiología normal del sistema cardiovascular, pero cuando la producción de ROS sobrepasa las defensas antioxidantes que lo regulan produce una serie de problemas, como por ejemplo, los que hemos visto en este apartado en relación a la disfunción endotelial.

La disfunción endotelial participa tanto en el inicio como en el desarrollo de la aterosclerosis. En la aterosclerosis se produce una pérdida de la reactividad normal de los vasos que lleva a isquemia, angina e infarto de miocardio, un incremento de permeabilidad a macromoléculas como las lipoproteínas, un aumento de la expresión de factores inflamatorios o de adhesión que favorecen el reclutamiento de monocitos-macrófagos, una desregulación del crecimiento de las células endoteliales y del músculo liso y, finalmente, el aumento de factores de coagulación [17].

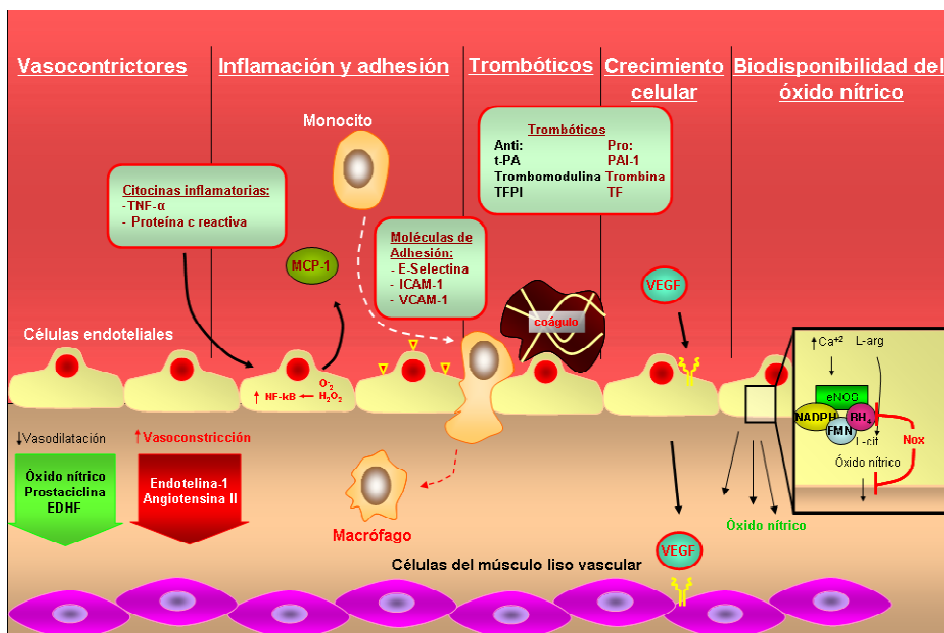


Figura 1: Representación de los factores que llevan a la disfunción endotelial. Resumen de los distintos factores vasoconstrictores, de inflamación o adhesión, trombóticos, de crecimiento celular y de biodisponibilidad del óxido nítrico, que afectan a la célula endotelial y a sus funciones. Abreviaturas.- BH4: Tetrahidrobiopterina; EDHF: Factor hiperpolarizante derivado del endotelio; eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial; FMN: mononucleótidos flavina; H₂O₂: Peróxido de hidrógeno; ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1; L-arg: L-arginina; L-cit: L-citrulina; MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos-1; NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; NF-kB: Factor Nuclear kappa B; Nox: NADPH oxidasa; O₂: Anión superóxido; PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno; TF: Factor tisular; TFPI: Inhibidor de la ruta del factor tisular; TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa; t-PA: Activador tisular del plasminógeno; VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular-1; VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

Asociación entre la *diabetes mellitus* y la disfunción endotelial

La diabetes es un desorden metabólico caracterizado por hiperglicemia e intolerancia a la glucosa que es causado por una deficiencia y/o una función

empeorada de la insulina. Los factores de riesgo cardiovascular más importantes son la obesidad abdominal y la resistencia a la insulina (*diabetes mellitus* tipo 2), los altos niveles de colesterol y la presión sanguínea alta. La prevalencia de la diabetes tipo 2 está aumentando rápidamente en todo el mundo. La mayoría de las discapacidades y las muertes prematuras en pacientes diabéticos se deben a complicaciones vasculares. A lo largo del 2010, se atribuyeron a la diabetes alrededor de 4 millones de muertes en el mundo y el 50% de éstas sucedieron por enfermedades cardiovasculares [18].

La diabetes también lidera las causas de la ceguera, el fallo renal y las amputaciones de las extremidades inferiores. Todas son afecciones relacionadas con los vasos sanguíneos [9]. Sabiendo todo lo anterior, es importante remarcar que la diabetes y la resistencia a la insulina son unos factores destacados en la disfunción endotelial. Este hecho se ha observado a nivel clínico y experimental [3].

A nivel clínico, estudios transversales han mostrado una reducción en la vasodilatación dependiente del endotelio en arterias coronarias y periféricas de pacientes con diabetes tipo 1 y 2 [19-21]. Varios estudios han examinado la relación entre la resistencia a la insulina y la disfunción endotelial en pacientes. Para esta asociación se han realizado distintas pruebas del control glucémico como son el *clamp* de glucosa o de insulina, el test oral de tolerancia de la glucosa, los niveles de insulina plasmática y el modelo de homeostasis de resistencia a la insulina (HOMA-IR del inglés *homeostasis model assessment insulin resistance*). En todos ellos, se observó una relación inversa entre los niveles de resistencia a la insulina y la vasodilatación medida con distintos métodos tanto a nivel braquial, radial o coronario [22-33] (Tabla 1).

Además, en humanos sanos, la infusión de la insulina estimula la vasodilatación e incrementa el flujo sanguíneo en tejidos periféricos, y este efecto se debilita en pacientes con *diabetes mellitus* y resistencia a la insulina [21, 34].

Tabla 1: Estudios clínicos que relacionan la sensibilidad a la insulina y la disfunción endotelial

Tipo de pacientes	Prueba/Test	Resultado	Ref.
Mujeres obesas	<i>Clamp</i> de glucosa	↑ Sensibilidad a insulina, ↑ de flujo inducido por acetilcolina	[22]
No diabéticos	<i>Clamp</i> de glucosa	↑ Sensibilidad a insulina, ↑ dilatación mediada por flujo en arteria braquial	[23, 24]
Sujetos sanos	Test oral de tolerancia a la glucosa	↑ Dosis de respuesta a la insulina, ↓ circulación coronaria	[25]
Pacientes obesos frente a delgados	Test oral de tolerancia a la glucosa	↑ Dosis de respuesta a la insulina, ↓ circulación coronaria	[26]
Sujetos sanos	Niveles de insulina	↑ Niveles insulina, ↓ dilatación mediada por flujo en la arteria braquial	[27]
No diabéticos con niveles variables de índice de masa corporal	HOMA-IR	↑ HOMA-IR, ↓ respuesta a metacolina en el flujo de la sangre de la pierna	[28]
Diabéticos frente a no diabéticos	HOMA-IR	↑ HOMA-IR, ↓ respuesta en la circulación de la piel a la acetilcolina	[29]
Pacientes del estudio Framingham	HOMA-IR	↑ HOMA-IR, ↓ la dilatación mediada por flujo en la arteria braquial	[30]
Sujetos sanos, obesos y/o con resistencia a la insulina	<i>Clamp</i> de insulina	La cantidad de glucosa captada se relaciona con la vasodilatación mediada por insulina	[31-33]

HOMA-IR: modelo de homeostasis de resistencia a la insulina, del inglés *homeostasis model assessment insulin resistance*.

Además de estos estudios, también encontramos otros que observan una mejora en la función endotelial tras tratamientos para aumentar la sensibilidad a la insulina. Los tratamientos con tiazolidinedionas o con metformina, la pérdida de peso, el ejercicio y los inhibidores del sistema renina-angiotensina mejoran la función endotelial [35-42] (Tabla 2).

Tabla 2: Distintos tratamientos para mejorar la sensibilidad a la insulina y su relación con la disfunción endotelial.

Tipo de pacientes	Tratamiento	Resultado	Ref.
Pacientes con diabetes tipo 2	Rosiglitazona	Mejora la función endotelial en el antebrazo	[35]
Pacientes con diabetes tipo 2	Troglitazona	Mejora la función endotelial en el antebrazo	[36]
Pacientes con diabetes tipo 2	Metformina	Mejora la dilatación dependiente del endotelio	[37]
Pacientes con síndrome metabólico	Metformina	Mejora la dilatación dependiente del endotelio	[38]
Pacientes no diabéticos con hipertensión o hipercolesterolemia, con o sin resistencia a la insulina	Pioglitazona	Mejora la función endotelial	[39]
Sujetos sanos	Rosiglitazona	Mejora la dilatación mediada por flujo y ↓ los marcadores de inflamación	[40]
Pacientes con diabetes tipos 2	Ejercicio, pérdida de peso o inhibidores del sistema renina-angiotensina	Mejora de la función endotelial	[41, 42]

Posibles mecanismos de las complicaciones vasculares diabéticas

En el apartado anterior hablamos sobre la influencia de la insulina en la disfunción endotelial, pero solo teniendo en cuenta su papel en la pérdida de regulación del tono vascular dependiente del endotelio. Hay otros cambios en la célula endotelial que llevan a la disfunción endotelial y que son causados por la diabetes, como son la alteración en la señalización de la producción de óxido nítrico en las células endoteliales, la activación proinflamatoria del endotelio, la activación de la proteína cinasa c (PKC del inglés *Protein kinase C*) y el estrés oxidativo incrementado.

Uno de los mecanismos más importantes en la diabetes que puede llevar a la disfunción endotelial, es la **alteración en las rutas de señalización** que llevan a la activación de la eNOS. La eNOS se expresa constitutivamente en células endoteliales y está localizada en las caveolas, las cuales son invaginaciones especializadas de la membrana plasmática ricas en lípidos específicos y proteínas, incluyendo la caveolina-1 [43]. La eNOS tiene unos bajos niveles de actividad basal cuando está asociada con la caveolina-1, pero puede ser activada en cuestión de segundos tras la estimulación de las células endoteliales con agonistas dependientes de receptor tales como la acetilcolina y la serotonina, que incrementan el calcio intracelular y promueven el desplazamiento de la caveolina-1 dependiente de calcio/calmodulina y por lo tanto, la activación de la eNOS [44]. En relación a esta ruta, la diabetes y la obesidad están asociadas con una expresión incrementada de caveolina-1 en el endotelio de animales de experimentación y en el tejido adiposo de pacientes diabéticos [45, 46]. Este efecto está asociado con una peor activación de eNOS y una función vasodilatadora empeorada.

La activación de la eNOS también se produce por la interacción con otras proteínas, incluyendo la asociación con la proteína de choque térmico 90 [47]. La *diabetes mellitus* también empeora la interacción entre la eNOS y la proteína de choque térmico 90, empeorando la producción de óxido nítrico [48]. Alternativamente, la eNOS puede ser activada por bradicinina, estrógenos y el estrés de cizalla a través de la vía fosfoinosítido-3 cinasa (PI3K del inglés *Phosphoinositide 3-kinase*)/Akt. La Akt fosforila la eNOS en la serina 1177, lo que conlleva un incremento de la actividad y también una mejora de la

respuesta a otros factores. En pacientes diabéticos, se ha visto reducida esta fosforilación de la Akt y también se vieron reducidos los niveles de expresión de la NOS en el tejido arterial obtenido de cirugía de bypass coronario [49].

La unión de la insulina a su receptor en las células endoteliales lleva a la fosforilación del sustrato del receptor de la insulina-1 (IRS-1, del inglés *Insulin receptor substrate-1*) y la consecuente fosforilación y activación de la eNOS por la PI3K/Akt [50] y también puede activar de forma secundaria a las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK, del inglés *Mitogen activated protein kinase*) a través de las pequeñas GTPasa Ras [51]. En células endoteliales, la activación de esta ruta ha sido relacionada con la expresión de la endotelina-1 y de proteínas de adhesión proinflamatorias tales como ICAM-1 [52]. Se observó en sistemas experimentales que la infusión de insulina incrementa los niveles circulantes de endotelina-1 en humanos y esta respuesta está aumentada en la resistencia a la insulina [53]. Cuando hay diabetes y resistencia a la insulina, la activación de la eNOS mediada por insulina vía PI3K/Akt está inhibida, mientras que los efectos adversos de la insulina, como el aumento de la endotelina-1 o ICAM-1 a través de las rutas secundarias descritas no se ven reducidas lo cual contribuye a la enfermedad cardiovascular [52, 54].

Finalmente, la *diabetes mellitus* está asociada con niveles incrementados de inhibidores endógenos de la eNOS, tales como la dimetil arginina asimétrica (ADMA del inglés *Asymmetric dimethylarginine*) [55].

En la diabetes se produce además una **activación proinflamatoria en el endotelio**. La aterosclerosis está reconocida como una enfermedad inflamatoria y el endotelio vascular contribuye y a la vez está afectado por el proceso inflamatorio [56, 57]. La diabetes está asociada a una inflamación sistémica que puede empeorar la función endotelial y contribuir a la aterosclerosis. En modelos experimentales, las concentraciones aumentadas de glucosa o de ácidos grasos libres activan el endotelio. Pacientes con *diabetes mellitus* u obesidad sufren un aumento de los niveles circulantes de marcadores inflamatorios, incluyendo la proteína c reactiva, el TNF- α , la interleucina-6 y la ICAM-1 [58-61]. Además, los niveles altos de marcadores inflamatorios predicen un mayor riesgo cardiovascular en pacientes diabéticos

y diabetes de nueva aparición [62-64]. El factor de transcripción NF- κ B es un regulador clave en la activación endotelial y también está relacionado con la patogénesis de la resistencia a la insulina [65, 66]. El NF- κ B es activado por ácidos grasos libres, citocinas inflamatorias y el receptor para los productos avanzados de glicación (RAGE del inglés *receptor advanced glycation end-products*) [67-70]. La activación del NF- κ B implica la fosforilación y consecuente degradación de la subunidad inhibidora I κ B por la I κ B cinasa (IKK-B) [71], lo cual permite la translocación de las subunidades reguladoras p50 y p65 al núcleo, donde promueven la expresión de genes inflamatorios. En el músculo esquelético, el TNF- α o la sobreexpresión de la IKK-B producen resistencia a la insulina. Por otra parte, la supresión genética o la inhibición farmacológica de la IKK-B con salicatos previenen la resistencia a insulina [71]. Estudios en células endoteliales en cultivo y en animales de experimentación apoyan las relaciones entre la activación de NF- κ B, el desarrollo del fenotipo inflamatorio, la resistencia a la insulina y la bioactividad reducida del óxido nítrico [72, 73]. Todos estos mecanismos se ven apoyados por varios ensayos clínicos. El tratamiento de sujetos obesos con salsalato, un medicamento antiinflamatorio no esteroideo, mejora la sensibilidad a la insulina y reduce los marcadores circulantes inflamatorios. Una expresión incrementada de la p65 y una reducción de la I κ B, reflejan la activación de NF κ B que ha sido observada en células endoteliales aisladas de individuos obesos y ancianos y todos estos elementos se relacionan con una vasodilatación dependiente del endotelio reducida [74]. El tratamiento con salsalato en sujetos obesos reduce la activación de NF κ B en células endoteliales. Este efecto fue asociado con una sensibilidad a la insulina y una vasodilatación dependiente del endotelio mejoradas [3].

Las **PKC** pertenecen a una familia de serina/treonina cinasas que actúan a nivel de la membrana plasmática en la transducción de señales de una amplia variedad de tipos celulares. Se han descrito 11 isoformas de PKC en tejidos de mamíferos. La activación de las formas clásicas es dependiente de Ca^{2+} y del diacilglicerol. Una activación excesiva de varias isoformas de PKC depende del aumento de la producción de ROS en el tejido. Ésta, es precisamente una de las formas por las que la diabetes causa daño en el tejido a través del estrés oxidativo, ya que se produce la inhibición de la gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH, del inglés *Glyceraldehyde 3-phosphate*

dehydrogenase) y en consecuencia la acumulación de triosa fosfato, el precursor del diacilglicerol. Además, una activación de la PKC puede inducir el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en células musculares lisas, la síntesis de endotelina-1 y de PAI-1 [9].

En cuanto a las distintas isoformas, se ha visto que no todas ellas tienen un papel en la diabetes. Por ejemplo, la hiperglicemia activa las isoformas δ y β de la PKC en células vasculares en cultivo al aumentar los niveles de diacilglicerol. De estas dos isoformas, la PKC β es la más importante en las células endoteliales y se encuentra activada por concentraciones elevadas de glucosa y ácidos grasos. La PKC β es un posible vínculo entre la inflamación, la disfunción endotelial y la resistencia a insulina en la *diabetes mellitus*. La PKC β inhibe la PI3K y la Akt, reduciendo la actividad de la eNOS y aumenta la inflamación mediante la activación de NF- κ B. Además, la inhibición de esta isoforma mejora la biodisponibilidad del óxido nítrico y reduce la activación inflamatoria del endotelio. A nivel clínico, la inhibición de la PKC β previene el desarrollo de la disfunción endotelial tras la infusión de glucosa en el antebrazo y mejora la dilatación mediada por flujo en la arteria braquial en pacientes con *diabetes mellitus* [3, 75]. La PKC β también activa la NADPH oxidasa en células endoteliales aórticas bovinas [76].

Estrés oxidativo y diabetes

El estrés oxidativo aumentado es uno de los mecanismos más destacados de la disfunción endotelial en la diabetes, ya que, como hemos visto, tiene una gran relación con distintos problemas en la célula endotelial. La hiperglicemia por sí misma es capaz de aumentar la producción de ROS [75]. La exposición a la glucosa o a los ácidos grasos libres en el tejido arterial induce la producción de aniones superóxido y disminuye la biodisponibilidad del óxido nítrico en la pared vascular, mientras que el tratamiento antioxidante actúa recuperando la función endotelial bajo estas condiciones [3]. Una producción normal de ROS es necesaria para el buen funcionamiento de las células endoteliales, pero en la diabetes, un incremento en la producción de estas especies lleva a la disfunción [3]. Estudios en humanos apoyan la importancia del estrés oxidativo aumentado como un mecanismo de la disfunción endotelial en la diabetes y la resistencia a la insulina. Por ejemplo,

los marcadores circulantes del estrés oxidativo, incluyendo F2 isoprostanos y anticuerpos contra la lipoproteína de baja densidad oxidada, están incrementados en personas con diabetes, obesidad y resistencia a la insulina [3]. Estudios recientes han mostrado asociación entre la disfunción endotelial y la pérdida de masa mitocondrial, que tiene como consecuencia un incremento en la producción de ROS en arteriolas aisladas de pacientes con *diabetes mellitus* comparadas con controles sanos [3]. No sólo se ha visto aumentada la producción de ROS en la *diabetes mellitus*, también están disminuidas las defensas antioxidantes. En conejos con diabetes inducida por alloxan, las concentraciones del glutatión y las actividades de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa en células endoteliales aórticas se encontraron significativamente disminuidas comparadas con los controles. Además, los niveles de antioxidantes endógenos metalotionina I y II se encontraron significativamente reducidos en el músculo esquelético y en el plasma de pacientes diabéticos comparados con los controles [77].

En este sentido, se han utilizado diversas estrategias orientadas a tratar el aumento del estrés oxidativo mediante antioxidantes o con la sobreexpresión de enzimas antioxidantes, como la SOD, en modelos animales. La benfotiamina es un antioxidante y puede contrarrestar los efectos tóxicos de la glucosa en células endoteliales, en células endoteliales progenitoras, en modelos de ratones diabéticos y en pacientes con diabetes tipo 1 [78-81]. Reduciendo la cantidad de anión superóxido en ratones diabéticos por la expresión transgénica de la SOD o por administración de la SOD exógena se corrigen los defectos postisquémicos de la neovascularización, el envío de oxígeno, la expresión de quimiocinas y la supervivencia del tejido [75]. Es más, la inhibición de la producción de ROS inducida por hiperglicemia en estos ratones diabéticos usando la expresión de la SOD transgénica o combinaciones de compuestos antioxidantes previene el desarrollo de retinopatía, nefropatía, neuropatía y cardiomiopatía [75]. Estudios clínicos han mostrado una mejora en la función endotelial tras el tratamiento con antioxidantes. En relación a esto, la infusión de ácido ascórbico en concentraciones suficientemente altas para eliminar los aniones superóxido, mejora la función endotelial en el antebrazo de pacientes con *diabetes mellitus* [82]. El tratamiento con α -tocoferol, otro antioxidante, mejoró la función endotelial en las arterias coronarias de pacientes con *diabetes mellitus* tipo 1,

aunque no tuvo beneficio en los diabéticos tipo 2 [3]. El tratamiento con tempol disminuyó la apoptosis y la formación de neointima tras el daño por catéter en la arteria carótida de ratas diabéticas [83].

Fuentes de ROS

El aumento de ROS en el sistema vascular de diabéticos puede provenir de varias fuentes, como son el sistema de transporte electrónico de la mitocondria, la xantina oxidasa, la eNOS desacoplada y la NADPH oxidasa.

La mitocondria puede ser una importante fuente de ROS. Las ROS derivadas de la mitocondria afectan al crecimiento, a la diferenciación y a la muerte celular programada. En relación a la diabetes y a la resistencia a la insulina, las ROS derivadas de la mitocondria juegan un papel en la activación de la AMP-cinasa (AMPK) y en la dilatación dependiente del endotelio inducida por el estrés de cizalla. Estudios recientes han mostrado la asociación entre la disfunción endotelial y la pérdida de masa mitocondrial con un incremento en la producción de ROS en arteriolas aisladas de pacientes con *diabetes mellitus* comparadas con controles sanos [3]. Se ha visto además que al normalizar la producción del anión superóxido mitocondrial se bloquean varias de las rutas de daño por hiperglicemia [84].

La xantina oxidasa es una molibdoenzima capaz de catalizar la oxidación de hipoxantina y xantina en el proceso metabólico de las purinas. Reduce el oxígeno molecular para producir aniones superóxido, que llevarán a la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [4]. Se ha observado un incremento en la producción de ROS a través de la xantina oxidasa en ratones tratados con estreptozotocina, un antibiótico que se utiliza para inducir la diabetes tipo 1 en modelos animales [85]. La inhibición de la xantina oxidasa reduce el estrés oxidativo inducido por la hiperglicemia en el músculo esquelético de ratones diabéticos [86]. La inhibición de la xantina oxidasa con alopurinol reduce el estrés oxidativo y mejora la función vascular y neural en ratas o conejos con diabetes tipo I [87, 88]. También se encontró correlación entre los niveles de la xantina oxidasa y la hemoglobina glicada en diabéticos tipo 2 [89].

Las NOS pueden actuar como fuentes de aniones superóxido por sí mismas. Las NOS contienen cuatro grupos prostéticos redox activos (flavín

adenín dinucleótido (FAD), FMN, hemo y BH₄) que pueden reducir el O₂. Así, los electrones transferidos a la enzima NOS tienen que estar estrechamente controlados para evitar la reducción del O₂ en la síntesis de óxido nítrico. Cuando la eNOS se encuentra en unas condiciones determinadas, produce aniones superóxido y en este estado se dice que la eNOS se encuentra desacoplada. Hay evidencias de desacoplamiento de la NOS en ratas tratadas con estreptozotocina, un modelo animal de diabetes (48) y en pacientes con diabetes mellitus (41).

Se han descrito varios mecanismos que regulan el desacoplamiento de la eNOS: la oxidación de la tetrahidrobiopterina, la carencia de L-arginina por acción de las arginasas y el desequilibrio entre la ADMA y la dimetilarginina dimetilaminohidrolasa (DDAH, del inglés *Dimethylarginine dimethylaminohydrolase*); mecanismos implicados en el metabolismo de las metilarginina, un inhibidor endógeno de la eNOS [90]; la S-glutationilación de la eNOS [91]; y por último la reacción del peroxinitrito con el centro activo de la eNOS [77].

La NADPH oxidasa es la principal fuente de ROS en el tejido vascular y está funcionalmente activa en todas las células de la pared vascular, incluyendo las células endoteliales, las células musculares lisas vasculares, los fibroblastos, los monocitos y los macrófagos [92, 93]. La NADPH oxidasa es una enzima multi-componente compuesta por las subunidades p22phox y gp91phox. Los gp91phox posee 7 homólogos catalíticos, 4 de los cuales, Nox1, Nox2, Nox4 y Nox5 son encontrados en el tejido vascular [94] (Figura 2). La gp91phox está regulada además por los componentes citoplasmáticos p47phox, p67phox y la pequeña proteína GTPasa, Rac1, que participa en la activación de la NADPH oxidasa. Estas enzimas transfieren electrones del NADPH al oxígeno molecular, y así producen anión superóxido. Las proteínas de la familia de las NADPH oxidasas comparten lugares de unión comunes para FAD, hemo, y NADPH y 6 dominios transmembrana [8]. Dependiendo de la localización subcelular de las Nox, el anión superóxido es liberado dentro de organelas o extracelularmente, dando como consecuencia una señal interna o a efectos paracrinos, respectivamente. La SOD rápidamente convierte el anión superóxido a un producto más duradero que puede atravesar membranas, el H₂O₂. De esta manera se incrementa el radio de acción y se modifica la señal.

Mientras algunos efectos de las NADPH oxidasas están mediados por el anión superóxido, tales como la inactivación del óxido nítrico y su papel en la regulación de la presión sanguínea, muchos otros efectos son atribuidos a la modificación de las proteínas por el H_2O_2 , incluyendo la transducción de señales de crecimiento en células musculares lisas vasculares [94].

La subunidad de la NADPH más abundante en el tejido endotelial es la Nox4. El ARN mensajero de la Nox4 está presente en todas las células de la pared vascular y es significativamente más abundante que otras enzimas NADPH oxidasa [94]. Esta subunidad se encuentra en el núcleo, en las adhesiones focales y en las fibras de estrés de células del músculo liso vascular, sin embargo, en las células endoteliales la encontramos en el espacio perinuclear, en el retículo endoplásmico y en el núcleo [94].

La Nox4, junto con la Nox1 y la Nox2, está unida a la subunidad reguladora p22phox. La Nox4 es una enzima constitutiva y es la responsable de la producción basal y relativamente baja de ROS. Recientemente se ha demostrado que la Nox4 también es regulada por la proteína de interacción con la polimerasa delta 2 (Poldip2 del inglés *Polymerase delta-interacting protein 2*), aumentando su actividad. Además puede ser regulada por otros estímulos como la translocación a compartimentos de membrana con balsas lipídicas [95] y potencialmente, por la interacción con GTPasas tales como Rac1 [94, 96]. Sin embargo, la actividad de esta enzima es fundamentalmente regulada por sus niveles de expresión [97].

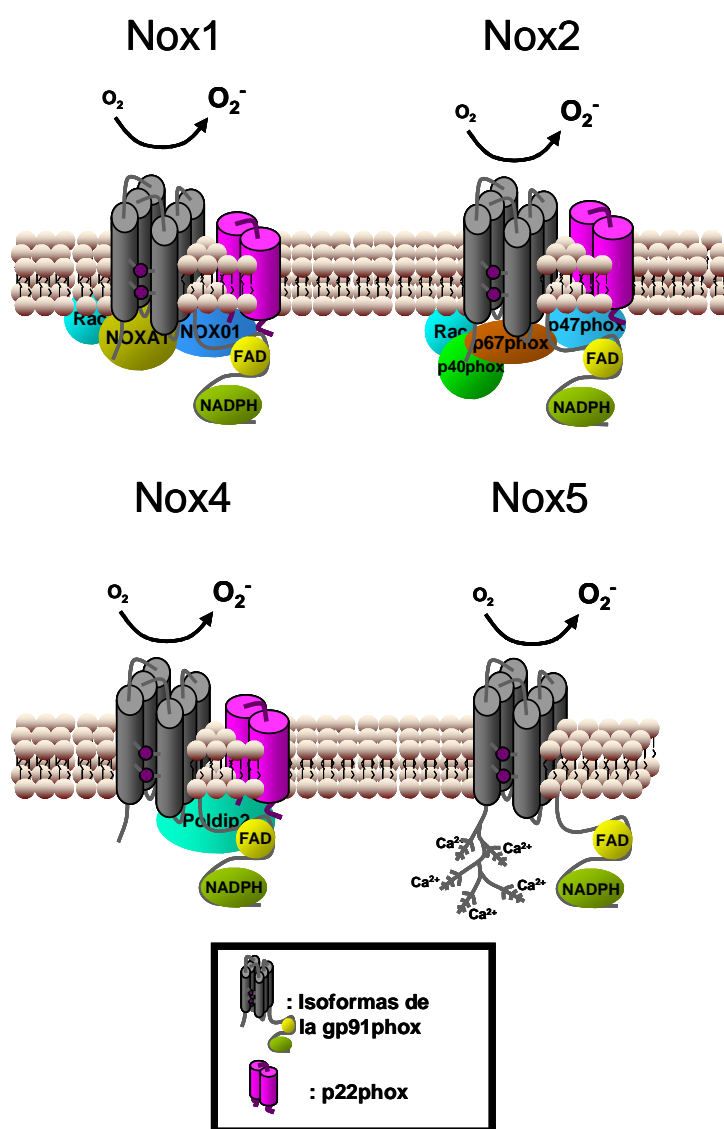


Figura 2: Esquema de las distintas subunidades de la NADPH oxidasa presentes en el sistema vascular. Representación esquemática de la conformación de distintas Nox en la membrana plasmática. A) Nox1, B) Nox2, C) Nox4 y D) Nox5. Se indican las regiones de unión de las coenzimas, FAD y NADPH. También se indican las distintas proteínas citoplasmáticas reguladoras.

NADPH oxidasa y diabetes

La activación o la expresión de la NADPH oxidasa está implicada en el estrés oxidativo asociado a la hiperglicemia y este efecto ha sido estudiado en distintos modelos celulares. El tratamiento de células endoteliales de vena umbilical (HUVEC, del inglés *human umbilical vein endothelial cells*) con altas concentraciones de glucosa incrementa la expresión de NADPH oxidasa, los niveles de estrés oxidativo y la apoptosis [98]. La producción de ROS y la expresión de p22phox y p47phox fueron incrementadas en células endoteliales microvasculares tratadas con altas concentraciones de glucosa [99]. El ARN pequeño interferente de p47phox reduce la producción de anión superóxido inducida por hiperglicemia en células del músculo liso [100]. Parte de los efectos de resistencia al óxido nítrico bajo condiciones de hiperglicemia están regulados por la Nox4, como se observó para la proliferación de las células musculares lisas [101]. En distintos modelos animales se ha podido apreciar el papel de la NADPH oxidasa en la disfunción endotelial y en la diabetes. Las subunidades de NADPH oxidasa reguladas por la Rac1, la Nox1 y la Nox2, están implicadas en una vasodilatación mediada por endotelio anormal en un modelo de ratas con diabetes tipo 1 [102]. En relación con este resultado, los vectores de adenovirus expresando un dominante negativo de Rac1 reducen la producción de aniones superóxido y mejoran la relajación vascular en modelos murinos de diabetes, demostrando un importante papel de Rac1 en la regulación de la producción de ROS [103]. La delección genética de Nox2 se ha observado que recupera las respuestas angiogénicas en los modelos de isquemia de los miembros inferiores en ratones con *diabetes mellitus* tipo 1 [104]. Por otra parte, los inhibidores de Nox previnieron la inflamación inducida por estreptozotocina y la rotura de la barrera sanguínea retinal en ratones [105].

A nivel de sujetos sanos, se ha asociado un polimorfismo genético (C242T) en el gen p22phox con un descenso de la sensibilidad a la insulina [106].

Efectos del aumento de ROS

El aumento de producción de ROS contribuye a la disfunción endotelial de numerosas formas pero la inactivación o la inhibición de la formación del

óxido nítrico es uno de los mecanismos más importantes [107]. El aumento del estrés oxidativo lleva a la pérdida de las acciones anti-plaquetarias, anti-inflamatorias y antioxidantes del endotelio por la inhibición de la eNOS y de la prostaciclina sintetasa, que sintetiza la prostaciclina (PGI₂), que es un potente vasodilatador. De esta manera los ROS están directamente relacionados con la disfunción endotelial [108]. La tetrahidrobiopterina también es rápidamente oxidada por los peroxinitritos, que proceden de la interacción entre el óxido nítrico y los aniones superóxido, contribuyendo todo esto a la inactivación e incluso al desacoplamiento de la eNOS [109]. Los peroxinitritos en altas concentraciones son citotóxicos y causan daños en proteínas, lípidos y ADN [110]. La producción de ROS también puede afectar al metabolismo de los eicosanoides y producir isoprostanos directamente por oxidación del ácido araquidónico, que son capaces de provocar la activación de las plaquetas y actuar como vasoconstrictor [77].

Las ROS modifican la LDL, oxidándola, y esta lipoproteína modificada contribuye a la disminución de la producción de óxido nítrico, al empeoramiento de la relajación del endotelio y juega un papel central en el proceso de aterosclerosis [111-115]. La producción de ROS también afecta al crecimiento de las células del músculo liso, a la proliferación, a la migración y a la senescencia de las células endoteliales, además de promover el incremento en la deposición de la matriz extracelular [8, 77]. Los factores de adhesión y la inflamación también se relacionan con un aumento de ROS, de tal forma que altos niveles de estas especies está implicados en el aumento de la síntesis de la VCAM-1 y la activación de factores de transcripción relacionados con la inflamación en las células endoteliales [8].

Proteínas con glicaciones no enzimáticas

Como hemos mostrado, la diabetes produce alteraciones en la célula endotelial llevándola a su disfunción. Principalmente se relacionan los daños causados por la diabetes en la célula endotelial con 5 mecanismos principales, todos ellos asociados al estado de hiperglicemia. Estos son: 1) un flujo aumentado de glucosa y otros azúcares a través de la ruta metabólica de los polioles, 2) La activación de la PKC, que como hemos comentado anteriormente se ha visto como uno de los mecanismos de las complicaciones

diabéticas, 3) la sobreactivación del metabolismo de las hexosaminas, 4) la formación de proteínas glicadas, tanto las tempranas, como los productos finales de glicación avanzada (AGE del inglés *advanced glycation end-products*), el aumento de su receptor RAGE y de sus otros ligandos [75].

La ruta de los polioles está basada en una familia de enzimas reductasas, que producen alcoholes de azúcar (polioles) a partir de compuestos carbonilos y de NADPH. Una sobreexpresión de la aldosa reductasa en ratones aumenta la aterosclerosis y la expresión de los genes que regulan el glutatión, un sistema con ciertas propiedades antioxidantes. A esto habría que añadirle el uso del NADPH en la ruta de los polioles, que es un sustrato común a la glutatión reductasa [75].

En cuanto a la sobreactivación del metabolismo de las hexosaminas, en esta ruta la fructosa 6-fosfatasa se separa de la glucólisis para suministrar un sustrato a la enzima glutamina:fructosa 6-fosfatasa amidotransferasa (GFAT; EC 2.6.1.16). Esta enzima modifica las proteínas uniendo N-acetilglucosamina en serinas o treoninas (O-GlcNac del inglés *serine threonine O-linked N-acetylglucosamine*). Esta modificación está relacionada con la activación de proteína específica 1 (Sp1 del inglés *Specificity Protein 1*), que es un factor de transcripción relacionado con la expresión de dos factores de crecimiento transformante (TGF del inglés *Transforming growth factor*) el α y el β además de con el PAI-1, proteínas implicadas en el crecimiento celular y la coagulación, respectivamente. Además, la unión de O-GlcNac en Akt no permite la activación de la eNOS [75].

Actualmente, el mecanismo más estudiado relacionado con la diabetes y que ha podido explicar la mayoría de los cambios y las patogénesis inducidas por la hiperglicemia son las **proteínas con glicaciones no enzimáticas tempranas y/o los AGE**. Las glicaciones no enzimáticas consisten en una serie de reacciones en los grupos amino libres de las proteínas (como por ejemplo, residuos de la lisina) con los grupos carbonilo de los azúcares aldehídos, como la glucosa acíclica, a través de una adición nucleofílica formándose de este modo una aldimina, conocida como base de Schiff. Este producto temprano de la glicación aumenta rápidamente unas pocas horas después de la incubación de proteína y glucosa (Figura 3).

La concentración de las bases de Schiff depende de altas concentraciones de glucosa y se trata de una reacción lenta [116]. A través de una catálisis ácido-base, estos residuos lábiles sufren reordenamientos moleculares secuenciales, llamados reordenamientos de Amadori, para formar una 1-amino-deoxifruktosa (fructosamina) estable, la cual puede ciclarse a una estructura de anillo. La reacción de glicación sigue una cinética de segundo orden y principalmente depende de la concentración y del tiempo de exposición a la glucosa. *In vivo*, estos dos factores se trasladan al grado y duración de la hiperglicemia en la diabetes, produciendo una lenta e irreversible glicación de las proteínas [117, 118]. De los datos experimentales se sabe que la fructosamina alcanza su equilibrio de reacción a las 38 horas [119]. La concentración de fructosamina en el plasma de humanos sanos es de 140 μM y se incrementa entre 2 y 3 veces en la *diabetes mellitus* [120].

La albúmina glicada supone el 80% de las proteínas glicadas circulantes y la albúmina modificada con Amadori es la forma predominante *in vivo*. En la albúmina *in vivo*, los principales residuos sujetos a glicación son lisinas en las posiciones 525, 439, 281 y 199, siendo la más importante la modificación en la posición 525 [121]. Al igual que la medida de la cantidad de hemoglobina glicada (HbA1c) en eritrocitos, la determinación de la concentración en el suero de la albúmina glicada evalúa la glicemia de una manera retrospectiva, abarcando un periodo de entre 2-3 semanas en humanos [118].

La hemoglobina glicada (HbA1c), es otro producto de Amadori y sirve como marcador del estado glicémico durante el mismo periodo mencionado, sin embargo, se ha encontrado que la albúmina glicada tiene además sus propios efectos biológicos relacionados con la nefropatía diabética y otras complicaciones [118].

Solo una parte de estos productos de Amadori, que son relativamente estables, pueden sufrir un cambio más, formándose los AGE (Figura 3). Una distinción importante entre los productos de Amadori y los AGEs, es la naturaleza irreversible de estos últimos. El estrés oxidativo es un elemento importante en la formación de los AGEs, acelerando este proceso [117, 118]. Aunque existen numerosos estudios que explican el papel de los efectos

biológicos de los AGE en el sistema vascular [122], hay que matizar que en éstos no se hace una adecuada separación de los AGEs y de los productos de Amadori. Teniendo en cuenta que en las proteínas glicadas del plasma hay más productos de Amadori que bases de Schiff [123] y que solo una pequeña parte de los productos de Amadori se reordenan para formar AGEs, por poner un ejemplo, un 3-8% de las proteínas séricas son productos de Amadori frente a <0.01% de AGEs [124]. Esto quiere decir que pueden tener más presencia los posibles efectos de los Amadori que los de los AGE. *In vitro* sucede lo mismo: con concentraciones de glucosa entre 5 y 25 mM durante 10 días, la cantidad de productos de Amadori sobre la albúmina aumenta en un 10%, mientras que, en las mismas condiciones, no se aprecia la aparición de ningún AGE sobre la albúmina. Solo aparecerían AGEs en incubaciones más largas pero nunca llegan a tener una concentración tan alta como los productos de Amadori [125]. Pese a que muchos artículos describen tratamientos con AGE, las preparaciones de éstos es probable que contengan una concentración mayor de productos de Amadori, así que parte de los efectos descritos en estos estudios pueden estar mediados por estos últimos y no por los AGE.

Los productos de Amadori parece que tienen sus propios receptores. Estudios con albúmina glicada mostraron a la calnexina [126] y nucleofosmina [127, 128] como proteínas de unión específica a la fructosamina. De esta manera, la albúmina Amadori no compite con la albúmina-AGE por el RAGE y puede ejercer sus propios efectos [129].

Los efectos causados por los productos de Amadori se han visto experimentalmente con independencia del RAGE. Hattori et al. observaron la activación del NF- κ B y de la AP-1 en células del músculo liso vascular tratadas con albúmina con productos de Amadori y también con AGE. La activación de los factores de transcripción fue inhibida por el RAGE soluble cuando esta activación era consecuencia del tratamiento con AGE, pero no fue inhibida en el caso del tratamiento con productos de Amadori [130]. En cardiomiocitos de rata, el tratamiento con albúmina modificada tanto con productos de Amadori como con AGE aumentaba el estrés oxidativo y éste solo era inhibido por los anticuerpos contra el RAGE en los tratamientos con AGE, pero no en los tratamientos con los productos de Amadori [131]. Estos estudios muestran

claramente que los productos de Amadori ejercen unos efectos independientemente de los AGE.

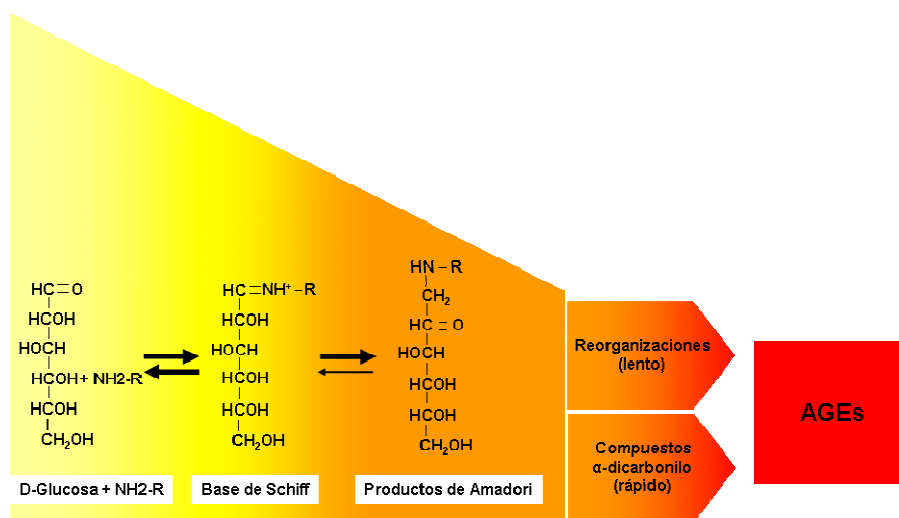


Figura 3: Esquema de la formación de los productos de glicación sobre las proteínas. Formación paso a paso de los productos de glicación, comenzando desde la interacción de la glucosa con un grupo amino (NH₂-R), pasando por la formación de los productos de Amadori. Se pueden distinguir dos vías de formación de AGE que parten del reordenamiento o la degradación de los productos de Amadori.

Por todas estas razones, los productos de Amadori, y más concretamente, la albúmina glicada, es una buena candidata para ser la causante de los efectos de la disfunción endotelial en la diabetes.

Relación de los productos de Amadori con la disfunción endotelial

Además de la albúmina, existen muchas otra proteínas abundantes en el plasma en las que se identificaron modificaciones de Amadori como en la transferrina, la α-1-antitripsina, la α-2-macroglobulina, la apolipoproteína A-I y A-II, el fibrinógeno y la α-1-glicoproteína ácida, así como otras proteínas moderadamente abundantes [132]. En estudios en pacientes se han asociado los niveles de la albúmina Amadori con la disfunción endotelial, y de forma independiente, con la nefropatía y la retinopatía diabética. Se ha encontrado que la albúmina glicada estaba dos veces aumentada en pacientes con

diabetes tipo 1 y eran más altos en pacientes con nefropatía temprana [133-135]. Además, la localización de la albúmina con modificaciones de Amadori en el glomérulo de pacientes con nefropatía diabética corresponde con mayor severidad en la enfermedad renal [136]. En general, se encuentra una extendida acumulación de albúmina glicada en riñón y piel en diabéticos [137-139].

En diabéticos, el GLY-230 (ácido 2-[3-clorofenilamino] fenilacético), un inhibidor de la formación de productos de Amadori, disminuyó los niveles de la albúmina glicada y este descenso se ha asociado con una reducción en la excreción de albúmina por la orina en pacientes con microalbuminuria pre-existente, indicando una mejora en la nefropatía [140].

Relacionado con estos hallazgos, se ha observado la asociación de la albúmina glicada con la pérdida de función del endotelio en modelos de animales diabéticos. Neutralizando o inhibiendo la formación de la albúmina glicada se puede mejorar las anomalías estructurales, funcionales y de la biología celular en el riñón y los microvasos retinales de los roedores diabéticos [141]. En modelos de roedores con diabetes tipo 2, las concentraciones de albúmina Amadori se encontraron dos veces elevadas comparado con los controles no diabéticos y disminuyeron después de la administración del anticuerpo monoclonal anti-albúmina Amadori. Este descenso fue acompañado con un descenso de fibronectina y de un engrosamiento de la membrana basal de los capilares de la retina [142, 143]. También se han observado efectos beneficiosos en el tratamiento con inhibidores de la formación de los productos de Amadori en modelos animales diabéticos. En animales diabéticos tratados con EXO-226, un compuesto de bajo peso molecular que impide la condensación de la glucosa libre con los grupos ϵ -amino de la lisina, redujo la concentración de albúmina glicada, la excreción de la albúmina en la orina y la sobreexpresión del ARN mensajero del colágeno IV en la corteza renal comparado con los controles diabéticos no tratados [144]. En estudios preclínicos de modelos de animales diabéticos, el GLY-230 redujo significativamente la albúmina Amadori en suero y redujo la excreción de albúmina en la orina. En los ratones tratados con GLY-230 se vio disminuida la sobreexpresión del TGF- β 1 y del VEGF en el riñón. Todos estos cambios causados por el GLY-230 llevan a la recuperación de la función de las nefrinas

glomerulares, reducción de la acumulación de la matriz, disminuye los cambios histomorfológicos y el desarrollo de la insuficiencia renal, además de evitar alteraciones en el vítreo [145-148].

Otra estrategia que se ha utilizado para el estudio de los efectos de los productos de Amadori fue la infusión de estos en modelos animales, observándose complicaciones vasculares y renales. La infusión de albúmina glicada en modelos animales induce una vasculopatía diabética generalizada [149], vasodilatación e hiperfiltración glomerular [150]. La infusión de proteínas glicadas en ratones produjo engrosamiento de la membrana basal del glomérulo [151].

También se han realizado estudios de los efectos de la albúmina glicada en distintos modelos celulares relacionados con el sistema vascular, retinal y renal. Se realizaron trabajos en macrófagos/monocitos, en células mesoteliales peritoneales, en células endoteliales, en células del músculo liso, en queratinocitos corneales y en células mesangiales, observando un aumento del estrés oxidativo, la inflamación y alteraciones en la proliferación y en la generación de matriz extracelular. En monocitos-macrófagos, la albúmina glicada induce estrés oxidativo, promueve la fosforilación de Cinasas reguladas por señal extracelular (ERK, del inglés *Extracellular signal-regulated kinases*), e incrementa la producción de TGF- β 1 y la translocación nuclear de factores de transcripción como el NF- κ B y la AP-1 [152, 153]. En células mesoteliales peritoneales la albúmina glicada incrementa el PAI-1, aumenta la expresión del VEGF, induce la unión al ADN del NF- κ B y la AP-1 [154, 155]. Las células endoteliales expresan receptores específicos para la albúmina modificada con Amadori [156, 157] y en presencia de la albúmina glicada producen un aumento de la actividad y expresión de NOS, incrementando la producción de óxido nítrico, aumentando la apoptosis dependiente de óxido nítrico y aumentan la expresión génica de interleucinas-8 (IL-8) [158-160]. Además, las células endoteliales exhiben una capacidad reducida de producción de la membrana basal de colágeno IV cuando son cultivadas sobre albúmina glicada [161]. En células endoteliales del glomérulo, la albúmina glicada causa un incremento en la producción de colágeno IV, fibronectina y TGF- β [162]. En células del músculo liso, la albúmina Amadori induce varias respuestas de quimiocinas y mitógenos, incluyendo una expresión aumentada de los factores

inflamatorios MCP-1 e IL-6. Estos cambios son debidos a la producción de ROS y el aumento de expresión de la iNOS, activación del NF-kB, la AP-1, la MAPK, la PKC y la tirosina cinasa [130, 163-165]. Los queratinocitos corneales aumentan su expresión de MCP-1 e IL-8 [160]. En células mesangiales la albúmina glicada aumenta la expresión de α 1- (IV) colágeno y fibronectina, activa la PKC β 1 y la ERK, incrementa el ARN mensajero de TGF- β 1 y su receptor, receptor TGF- β tipo II, activa la PKC α y la producción de aniones superóxido que inducen la transcripción del PAI-1 a través de Smad-3, por unión al promotor de PAI-1 [141].

Productos de Amadori y estrés oxidativo: las NADPH oxidasas

La primera evidencia *in vitro* de la conexión entre la albúmina glicada y el estrés oxidativo fue un estudio realizado por Kim et al. [166]. En este estudio observaron la inducción de apoptosis en pericitos retinales bovinos tratados con albúmina glicada, y encontraron que esta apoptosis estaba relacionada con el estrés oxidativo al poder revertirla en presencia de antioxidantes. A partir de este estudio se publicaron distintos trabajos en modelos celulares que observaban un aumento en el estrés oxidativo tras el tratamiento con la albúmina glicada. Los macrófagos tratados con la albúmina glicada incrementaron la expresión del TGF y la activación del NF-kB inducida por estrés oxidativo y por la ERK [152]. En adipocitos humanos maduros, la albúmina glicada induce modificaciones oxidativas en proteína estructurales [167]. El tratamiento de células musculares lisas vasculares con albúmina glicada incrementa la expresión de SOD, indicando una influencia del estrés oxidativo [168]. De hecho, la albúmina glicada aumentó la producción de aniones superóxido en células mesangiales [169]. En células endoteliales expuestas la albúmina glicada se aumenta la expresión de E-selectina a través de la activación de la NADPH oxidasa [170].

A nivel clínico también se ha visto esta relación entre la albúmina glicada y el estrés oxidativo. Nojima et al. observaron que existe una correlación positiva entre marcadores del estrés oxidativo y los niveles de albúmina glicada en pacientes con *diabetes mellitus* tipo 2 [171].

Se utilizan distintos puntos de vista para abordar el estudio de la producción de ROS por albúmina glicada. Una forma es utilizar antioxidantes

para intentar revertir los efectos causados por la albúmina glicada. En el trabajo de Kim et al. observaron apoptosis producida por la albúmina glicada en pericitos retinales, y vieron disminuida la apoptosis en presencia de distintos antioxidantes [166]. En otro estudio observaron el descenso de la producción de ROS tras la inhibición de una ruta activada por la albúmina glicada. Observaron un aumento de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, del inglés *thiobarbituric acid-reactive substances*) en una línea de macrófagos tratada con albúmina glicada y pudieron inhibir este aumento con un inhibidor de la ERK 1/2 [152]. Singh et al. observaron la modificación por oxidación de las proteínas en presencia de albúmina glicada en adipocitos, además de ver un descenso en la acción antioxidante de la albúmina [167]. Otra de las estrategias fue observar que cambia la expresión de las proteínas antioxidantes y relacionarlo de manera indirecta con un aumento del estado oxidativo de las células. Un ejemplo de esto, es el trabajo de Lee et al. en el que observaron que en células del músculo liso vascular tratadas con albúmina glicada había un aumento de la expresión del gen de la SOD2, implicando la relación del estrés oxidativo [168].

Sin embargo, otros estudios indagan en la fuente de las ROS. Se observó la producción de ROS inducida por la albúmina glicada utilizando inhibidores de la NADPH oxidasa, de esta manera, estudiaron el papel de esta enzima en la esta producción. Tanto en células mesangiales como en células endoteliales se observó que el aumento de la producción de ROS es causado por la NADPH oxidasa, al conseguir revertir los efectos de la albúmina glicada en presencia de yoduro de difenileno (DPI, del inglés *diphenyleneiodonium*) y apocinina, dos inhibidores de la NADPH oxidasa [169, 170].

La NADPH oxidasa es la principal fuente de ROS en el tejido vascular y además, se ha visto que está relacionada con el aumento de estas especies en las células tratadas con albúmina glicada. Sin embargo, solo se ha medido el papel de la enzima mediante inhibiciones farmacológicas.

La albúmina glicada puede aumentar la producción de ROS por NADPH oxidasa de dos maneras: aumentando la expresión de las subunidades de NADPH oxidasa o aumentando su activación.

En cuanto a la expresión, se ha observado que dos factores de transcripción están relacionados con las subunidades de NADPH oxidasa: el NF- κ B y la AP-1. Varios trabajos estudian la relación entre los dos factores de transcripción y la expresión de distintas subunidades de la NADPH oxidasa. El NF- κ B regula dos subunidades de la NADPH oxidasa, la gp91phox y la p47phox [74, 172]. Por otro lado, las proteínas glicadas han sido asociadas con la activación del NF- κ B [131, 152, 164, 173]. Tanto la AP-1 como el NF- κ B fueron asociados con la regulación de la expresión de la p22phox [174, 175]. Además, la AP-1 puede unirse al promotor de la p67phox, una subunidad citosólica reguladora [176] y este factor de transcripción se encuentra relacionado también con el aumento de la expresión de Nox4 [177]. Es interesante destacar que varios estudios analizan la relación entre las proteínas glicadas y la activación de la AP-1 [130, 153, 178].

Se sabe que la albúmina glicada puede activar diversas rutas intracelulares. Se ha observado en células del músculo liso vascular tratadas con albúmina glicada un aumento de la proliferación y de la expresión de MCP-1 y IL-8 a través de proteína cinasa cinasa activada por mitógeno 1/2 (MEK 1/2 del inglés *Mitogen activated protein kinase kinase*) [163, 165, 179]. En macrófagos RAW tratados con albúmina glicada hay un aumento en la activación de NF- κ B dependiente de ERK 1/2 [152].

En HUVEC tratadas con albúmina glicada se incrementa la expresión de E-selectina, de forma parcialmente dependiente de PI3K y totalmente dependiente de IKK [170].

Por otro lado, éstas y otras rutas pueden regular la activación o la expresión de las subunidades de NADPH oxidasa. Park et al. observó un aumento de la subunidad Nox4 en presencia de radiación y esta expresión estaba regulada por p38 y PI3K [180]. Se han descrito varias rutas que en la célula endotelial pueden activar las NADPH oxidasas: las isoformas de la PKC, las Src cinasas, la PI3K, Akt, MAP-cinasas incluyendo la p38 MAPK, cinasa N-terminal c-Jun/Proteína cinasa activada por estrés (JNK/SAPK del inglés *c-Jun N-terminal kinases/Stress-activated protein kinase*), ERK y cinasa activada-p21 (PAK del inglés *p21 activated kinase*) [8].

En definitiva, como hemos visto a lo largo de esta introducción, la disfunción endotelial se relaciona con los factores de riesgo y participa en las distintas patologías cardiovasculares. Uno de los factores con mayor importancia en estas enfermedades es la *diabetes mellitus*. Tanto los pacientes diabéticos como los distintos modelos experimentales de diabetes manifiestan características que pueden llevar a la pérdida de la función endotelial a través de varios mecanismos moleculares, todos ellos relacionados con las altas concentraciones de glucosa circulante. De entre estos mecanismos, la glicación no enzimática de proteínas, es el que más se ha asociado con las enfermedades cardiovasculares. Numerosos estudios han observado los efectos de los AGE en distintos modelos en relación con la disfunción endotelial. Sin embargo, las formas más abundantes de las proteínas glicadas, tanto *in vivo* como *in vitro*, son los productos de Amadori, que se encuentran en una fase intermedia de glicación y que tienen sus propios efectos biológicos. Por otro lado, el estrés oxidativo tiene un gran papel en la disfunción endotelial, participando en la mayoría de los cambios que sufre la célula endotelial. Numerosos estudios han asociado la diabetes y las proteínas con glicaciones no enzimáticas con un aumento del estrés oxidativo. La NADPH oxidasa es la fuente más importante de especies reactivas del oxígeno en el tejido vascular viéndose, además, aumentada su activación y su expresión en la diabetes. Los productos de Amadori pueden aumentar la producción de ROS a través de la NADPH oxidasa, pero sin embargo, se sabe poco sobre como esta regulación es llevada a cabo. Conocer estas rutas de señalización intracelular permitiría saber más sobre como se inicia la disfunción endotelial relacionada con la diabetes y como, en el futuro, se podría avanzar en el tratamiento de estos pacientes.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

- Las proteínas glicadas no enzimáticamente pueden ser el principal mecanismo de la disfunción endotelial causada por la diabetes.

- De las proteínas glicadas, la albúmina con modificaciones de Amadori, puede ser el principal agente para iniciar la disfunción endotelial que conduzca a los problemas vasculares diabéticos.

- La albúmina glicada puede incrementar el estrés oxidativo a nivel vascular.

- La albúmina glicada puede alterar la biodisponibilidad del óxido nítrico procedente del endotelio.

- La albúmina glicada puede alterar la respuesta inflamatoria de las células endoteliales.

Objetivo general:

- Determinar si los productos de Amadori (albúmina glicada) pueden producir disfunción endotelial y cuales son los mecanismos implicados.

Objetivos específicos:

- Medir el efecto de la albúmina glicada en la producción de ROS, tanto a nivel intracelular como extracelular, en la célula endotelial humana en cultivo.

- Establecer el papel de las NADPH oxidasas endoteliales en la producción de ROS.

- Analizar los cambios fenotípicos inducidos por la albúmina glicada en las distintas subunidades de NADPH oxidasa endotelial.

- Determinar la vía de señalización activada por la albúmina glicada que conduce a la producción de ROS.

Hipótesis y objetivos

- Definir el efecto de la albúmina glicada sobre la óxido nítrico sintasa endotelial en cuanto a posibles cambios de expresión e inducción de desacoplamiento.

- Cuantificar la producción de moléculas de adhesión y citocinas inflamatorias en la célula endotelial humana en presencia de albúmina glicada.

Material y métodos

Material y métodos

Cultivo de HUVEC

Las HUVEC fueron aisladas de cordones umbilicales frescos de embarazos llevados a término, donados bajo consentimiento informado de las madres. Todos los procedimientos relacionados con la obtención, manejo y eliminación de los cordones y de las células extraídas de ellos fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica de Galicia (España), de acuerdo con la Declaración de la Asociación Médica Mundial de Helsinki. Todos los cordones umbilicales que se recibieron han sido tratados de forma anónima, no teniendo ninguna información de los donantes. De forma resumida, las venas umbilicales fueron lavadas de sangre y llenadas con colagenasa IA 22 U/mL (Gibco, Invitrogen, Barcelona, España) en una solución tamponada con HEPES (HBS del inglés *HEPES buffered saline*) de la siguiente composición (en mM): NaCl 110,0, KCl 5,0, NaH₂PO₄ 0,5, KH₂PO₄ 0,5, CaCl₂ 0,2, MgCl₂ 2,0, NaHCO₃ 10,0, sal tetrasódica del ácido etilenediaminatetraacético 0,5 (EDTA del inglés *Ethylendiaminetetraacetic acid tetrasodium salt*), ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazineetanosulfónico (HEPES del inglés *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*) 10,0 y glucosa 10,0 (pH 7,4). Después de 6 minutos de digestión a 37°C, las células endoteliales fueron recogidas y lavadas con medio de cultivo (PAA, Pasching, Austria). A continuación fueron centrifugadas a 500 x g durante 5 minutos, resuspendidas en medio de crecimiento endotelial (PAA) suplementado con β -factor de crecimiento endotelial (EGF- β) 10 ng/mL (Sigma-Aldrich, Madrid, España), con heparina 10 μ g/mL (Mayne Pharma, Spain), con penicilina 100 U/mL (Laboratorios Normon, Madrid, España) y con estreptomina 100 μ g/mL (Laboratorio Reig Jofré, Barcelona, España). Finalmente, las HUVEC fueron cultivadas en frascos o placas (Corning, New York, USA) pre-recubiertas con gelatina al 0,2% (p/v) (Sigma-Aldrich) y crecidas hasta confluencia en una atmósfera saturada de humedad con CO₂ al 5% y a 37°C. Los cultivos confluentes fueron separados de la placa con tripsina al 0,25% (p/v) en solución equilibrada de Hanks (Gibco) con EDTA 1 mM y las células para los experimentos fueron usadas entre el cuarto y el décimo pase.

Para los experimentos, las HUVEC post-confluentes fueron tripsinizadas y puestas a una concentración de 30.000 células por cm^2 , con medio endotelial suplementado. Se realizó una privación de suplementos de 12 horas antes de los experimentos y las HUVEC quiescentes fueron tratadas como se indica más adelante. Todas las incubaciones se realizaron a 37°C en ambiente húmedo con CO_2 al 5%.

Caracterización de las células endoteliales

Alrededor de 10.000 HUVEC obtenidas como se describe anteriormente, fueron crecidas sobre un portaobjetos estéril recubierto con gelatina al 0,2% y luego fijadas con una mezcla de acetona:metanol (1:1) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se bloqueó la actividad peroxidasa en estas preparaciones con peróxido de hidrógeno al 3%, se incubó con anticuerpo policlonal de conejo contra el factor de von Willebrand (Dako Cytomation, BD Biosciences, Madrid, España) o monoclonal de ratón contra el CD31 a una dilución de 1:10 (Dako Cytomation) durante 30 minutos. La detección se realizó con un sistema marcado con biotina estreptavidina (Dako Cytomation) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esto es, después de la incubación con el anticuerpo primario o sin él para el control negativo, se incubó con biotina durante 15 minutos y a continuación con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano durante 15 minutos. Finalmente, el sustrato cromógeno de la peroxidasa (diamino bencidina) se añadió durante 10 minutos. Antes del montaje, las muestras fueron sumergidas 3 segundos en hematoxilina de Harris para contrateñimiento. Los correspondientes controles negativos de cada muestra fueron preparados sustituyendo el anticuerpo primario por solución de tampón fosfato. Las preparaciones fueron observadas y fotografiadas con un microscopio óptico (Leica Microsystems GMBH, Wetzlar, Alemania).

Medida de la proliferación celular

Este experimento permite determinar la actividad metabólica de las células en función de una reacción colorimétrica. Para ello se utiliza el MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-1]-2,5-difeniltetrazolio bromuro; Sigma-Aldrich), una sal de color amarillo que la célula metaboliza mediante acción de la deshidrogenasa mitocondrial. La metabolización de esta sal supone la formación de unos cristales denominados formazán que presentan un grupo diazónico que

absorbe la luz a 550 nm. La metabolización de MTT a formazán solo va a tener lugar en las células vivas, y supone un cambio de color de amarillo a violeta. La solubilización de los cristales de formazán resultará en una solución coloreada que puede ser analizada mediante un espectrofotómetro. Un incremento en el número de células vivas supone un aumento en la actividad total de las deshidrogenasas mitocondriales. Este aumento se correlaciona directamente con la cantidad de formazán violeta formado.

Así, 10.000 HUVEC por pocillo sembradas en placa de 96 pocillos se privaron durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, las células se trataron durante 12 horas más con distintas concentraciones de albúmina glicada o sin glicar (25-800 µg/mL). Al finalizar el tiempo de tratamiento se añadieron 10 µL de la sal MTT por 100 µL de tratamiento a cada uno de los pocillos, de forma que la concentración final de la sal fue de 0,5 mg/ml. Se dejó reaccionar dentro del incubador a 37 °C durante 4 horas. En ese momento se añadieron 100 µl de agente solubilizante, el cual contiene dodecil sulfato de sodio (SDS, del inglés *sodium dodecyl sulfate*) al 10% (p/v) en una solución de HCl 0,01 M), y se mantuvo en el incubador durante toda la noche. Al día siguiente, se determinaron los valores de absorbancia mediante la lectura en un lector de microplacas (VersaMax Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA) a una longitud de onda de 550 nm.

Medida de ROS en HUVEC

La producción de ROS extracelular e intracelular de las HUVEC fue medida usando dos métodos diferentes. La formación de aniones superóxido en el espacio extracelular fue determinada por el método de la reducción del citocromo c. 10.000 HUVEC por pocillo de microplacas de 96, privadas durante 12 horas de suplementos y se trataron con albúmina sérica humana (HSA del inglés *human serum albumin*) o albúmina sérica humana glicada (gHSA del inglés *glycated human serum albumin*) a distintas concentraciones entre 6 y 800 µg/mL. Además se realizaron tratamientos combinados con inhibidores como con la apocinina 100 µM, el BAY11-7082 2µM, el SP600125 20µM, el LY-294002 1,5 µM, el SL327 10 µM o el metil éster de L-N^G-Nitroarginina (L-NAME, del inglés *L-N^G-Nitroarginine methyl ester*) 100 µM durante distintos tiempos, estando estos comprendidos entre 4 y 12 horas. En

el caso de los inhibidores, éstos fueron preincubados 30 minutos antes del tratamiento con las albúminas y en presencia de éstas. También se realizaron experimentos con distinto número de células por pocillo (7.500, 10.000, 12.000 y 15.000) tratadas con HSA o gHSA 25 µg/mL durante 4 horas.

Tras los tratamientos, las HUVEC en las microplacas de 96 pocillos fueron incubadas con HBS suplementado con CaCl_2 1,5mM (HBS rico en calcio) y conteniendo citocromo c (200µM). La selectividad de la medida para el anión superóxido fue confirmada por la adición en una serie de experimentos de la SOD 100 U/mL, un catalizador enzimático específico de estos aniones. En otros experimentos, la medida de ROS se realizó en presencia del inhibidor de la flavoproteína, DPI 60µM, para comprobar la dependencia de la medida respecto a la NADPH oxidasa. La producción de aniones superóxido fue inducida por la adición de β-nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH, 100 µM) o la β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH, 100 µM). La reducción del citocromo c fue monitorizada leyendo a una absorbancia de 550 nm en un lector de microplacas (VersaMax Microplate Reader, Molecular Devices) durante 60 minutos a 37°C para obtener la velocidad de variación de la absorbancia a 550nm ($\Delta\text{Abs}_{550\text{nm}}/\text{min}$) para cada experimento. La producción de aniones superóxido fue calculada a partir de la diferencia entre las pendientes ($\Delta\text{Abs}_{550\text{nm}}/\text{min}$) obtenidas en ausencia y en presencia de SOD y teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar para el cambio de ferricitocromo c a ferrocitocromo c. ($\epsilon_{550\text{nm}} = 21.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Los productos de Amadori pueden autooxidarse y reducir el ferricitocromo c [181]. Por lo tanto, nos aseguramos de que la gHSA tras el tratamiento no estuviera presente en el momento de medir la reducción del citocromo c.

La producción intracelular de ROS en HUVEC fue medida por fluorescencia a partir del 5(6)-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato (cH₂-DCF-DA, Sigma-Aldrich) usando un lector de fluorescencia para microplacas (Fluostar Optima, BMG LABTECH, Madrid, España). Así, 10.000 HUVEC por pocillo, obtenidas por digestión con tripsina de un cultivo confluyente fueron sembradas en microplacas de 96 pocillos pre-recubiertas con gelatina al 0,2%. Después de adherirse, las células fueron deprivadas de suplementos durante

12 horas y tratadas con HSA o gHSA 25 µg/mL durante 4 ó 6 horas. Después de los tratamientos, el medio fue aspirado y las células lavadas con HBS rico en calcio previamente a la incubación con cH₂-DCF-DA 5µM durante 20 minutos a 37°C en la oscuridad. Este compuesto es una molécula no cargada que difunde al interior de las células, donde las esterasas no específicas cortan los grupos lipofílicos bloqueantes, convirtiendo a la molécula en una forma cargada que permanecerá en el interior de las células. La oxidación de esta sonda (cH₂-DCF-DA) se puede detectar por aumento de la fluorescencia de la forma oxidada. El exceso en el tampón de carga del cH₂-DCF-DA fue lavado tras la incubación y las células fueron puestas en el lector a 37°C. La generación de ROS fue detectada como resultado de la oxidación del cH₂-DCF-DA (excitación 485 nm; emisión 520 nm). La fluorescencia fue medida cada 5 minutos durante 2 horas y la variación de unidades relativas de fluorescencia por minuto fue calculada para cada muestra. Cada experimento fue realizado por sextuplicado y el cálculo de la variación de la fluorescencia para cada tratamiento es el valor medio de 3 experimentos independientes.

Estudio del nivel de expresión mediante RT-PCR en tiempo real

Después de tratar 300.000 células por pocillo de microplacas de 6, el medio de cultivo de las células fue aspirado y las células que flotaban retiradas. El ARN total fue obtenido con un kit de extracción llamado Nucleospin (Macherey-Nagel) de acuerdo con el protocolo del fabricante y finalmente cuantificado con un espectrofotómetro (Nanodrop ND-100, Thermo Fischer, Waltham, Massachusetts, USA). Un µg de ARN total aislado fue transcrito de forma reversa en un volumen total de 30 µL, usando iniciadores aleatorios y la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina Moloney (MMLV, del inglés *Moloney murine leukemia virus*; Thermo Fischer) durante 50 minutos a 37°C y 15 minutos a 42°C seguidos de 5 minutos a 95°C para inactivar la transcriptasa reversa. A continuación, 1 ó 2 µL de ADN complementario obtenido fue amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés *polymerase chain reaction*) en un termociclador con detector a tiempo real (Chromo4 PTC-200, MJ Research, Bio-Rad, Madrid, España) en una mezcla de reacción (20 µL) conteniendo 10 µL de FastStart SYBR Green Master (Roche, Mannheim, Alemania) y 100 mM de cada uno de los iniciadores. La lectura de fluorescencia del SYBR Green I fue realizada

después de cada ciclo de amplificación. Las curvas de fusión fueron realizadas al final de cada PCR desde 75 a 95 °C con pasos de 1 °C y 1 segundo. Los niveles de ARN mensajero fueron determinados de esta forma por duplicado para cada uno de los ARN totales independientemente preparados. La cuantificación se hizo de forma relativa haciendo el cálculo a partir de la diferencia comparativa con un gen constitutivo (*housekeeping*), de acuerdo con la siguiente ecuación: $R = 2^{-[\Delta Ct_{\text{muestra}} - \Delta Ct_{\text{control}}]}$, donde Ct es el valor del ciclo umbral a partir del cual se detecta la amplificación del ADN complementario. Nosotros utilizamos β -actina como gen constitutivo.

Los números de identificación de los genes en la base de datos *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), secuencias para los iniciadores para sentido (S) y el antisentido (A), las condiciones de la PCR, el número de ciclos y la longitud del fragmento de amplificación están indicados en la Tabla 3.

Tabla 3. Información de los iniciadores y las condiciones de amplificación de cada gen para la RT-qPCR.

Número de referencia NCBI	Secuencia	PCR	Ciclos	Tamaño del producto
Nox1 (humano) NM_007052.3	S: ttaacagcacgctgatcctg	30 s, 95 °C	40	244 pb
	A: ctggagagaatggaggcaag	30 s, 60 °C		
		30 s, 72 °C		
Nox2 (humano) NM_000397.3	S: tcacttctccacccaaaacc	30 s, 95 °C	40	211 pb
	A: gggattgggcattccttat	30 s, 60 °C		
		30 s, 72 °C		
Nox3 (humano) NM_015718.1	S: aggcctgtggtctgtatg	30 s, 95 °C	40	239 pb
	A: gcacgctgaaaagtctcc	30 s, 60 °C		
		30 s, 72 °C		
Nox4 (humano) NM_016931.2	S: ctccgttggttcagatt	30 s, 95 °C	40	245 pb
	A: tgggtccacaacagaaaaca	30 s, 60 °C		
		30 s, 72 °C		
Nox5 (humano) NM_024505.2	S: ctacgtgtagtggggctgt	30 s, 95 °C	40	213 pb
	A: atgcaggaactggagcagat	30 s, 62 °C		
		30 s, 72 °C		
P22phox (humano) NM_000101.2	S: cgcttcaccagtggtactt	30 s, 95 °C	40	200 pb
	A: gagagcaggagatgcaggac	30 s, 60 °C		
		30 s, 72 °C		
β-actin (humano) NM_001101.2	S: ttctgaccatgcccacat	30 s, 95 °C	40	149 pb
	A: atggatgatgatatcgccgcgctc	30 s, 60/62 °C		
		30 s, 72 °C		
NOS3 (humano) NM_000603.4	S: accctcaccgctacaacatc	30 s, 95 °C	40	198 pb
	A: gctcattctccagggtcttc	30 s, 58 °C		
		30 s, 72 °C		
CCL2 (humano) NM_002982.3	S: caaactgaagctcgactctc	30 s, 95 °C	40	300 pb
	A: gctgcagattctgggtgtg	30 s, 58 °C		
		30 s, 72 °C		
VCAM-1 (humano) NM_001078.3	S: tccgtctcattgacttcag	30 s, 95 °C	40	207 pb
	A: cacctggattcctttcca	30 s, 60 °C		
		30 s, 72 °C		
ICAM-1 (humano) NM_000201.2	S: gagatcaccatggagccaat	30 s, 95 °C	40	259 pb
	A: actgtgggttcaacctctg	30 s, 60 °C		
		30 s, 72 °C		

Subunidades de la NADPH oxidasa: Nox1-5, p22phox; β -actina: B-actin; NOS3: óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS); CCL2: Molécula quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1); VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular-1; ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1.

Electroforesis en gel de agarosa

Para estudiar la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa de una manera cualitativa se realizó una PCR en las condiciones descritas en el apartado anterior. Los productos de esta reacción de PCR se separaron por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1% (p/v). Se preparó diluyendo 1g de agarosa (Sigma-Aldrich) en un tampón EDTA-ácido bórico tris (TBE del inglés *Tris Boric acid EDTA*) de la siguiente composición (en mM): tris(hidroximetil)aminometano 50 (Roche), ácido bórico 40 (J.T.Baker, Phillipsburg, New Jersey, USA) y EDTA 0,636 (AcBiochem, Malvern, Pennsylvania, USA). La suspensión se calentó hasta su total disolución y se dejó gelificar en la cubeta apropiada durante 30 minutos en presencia de bromuro de etidio a una concentración final de 62,5 ng/mL. Para cargar el gel, los productos de PCR se mezclaron en proporción 5:1 con un tampón de la siguiente composición: sacarosa 400 g/L (Sigma-Aldrich) y naranja de acridina 2,5 g/L (Sigma-Aldrich). Para conocer el tamaño del producto amplificado se comparó con el marcador de peso molecular Hyperladder II con un rango de 50-2000 pb (Bioline, London, United Kingdom). El gel cargado de esta manera se sometió a una electroforesis en TBE a 120 voltios y 100 mA durante 1 hora. Tras este tiempo se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta con cámara digital acoplada (EC3 Imaging System, UVP, Upland California, USA).

Inmunofluorescencia celular

Aproximadamente 10.000 HUVEC fueron sembradas en cubreobjetos estériles de 12 mm pre-recubiertas de gelatina al 0,2% (p/v) en medio completo de crecimiento endotelial. Se privaron de suplementos durante 12 horas y se trataron con HSA o gHSA 25 μ g/mL durante 4 ó 6 horas. Después de los tratamientos, el medio fue aspirado y las células fueron lavadas con una solución tampón salino fosfato (PBS, del inglés *Phosphate buffered saline*) de la siguiente composición (en mM): Na_2HPO_4 13,00, KCl 2,60, KH_2PO_4 0,14 y NaCl 137,00 a pH 7,4. Las células fueron fijadas con una mezcla de metanol:acetona (1:1, 10 minutos) y lavadas con PBS (3 x 5 minutos) antes de

la permeabilización de la membrana con triton X-100 al 0,2% (v/v) en PBS (10 minutos). Después de lavar con PBS (3 x 5 minutos) fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina al 4% (p/v) en PBS (50 minutos a 37°C). Las células fueron lavadas con PBS-Tween 20 al 0,05% (v/v) (PBS-T, 3 x 5 minutos) e incubadas con un anticuerpo policlonal de cabra contra Nox4 (1:10, SantaCruz Biotechnology, California, USA) toda la noche a 4°C. Al siguiente día, las células fueron lavadas con PBS-T (3 x 5 minutos) e incubadas con anticuerpo de burro contra IgG de cabra conjugado con fluoresceína isotiocianato (FITC; 1:200, Santacruz Biotechnology) durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células fueron lavadas con PBS-T (3 x 5 minutos) e incubadas con TO-PRO[®]-3 (1:250, Invitrogen) 5 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad para teñir el núcleo. Tras esto, las células fueron lavadas con PBS-T (3 x 5 minutos) y montadas en portaobjetos con Mowiol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las preparaciones con las células fueron visualizadas con un microscopio invertido Leica DMIRE 2 (Leica Microsistemas) y equipado con Leica TCS SP 2 (con AOB[®]) y configuración confocal. Las muestras se examinaron usando el láser de argon (488 nm) o el láser de Helio/Neon en haces de 543-nm o 633-nm con los filtros de paso de banda de 515/20 nm, 585/30 nm y 660/20, respectivamente. En los experimentos con doble marcaje de FITC y TO-PRO[®]-3 las imágenes fueron escaneadas secuencialmente y combinadas usando el Software Confocal de Leica. Imágenes de 512x512 píxeles de todas las muestras en las series dadas fueron recogidas con barridos rápidos de parámetros idénticos tales como la ganancia de voltaje, la sensibilidad, el contraste y el brillo. Al menos cinco imágenes de cada muestra fueron seleccionadas aleatoriamente de la preparación y la intensidad de la fluorescencia fue tomada de la superficie total de la célula o de localizaciones específicas de ella. Los valores de fluorescencia medios para cada tratamiento fueron calculados después de sustraer la señal de fondo y los resultados de diferentes tratamientos fueron comparados entre sí. Los controles sin anticuerpo primario no mostraron marcaje fluorescente.

Fraccionamiento de la proteína de núcleo y citoplasma

Después de la privación de suplementos de 12 horas y el tratamiento farmacológico de las HUVEC, el medio de cultivo fue retirado y las células que flotaban retiradas y las adheridas lavadas con PBS. Estas células fueron

lisadas con un tampón A compuesto por HEPES 10 mM, EDTA 1 mM, KCl 10 mM, ditioneitol (DTT) 1mM y antiproteasas (Roche) a un pH de 7,9. Al extracto celular se le añadió NP-40 0,5% (v/v) y se incubó durante 10 minutos. Seguidamente fue agitado en un vórtex durante 15 segundos y cada muestra centrifugada durante 5 minutos a 200 x g y 4 °C para separar las células no lisadas. El sobrenadante se recuperó, se centrifugó de nuevo durante 15 minutos a 1500 x g y a 4 °C. Así se obtienen las proteínas citoplasmáticas en el sobrenadante y las proteínas nucleares en el pellet. El sobrenadante se separa a otros tubos y se lisaron los núcleos con el tampón A anteriormente descrito añadiéndole glicerol 20% y KCl 0,4 M. Se incubó durante 30 minutos con agitación periódica y luego se centrifugan durante 15 minutos a 13.000 x g y 4 °C. En el sobrenadante se obtuvieron las proteínas nucleares.

Estudio de las fracciones de proteínas del núcleo y el citoplasma mediante *Western Blot*

El análisis de la composición de las fracciones proteicas procedentes del núcleo y el citoplasma se realizó mediante *Western blot*. Las fracciones subcelulares se separaron por electroforesis en gel de acrilamida desnaturante (SDS-PAGE, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) al 10% y las proteínas así separadas se transfirieron a una membrana de polivinilideno difluoruro (PVDF, del inglés *Polyvinylidene difluoride*) también por electroforesis durante 45 minutos a intensidad constante (280 mA). Las membranas de PVDF fueron bloqueadas durante 1 hora a temperatura ambiente con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en tampón salino con tween 20 (TBS-T del inglés *Tris-buffered saline Tween-20*) conteniendo Tris-HCl 20 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM y Tween-20 al 0,1%. Tras el bloqueo de los puntos activos inespecíficos de la membrana se incubó ésta con anticuerpos para la subunidad p65 de NF-κB (Santacruz Biotechnology) en una dilución 1:500 en tampón de bloqueo durante toda la noche. Después, se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario apropiado, conjugado con peroxidasa. Las proteínas inmunoreactivas fueron visualizadas usando un sistema de detección de quimioluminiscencia mejorada (Pierce), y fueron cuantificadas densitométricamente usando el software ImageJ (*U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA*). Los resultados se expresaron de acuerdo a la siguiente fórmula de densidades ópticas de las bandas

procedentes de cada tratamiento y subfracción celular: (núcleo/citoplasma)gHSA/(núcleo/citoplasma)HSA. Se comprobó que las fracciones nucleares no se encontraban contaminadas con citoplasma, midiendo la presencia de deshidrogenasa 3-fosfato gliceraldehído (GAPDH del inglés *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) con un anticuerpo contra esta proteína 1:1000 (SantaCruz Biotechnology).

Cuantificación de proteína en medio de cultivo mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

Para cuantificar la concentración de las distintas citocinas inflamatorias en el medio de cultivo se realizó un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Se trataron las HUVEC con HSA o gHSA 25 µg/mL, con BAY11-7082 2 µM, SP600125 20 µM, LY-294002 1,5 µM, SL327 10 µM, apocinina 100 µM o plumbagin 5 µM durante 2, 4, 6, 8 ó 12 horas. Tras el tiempo de tratamiento se recogieron los medios de cultivo para realizar el ELISA para la MCP-1 (Bender MedSystems GMBH, Viena, Austria). El ELISA de MCP-1 tiene los pocillos de la microplaca recubiertos con anticuerpos anti-MCP-1 humano. Sobre estos se incubaron los medios de cultivo de las células tratadas. A continuación, se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-MCP-1 conjugados con peroxidasa de rábano que se unieron al MCP-1 que quedó unido a los anticuerpos adsorbidos en el pocillo. Finalmente, se añadió el sustrato de la peroxidasa y la reacción dio un cambio de color proporcional a la cantidad de MCP-1 presente en los medios de cultivo. La reacción se paró añadiendo ácido y se midió la absorbancia a 450 nm (VersaMax Microplate Reader, Molecular Devices).

Fármacos y reactivos

Los siguientes fármacos fueron comprados a Sigma-Aldrich: el EGF-β, la gelatina de piel bovina, la HSA, la gHSA, la apocinina, el BAY11-7082, el SP600125, el LY-294002, el SL327, la L-NAME, el citocromo c, la SOD, el DPI, la NADH, la NADPH y el MTT. La cH₂-DCF-DA fue comprada a Invitrogen.

El BAY11-7082 (50 mM), el SP600125 (50 mM), el LY-294002 (1,5 mM), el SL327 (10 mM), y el cH₂-DCF-DA (10 mM) fueron disueltos inicialmente en dimetil sulfóxido (DMSO) puro a las concentraciones indicadas. Estas

soluciones fueron mantenidas a -20°C como soluciones *stock* a partir de las cuales se prepararon en el momento de los experimentos las diluciones finales utilizando en HBS rico en calcio. El DPI (10 mM) fue disuelto en una mezcla de DMSO:H₂O (1:1) y después diluido en HBS rico en calcio. El EGF- β (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fue disuelto en PBS con albúmina sérica bovina 0,1% (p/v) y después diluido en HBS rico en calcio. La gelatina 0,2% (p/v) para recubrir las superficies de cultivo fue disuelta en agua. La HSA (80 mg/mL), la gHSA (80 mg/mL) y el MTT (5 mg/mL) fueron disueltos en PBS. Después, la HSA y la gHSA fueron diluidas en HBS rico en calcio. La apocinina, el citocromo c, la SOD, la NADH y la NADPH fueron disueltos en HBS rico en calcio. El L-NAME fue disuelto en agua destilada y después en HBS rico en calcio.

Las concentraciones finales de DMSO nunca excedieron el 0,1% (v/v) en los experimentos, y se realizaron los controles adecuados para medir los efectos del vehículo. El equipamiento, los medios y reactivos específicos o anticuerpos empleados en las distintas técnicas se indican en las secciones correspondientes. Todos los demás compuestos usados en los experimentos y en la preparación de las soluciones de trabajo fueron de la mejor calidad comercialmente disponible.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como medias \pm error estándar de la media (e.e.m.). Las comparaciones entre dos grupos fueron analizadas por el *t* test de dos colas. Las comparaciones múltiples fueron analizadas por un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test Tukey. Las diferencias significativas fueron consideradas con $p < 0,05$.

Resultados

Resultados

Caracterización del modelo celular endotelial

Realizamos la extracción de las HUVEC según se indica en la sección metodológica y las sembramos en una superficie de cultivo de 19 cm². Realizamos pases consecutivos con tripsina doblando la superficie hasta alcanzar una superficie equivalente a 4 frascos de 75 cm². Realizamos todos los estudios y tratamientos a partir de las HUVEC desde el pase 4^o hasta el 10^o. A partir del pase 10^o, las células comenzaban a perder su fenotipo y la capacidad de replicación, con lo que no nos daban la fiabilidad necesaria en el modelo. Cada cultivo procedente de un cordón se individualizó con un número que permitiría anonimizar la muestra a partir de este punto. Los experimentos se realizaron con al menos tres cultivos diferentes. Realizamos análisis inmunocitoquímico a estas células para dos marcadores del fenotipo endotelial, el factor de von Willebrand y el CD31. Las células fueron positivas para ambos factores (Figura 4).

A continuación estudiamos qué subunidades de NADPH oxidasa están expresadas en nuestras células. Estudios anteriores describieron que las HUVEC expresan principalmente la Nox2 y la Nox4, estando esta última subunidad mucho más expresada [182]. Estudiamos la expresión de las distintas subunidades de la NADPH en HUVEC mediante reacción de la cadena de polimerasa en transcripción reversa (RT-PCR del inglés *Reverse transcription polymerase chain reaction*). Nuestros resultados indicaron que las subunidades que más se expresaban son la Nox4 y la p22phox (Figura 5). Para la Nox5 encontramos mucha menor expresión (Figura 5). A continuación, realizamos un análisis inmunocitoquímico para ver si este modelo celular expresaba la proteína para Nox4. Como se puede ver en la Figura 5, este análisis reveló la presencia de Nox4 en la totalidad de las HUVEC en cultivo siguiendo un patrón granular citoplasmático y perinuclear.

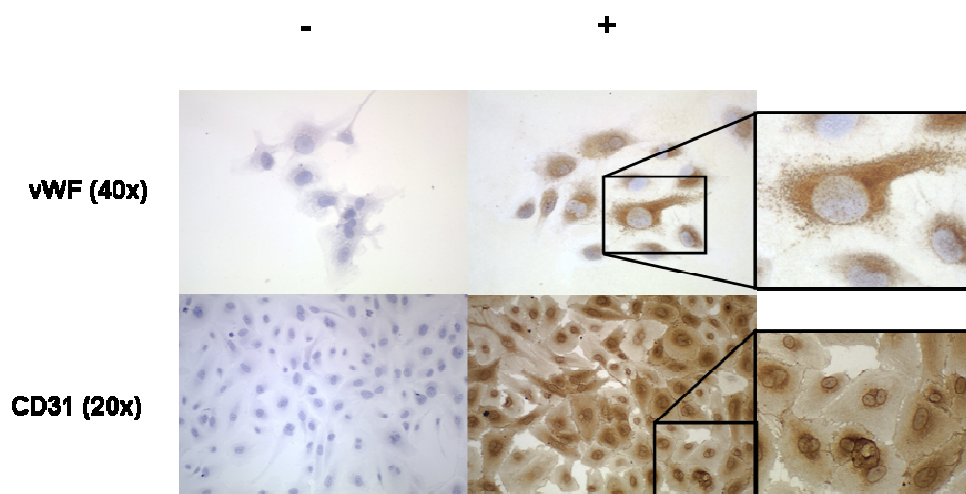


Figura 4: Imágenes representativas de tinciones inmunocitoquímicas para la expresión de marcadores del fenotipo endotelial en HUVEC, el factor de von Willebrand (vWF) y el CD31. Se sembraron 10.000 HUVEC sobre un portaobjetos estéril recubierto con gelatina al 0,2% y luego fijadas. Se incubaron con anticuerpos anti-factor de von Willebrand (vWF) y anti-CD31. Se contra-tiñeron con hematoxilina y fotografiadas en un microscopio óptico. Se indican los distintos aumentos a los que fueron tomadas las fotografías (40x y 20x respectivamente). Los controles negativos están situados en la columna de la izquierda, mientras la inmunocitoquímicas con los anticuerpos primarios están situada a la derecha.

Finalmente, analizamos la viabilidad de los tratamientos que íbamos a realizar con HSA o gHSA sobre las células en cultivo. Para esto realizamos experimentos de proliferación en presencia de MTT, en los que existe una relación directa entre la actividad de las reductasas de la mitocondria y la intensidad del color púrpura de la sal resultante. Estudiamos distintas concentraciones de HSA y gHSA (25-800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 12 horas y observamos que no cambiaban significativamente la viabilidad de nuestras células (Figura 6).

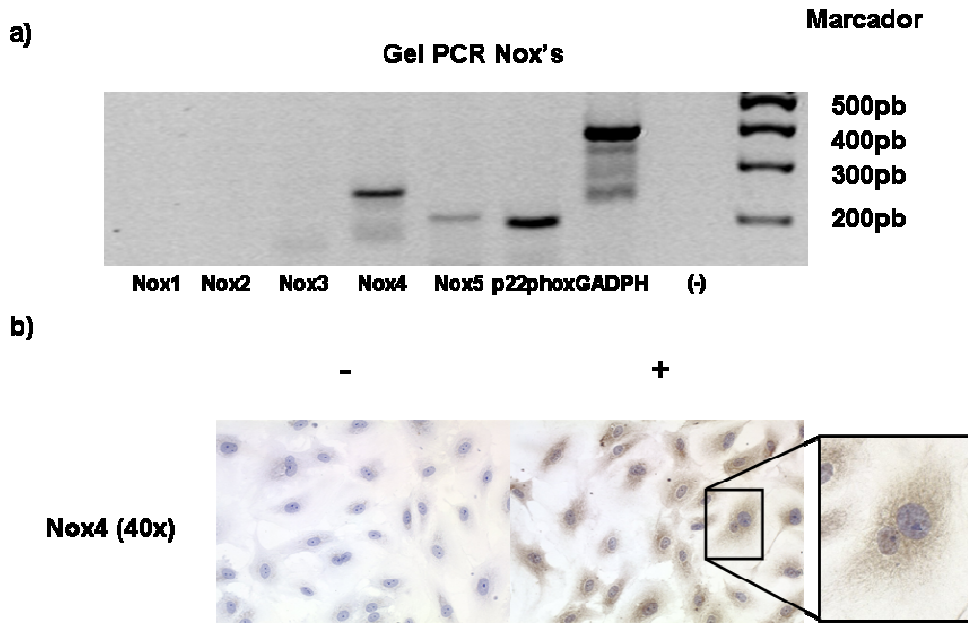


Figura 5: Expresión de las subunidades de NADPH oxidasa en HUVEC. a) Productos de amplificación por RT-PCR para distintas subunidades de NADPH oxidasa, Nox 1-5, p22phox, y también de la GAPDH partiendo de ARN de HUVEC. Se realizaron las distintas RT-PCR en las condiciones apropiadas y se realizó una electroforesis en gel de agarosa con los productos de amplificación. El marcador indica el número de bases que contiene cada producto de amplificación. Se incluyó un control negativo de la transcripción reversa (-). b) Imágenes representativas de inmunocitoquímicas para la expresión de la proteína Nox4. Se sembraron alrededor de 10.000 HUVEC sobre un portaobjetos estéril recubierto con gelatina al 0,2% y luego fijadas. Se incubaron con anticuerpos anti-Nox4 y se contra-tiñeron con hematoxilina para ser fotografiadas en un microscopio óptico (aumento 40x). Los controles negativos están situados a la izquierda, mientras que la inmunocitoquímicas con los anticuerpos primarios están situados a la derecha.

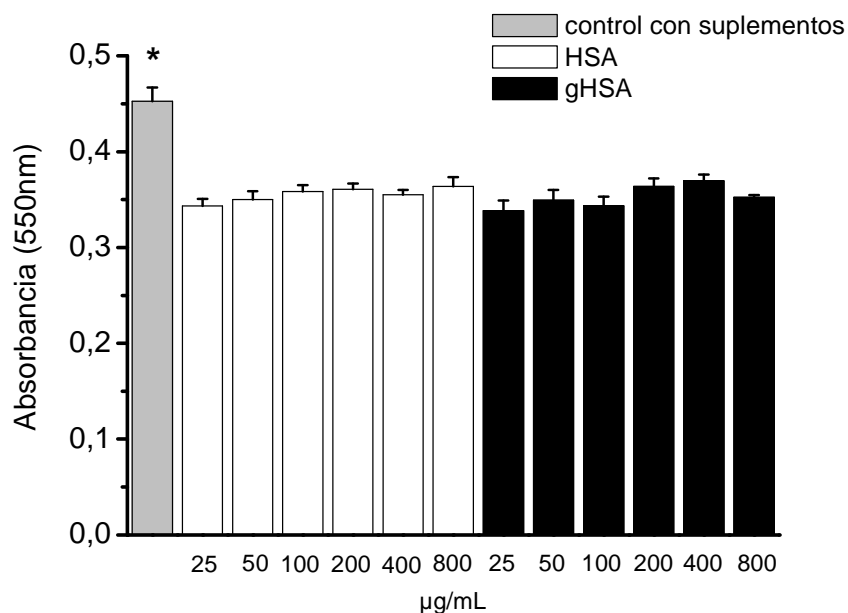


Figura 6: Medida de la proliferación celular mediante el ensayo con MTT en HUVEC tratadas con diferentes concentraciones de HSA y gHSA en medio privado de suplementos. Se sembraron 10.000 HUVEC por pocillo en placas de 96, se privaron de suplementos durante 12 horas y a continuación se trataron con distintas concentraciones de HSA y gHSA (25-800 µg/mL) durante 12 horas. Se mantuvieron los suplementos de algunos pocillos de HUVEC durante la privación y el tratamiento, como control positivo de la proliferación. Las columnas representan la absorbancia medida a 550 nm, expresada como de media \pm e.e.m. (barras verticales) de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ del control positivo frente al resto de los tratamientos.

Producción de ROS en HUVEC tratadas con albúmina glicada

Antes de realizar los experimentos con la gHSA, estandarizamos las condiciones para realizar la medida de la reducción del citocromo c en HUVEC. La reducción de citocromo c basal, sin el estímulo de NADH o NADPH fue casi nula, mientras que en presencia de estas coenzimas se aumentó sustancialmente la producción de ROS. La capacidad para reducir el citocromo c para los dos sustratos no fue la misma, en presencia de NADH las HUVEC produjeron más ROS que con el NADPH ($6,53 \times 10^{-4} \pm 0,81 \times 10^{-4} \text{ Abs}_{550\text{nm}}/\text{min}$ para NADH frente a $5,4 \times 10^{-4} \pm 0,56 \times 10^{-4} \text{ Abs}_{550\text{nm}}/\text{min}$ para el NADPH). La producción de aniones superóxido también fue diferente para los dos sustratos, siendo también más alta para el NADH que para el NADPH ($52,1 \pm 6,3$ vs. $43,4 \pm 4,5 \text{ O}_2^- \text{ mM} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 10.000 \text{ células}^{-1}$, para NADH y NADPH, respectivamente). Después de estas observaciones, los siguientes experimentos se realizaron siempre con NADH (100 μM), en lugar de con NADPH, como coenzima para la producción de ROS.

Realizamos estudios sobre la respuesta de las HUVEC a distintas concentraciones y tiempos con gHSA en la producción de ROS extracelular mediante el método de reducción del citocromo c. Después de 12 horas de privación, tratamos 10.000 HUVEC por pocillo en placas de 96, con diferentes concentraciones de HSA o gHSA (6-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 4, 6 ó 12 horas para determinar la mejor concentración y tiempo de tratamiento para ser usado en el estudio.

El tratamiento con gHSA a distintas concentraciones comprendidas entre 25 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 12 horas indujo de manera significativa un incremento de la producción de ROS extracelular con respecto a la misma concentración de HSA (Figura 7; p.ej. $6,58 \times 10^{-4} \pm 0,72 \times 10^{-4} \text{ Abs}_{550\text{nm}}/\text{min}$, $n = 18$ y $7,11 \times 10^{-4} \pm 0,78 \times 10^{-4} \text{ Abs}_{550\text{nm}}/\text{min}$, $n=18$ para HSA y gHSA 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente; $p < 0,05$). Sorprendentemente, observamos el mayor incremento de la reducción del citocromo c con la concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($1,08 \pm 0,03$ para la razón gHSA/HSA, $p < 0,05$ con respecto al efecto de HSA, $n = 18$). La producción de ROS inducida por gHSA aumentó de una manera dependiente de la concentración hasta los 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de esta concentración, el incremento en la producción de ROS se redujo gradualmente

a medida que aumentaba la concentración de gHSA, hasta 200 µg/mL (Figura 7).

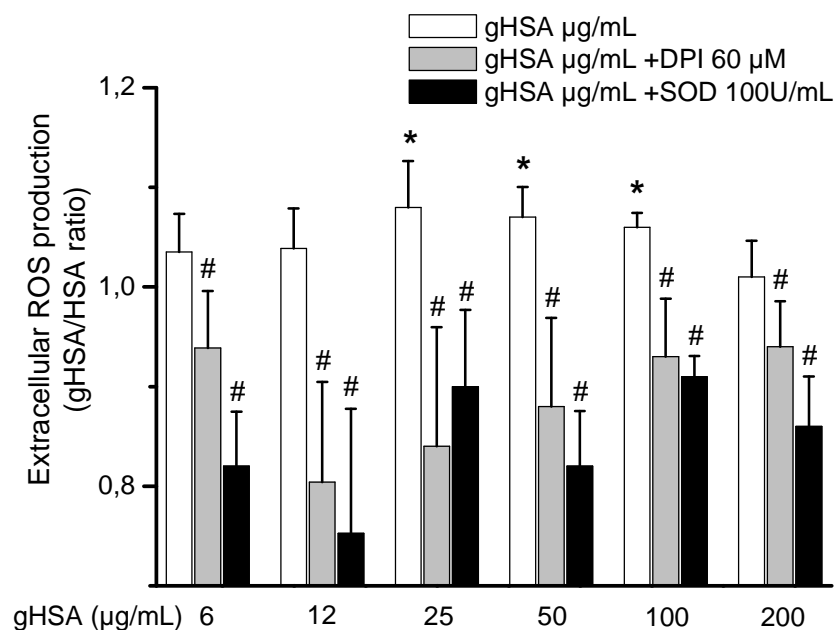


Figura 7: Medida de la producción extracelular de ROS en HUVEC a diferentes concentraciones de HSA y gHSA mediante el ensayo de reducción de citocromo c. Se sembraron 10.000 HUVEC por pocillo en placas de 96. Se privaron de suplementos durante 12 horas y a continuación se trataron con distintas concentraciones de HSA y gHSA (6-200 µg/mL) durante 12 horas. Se realizaron una serie de medidas de ROS en presencia de los inhibidores DPI 60 µM o SOD 100 U/mL, como se indica, que fueron siempre significativamente diferentes con respecto al correspondiente tratamiento con la gHSA ($p < 0,05$). Las columnas representan la razón de respuesta gHSA/HSA, expresada en valores de media \pm e.e.m. (barras verticales) de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ con respecto a los valores control (HSA). # $p < 0,05$ respecto al correspondiente tratamiento con gHSA solo. # $p < 0,05$ respecto al tratamiento sin inhibidor.

La producción de ROS fue inhibida en presencia de la SOD (100 U/mL) y del inhibidor de flavoproteínas como las NADPH oxidasa, DPI (60 μ M). Esto indicó que la reducción en el citocromo c se debía al anión superóxido y que la producción de este anión provenía de la NADPH oxidasa (10-25% de inhibición, Figura 7).

A raíz de estos resultados, estudiamos la producción extracelular de ROS inducida por las concentraciones más bajas de gHSA (6-50 μ g/mL) a diferentes tiempos. Después de 12 horas de privación de suplementos, las HUVEC quiescentes fueron tratadas con HSA y gHSA (6-50 μ g/mL) durante 4, 6 ó 12 horas. De nuevo, gHSA indujo una mayor producción de ROS que la misma concentración de HSA y con la concentración de 25 μ g/mL este aumento fue estadísticamente significativo para todos los tiempos ($1,12 \pm 0,05$ para la razón gHSA/HSA a 4horas, $p < 0,05$ con respecto al efecto de HSA, $n = 10$; $1,07 \pm 0,02$ para la razón gHSA/HSA a 6horas, $p < 0,05$ con respecto al efecto de HSA, $n = 10$; $1,07 \pm 0,03$ para la razón gHSA/HSA a 12horas, $p < 0,05$ con respecto al efecto de HSA, $n = 10$). También observamos que el efecto de gHSA era dependiente de la concentración; 25 μ g/mL fue la concentración que indujo la máxima producción de ROS a 4 horas, mientras que la producción de ROS inducida por gHSA a 6 y 12 horas se hacía gradualmente menor a medida que aumentaba el tiempo de tratamiento (Figura 8). De acuerdo con estos resultados, decidimos utilizar la concentración de 25 μ g/mL de gHSA durante 4 y 6 horas en los siguientes experimentos como modelo para analizar los efectos de la gHSA en la producción de ROS de HUVEC.

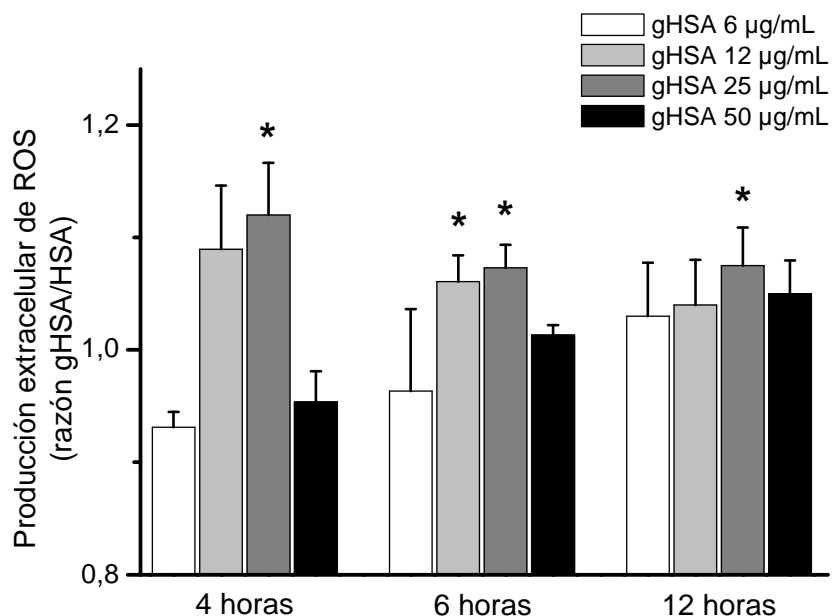


Figura 8: Medida de la producción extracelular de ROS en HUVEC a diferentes concentraciones y tiempos de HSA y gHSA mediante el ensayo de reducción de citocromo c. Se sembraron 10.000 HUVEC por pocillo en placa de 96, se privaron de suplementos durante 12 horas y a continuación se trataron con distintas concentraciones de HSA y gHSA (6-50 µg/mL) durante 4, 6 y 12 horas. Las columnas representan la razón gHSA/HSA expresada en valores de media \pm e.e.m. (barras verticales) de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ con respecto a los valores control (HSA).

Los efectos de la inhibición mantenida de la NADPH oxidasa fueron explorados a través de una aproximación farmacológica con apocinina. La incubación de HUVEC con apocinina (100 µM) durante 4 horas indujo un incremento significativo de la producción de ROS. Este efecto no fue observado en presencia de 25 µg/mL de HSA durante el tratamiento, pero la producción de ROS se incrementó cuando la apocinina fue combinada con 25µg/mL de gHSA, sugiriendo actividades sinérgicas/aditivas de la gHSA y la apocinina (Figura 9). La dependencia en esta respuesta de la NADPH oxidasa y el anión

superóxido fue confirmada por la inhibición de la producción de ROS con DPI o SOD, respectivamente (Figura 9).

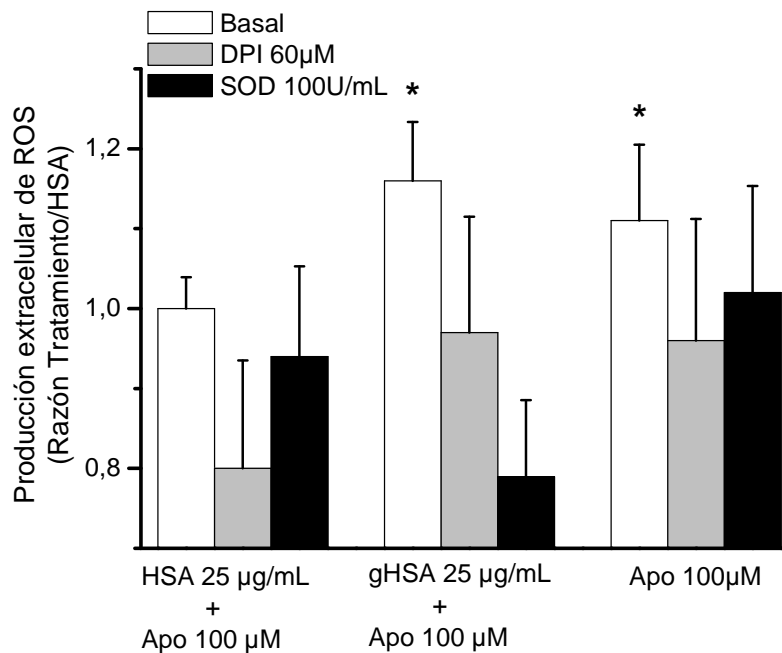


Figura 9: Medida de la producción extracelular de ROS en HUVEC en presencia de HSA o gHSA en presencia de apocinina, mediante el método de reducción del citocromo c. Se sembraron 10.000 HUVEC por pocillo en placas de 96, se privaron de suplementos durante 12 horas y a continuación se trataron con HSA o gHSA (25 µg/mL) en combinación con apocinina (APO 100 µM) o con apocinina sola durante 4 horas. Se realizaron las medidas de ROS en presencia de los inhibidores DPI (60 µM) o SOD (100 U/mL) según se indica. Las columnas representan la razón tratamientos/HSA para cada uno expresada en valores de media \pm e.e.m. (barras verticales) de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ con respecto a los valores control (HSA).

Tras estos resultados, quisimos comprobar el efecto de modificar el número de células en la producción de ROS, ya que la expresión de Nox4, una de las subunidades de la NADPH oxidasa, está condicionada por el nivel de confluencia de las células endoteliales [183]. Así, sembramos 7.500, 10.000, 12.000 y 15.000 HUVEC por pocillo en placa de 96 y las tratamos con las condiciones con las que encontramos más diferencias entre HSA y gHSA en la producción de ROS (25 µg/mL durante 4 horas). Además, observamos el papel de la inhibición de la NADPH oxidasa con DPI para saber el papel del enzima en la producción de ROS. Encontramos las máximas diferencias entre el tratamiento con HSA y con gHSA cuando teníamos 7.500 ($1,14 \pm 0,04$ para la razón gHSA/HSA con 7.500 células, $p < 0,05$ con respecto al efecto de HSA, $n = 3$) y 10.000 células por pocillo ($1,13 \pm 0,03$ para la razón gHSA/HSA con 10.000 células, $p < 0,05$ con respecto al efecto de HSA, $n = 3$) ver Figura 10. Por el contrario, la diferencia de producción de ROS entre HSA y gHSA se hace inexistente a mayor densidad celular (12.000 y 15.000 células por pocillo). Estos datos corresponden con la acción de Nox4, que en confluencia ve disminuida su expresión [183]. Además, la inhibición del DPI también se hace mayor cuando las HUVEC tienen un número que permite su proliferación (7.500 y 10.000 células por pocillo). El DPI alcanza el mayor porcentaje de inhibición en el tratamiento con gHSA 25 µg/mL durante 4 horas con 10.000 células por pocillo (32% de inhibición). Los datos sugieren que es una flavoproteína la que produce las ROS y que su actividad depende del grado de confluencia celular, algo que concuerda con la actividad de la subunidad Nox4 de la NADPH oxidasa, que también depende del grado de confluencia celular.

En cuanto a la producción intracelular de ROS, se estudió mediante la medición de la fluorescencia de la $\text{CH}_2\text{-DCF-DA}$, tal y como se describe en la sección metodológica.

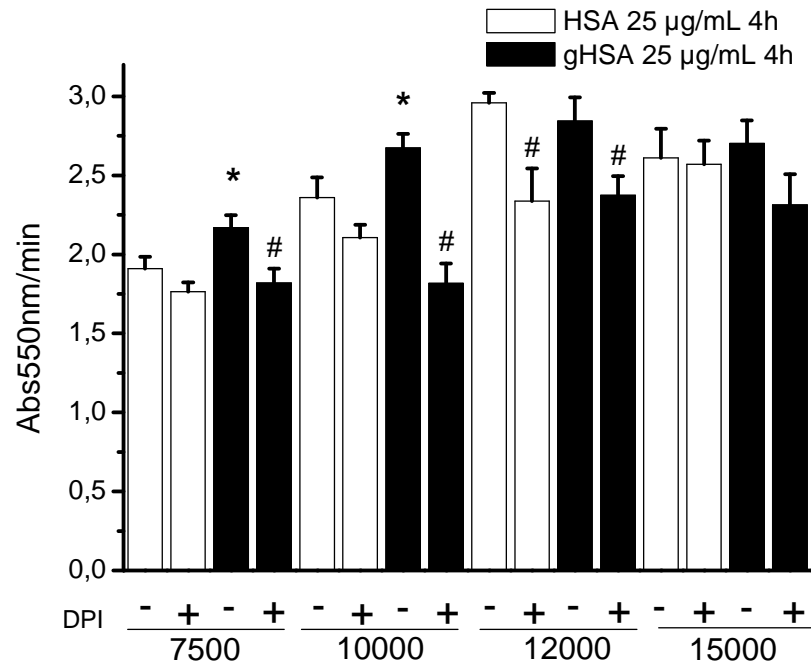


Figura 10: Medida de la producción extracelular de ROS en HUVEC cultivadas en distintos grados de confluencia. Se sembraron 7.500, 10.000, 12.000 o 15.000 HUVEC por pocillo en placas de 96, se privaron de suplementos durante 12 horas y a continuación se trataron con HSA o gHSA 25 µg/mL durante 4 horas. Se realizó la medida de la reducción de ROS en ausencia o presencia del inhibidor de la NADPH oxidasa, DPI (60 µM). Las columnas representan la razón gHSA/HSA expresada en valores de media ± e.e.m. (barras verticales) de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ con respecto a los valores control (HSA). # $p < 0,05$ con respecto al tratamiento sin inhibidor.

Estudiamos el efecto de la gHSA en la producción de ROS intracelulares. Después de una deprivación de 12 horas, tratamos 10.000 HUVEC por pocillo de una placa de 96 con 25 µg/mL de HSA o gHSA durante 4 ó 6 horas. Después del tratamiento, medimos la fluorescencia del cH₂-DCF-DA oxidado durante 2 horas. Observamos un aumento estadísticamente significativo en la oxidación del cH₂-DCF-DA en presencia de gHSA comparado con HSA después de 4 horas pero no después de 6 horas de tratamiento (Tabla 4). Estos resultados concuerdan con los obtenidos al medir ROS extracelulares.

La producción de ROS medida bajo estas condiciones fue apenas inhibida en presencia de la SOD (100 U/mL) e inhibida parcialmente por el DPI (60µM, Tabla 4). Estos datos indican dos cuestiones importantes: primero, la SOD probablemente fue incapaz de cruzar la membrana plasmática y en consecuencia no consiguió inhibir la producción de ROS intracelular. Segundo, la inhibición por el DPI sugiere que la producción intracelular de ROS proviene de la NADPH oxidasa.

Tabla 4: Producción intracelular de ROS medida con cH₂-DCF-DA en HUVEC incubadas con 25 µg/mL de HSA o gHSA y con SOD o DPI durante 4 ó 6 horas.

Trat		HSA 25 µg/mL		gHSA 25 µg/mL	
		SOD 100 U/mL	DPI 60µM	SOD 100 U/mL	DPI 60µM
4 h	100	98,77 ± 5.5	83,64 ± 3,73#	109,43 ± 4,29**	77,35 ± 7,60#
6 h	100	93,42 ± 8,08	83,08 ± 6,03#	103,46 ± 6,92	85,74 ± 8,74#

Albúmina sérica humana (HSA); Albúmina sérica humana glicada (gHSA); Superóxido dismutasa (SOD); Difenilén yodonio (DPI). Los datos se representan como porcentaje de la variación de unidades relativas de fluorescencia por minuto para el HSA ± el e.e.m. * $p < 0,05$ comparando gHSA con el tratamiento de HSA. # $p < 0,05$ comparando el tratamiento con y sin DPI.

Expresión de las subunidades de NADPH oxidasa en HUVEC tratadas con albúmina glicada

Como vimos, en las HUVEC el tratamiento con gHSA 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ incrementó la producción extracelular e intracelular de ROS. Las ROS producidas eran aniones superóxido y gracias a la inhibición con DPI, sabemos que éstos son producidos por la NADPH oxidasa. De modo que, una de las posibles causas de este aumento de la producción de ROS es un cambio en la expresión de las subunidades de NADPH oxidasa con el tratamiento de gHSA. De ahí que, estudiáramos la expresión de las principales subunidades de NADPH oxidasa en el endotelio humano, Nox4 y p22phox, mediante transcripción reversa y PCR cuantitativa (RT-qPCR).

Así, cuantificamos los niveles relativos de ARN mensajero de Nox4 y p22phox con respecto al gen de la β -actina. Los cultivos de HUVEC fueron privados de suplementos durante 12 horas, siendo tratados entonces con HSA y gHSA (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 4, 6 ó 12 horas. El tratamiento de 4 horas con gHSA (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) indujo una expresión aumentada de Nox4 y p22phox en comparación con el tratamiento con HSA (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 11) ($1,31 \pm 0,08$ vs. $1,16 \pm 0,09$ de cambio relativo para Nox4 respecto al control, con gHSA y HSA, respectivamente, $p < 0,05$, $n = 5$; $1,25 \pm 0,05$ vs. $1,04 \pm 0,07$ de cambio relativo para p22phox respecto al control, con gHSA y HSA, respectivamente, $p < 0,05$, $n = 4$). Por el contrario, los mismos tratamientos a 6 y 12 horas no inducen ningún cambio estadísticamente significativo (Figura 11).

Sorprendentemente, a pesar del hecho de que los efectos en la expresión de Nox4 por los tratamientos con HSA y gHSA durante 6 horas son indistinguibles entre ellos ($1,21 \pm 0,20$ vs. $1,24 \pm 0,28$ cambio relativo para Nox4 con respecto al control para HSA y gHSA, respectivamente, $p = 0,45$, $n = 4$), muestran una mayor expresión con respecto al control sin tratar, aunque estos aumentos no son estadísticamente significativos. Sucede lo mismo para el p22phox. No hubo diferencias de expresión entre los tratamientos de HSA y gHSA a las 6 horas, pero los niveles de expresión de Nox4 y p22phox se encontraron elevados respecto al control sin tratamiento ($1,23 \pm 0,20$ vs. $1,20 \pm 0,32$ cambio relativo para p22phox con respecto al control para HSA y gHSA, respectivamente, $p = 0,90$, $n = 4$).

Después de 12 horas de tratamiento con HSA y gHSA, los niveles de ARN mensajero para Nox4 y p22phox fueron iguales a los cultivos controles (cultivos sin tratamientos con HSA o gHSA), indicando que el efecto temprano de estimulación de gHSA o HSA en la expresión de los genes tiene un efecto limitado en el tiempo.

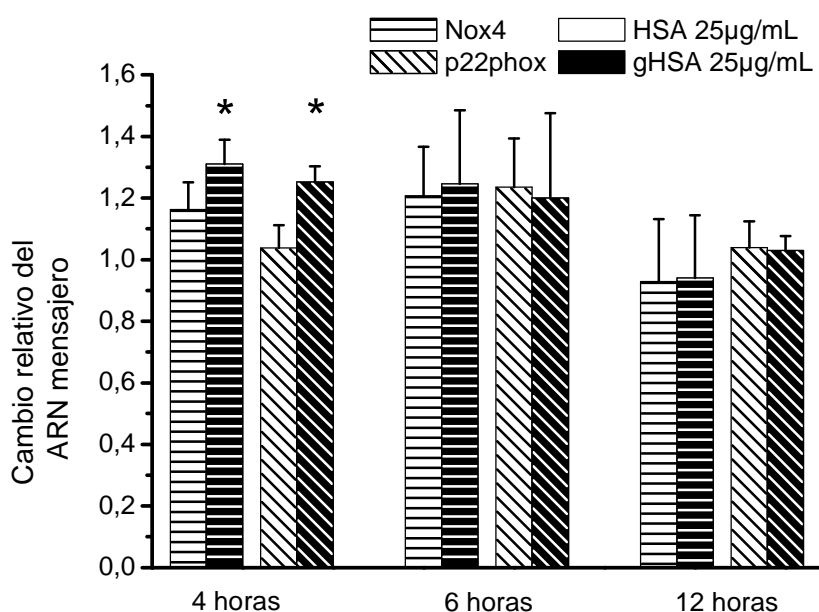


Figura 11: Cuantificación relativa de los niveles de expresión de ARN mensajero de las subunidades de NADPH oxidasa mediante RT-qPCR. Se sembraron 300.000 HUVEC por pocillo en placa de 6, se privaron de suplementos durante 12 horas y a continuación se trataron con HSA o gHSA 25 µg/mL durante 4, 6 ó 12 horas. Las columnas representan el cambio relativo de la expresión de ARN mensajero para Nox4 y p22phox relativizado frente al gen constitutivo β -actina y con respecto al tratamiento con HSA. Se expresan en valores de media \pm e.e.m. (barras verticales) de al menos tres experimentos diferentes. * $p < 0,05$ con respecto a los valores de la HSA.

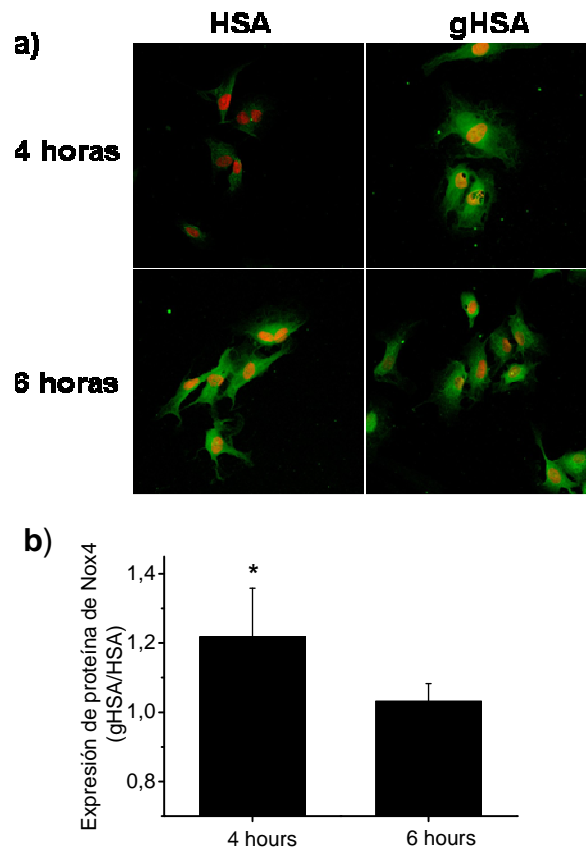


Figura 12: Niveles de proteína de Nox4 medido por inmunofluorescencia en HUVEC tratadas con HSA o gHSA 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 4 ó 6 horas. Se sembraron 10.000 HUVEC en un portaobjetos estéril recubierto con gelatina al 0,2%, se privaron de suplementos durante 12 horas y a continuación, se trataron con HSA y gHSA 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 4 ó 6 horas. a) Imágenes representativas del marcaje por inmunofluorescencia indirecta usando un anticuerpo contra Nox4 y anticuerpo secundario conjugado con FITC (verde) y TO-PRO-3[®] para teñir los núcleos (rojo). Se muestran los tratamientos con HSA (a la izquierda) o con gHSA (a la derecha) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. b) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia representada como la razón de gHSA/HSA a las 4 ó 6 horas. Las columnas representan valores de media \pm e.e.m. (barras verticales) de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ con respecto al control (HSA).

A continuación, estudiamos el efecto del tratamiento con gHSA en la expresión a nivel proteico de Nox4. Después de 12 horas de privación de suplementos, tratamos las HUVEC quiescentes con gHSA y HSA (25 µg/mL) durante 4 ó 6 horas. Las proteínas de Nox4 fueron cuantificadas por inmunofluorescencia en estas células. Observamos un incremento significativo en la expresión de Nox4 en las células tratadas con gHSA comparado con las células tratadas con HSA después de 4 horas de tratamiento (Figura 12). Estos datos indicaron que el tratamiento de 4 horas con 25 µg/mL de gHSA aumentó los niveles de proteína Nox4 en HUVEC comparado con el tratamiento con HSA. Sin embargo, a las 6 horas de tratamiento, los niveles de expresión de Nox4 en HUVEC tratadas con gHSA y HSA no fueron estadísticamente diferentes (Figura 12). Esto resultó coherente con los datos de expresión génica mostrados más arriba.

Rutas implicadas en el aumento de ROS por albúmina glicada

Ya describimos que observamos un incremento en la producción de ROS en las HUVEC tratadas con gHSA. Este aumento, además se puede explicar por un incremento en la expresión de las subunidades de Nox4 y p22phox de la NADPH oxidasa, ya que esta enzima tiene una actividad constitutiva y principalmente está regulada por sus niveles de expresión.

En este punto, nos propusimos estudiar la ruta de señalización activada por gHSA que puede estar implicada en el incremento de la producción de ROS. Para ello, estudiamos la reducción del citocromo c en HUVEC por el tratamiento con HSA o gHSA y en presencia de inhibidores del NF-κB (BAY11-7082 2µM), la AP-1 (SP600125 20µM), PI3K (LY294002 1,5µM) y la MEK 1/2 (SL327 10µM).

Así, tratamos las HUVEC con HSA y gHSA 25 µg/mL durante 4 horas en presencia o ausencia de estos inhibidores. Los inhibidores fueron preincubados 30 minutos antes del tratamiento y estuvieron también presentes durante las 4 horas posteriores de tratamiento con HSA ó gHSA. En estas condiciones, la gHSA incrementó la producción de ROS significativamente comparado con HSA ($1,09 \pm 0,04$ para la razón gHSA/HSA, $p < 0,05$, $n = 10$) (Figura 13). Sin embargo, ninguno de los inhibidores tuvo un efecto significativo en esta producción incrementada de ROS excepto el inhibidor de la AP-1, SP600125.

Este inhibidor incrementó la producción de ROS en el tratamiento de HSA con SP600125 en comparación con el HSA solo ($1,15 \pm 0,06$ para la razón HSA+SP600125/HSA, $p < 0,05$, $n = 5$) (Figura 13). Sin embargo, la presencia de SP600125 en el tratamiento con gHSA no provocó un cambio significativo comparado con el gHSA solo ($1,09 \pm 0,04$ para la razón gHSA/HSA vs. $1,04 \pm 0,07$ para la razón gHSA+SP600125/HSA, $p > 0,05$, $n = 5$) (Figura 13).

Estos resultados mostraron un incremento en la producción extracelular de ROS en presencia del inhibidor de AP-1, SP600125, con el tratamiento con HSA 25 $\mu\text{g/mL}$ pero la inhibición de la AP-1 no provocó un cambio significativo en el tratamiento con gHSA 25 $\mu\text{g/mL}$.

Además de estos efectos del SP600125, el tratamiento con BAY11-7082 o LY294002 disminuyeron la producción de ROS, aunque este descenso no fue significativo para ninguno de los inhibidores ($1,03 \pm 0,03$ para la razón HSA+BAY11-7082/HSA con respecto al efecto de la HSA, $p > 0,05$, $n = 5$; $0,96 \pm 0,08$ para la razón gHSA+BAY11-7082/HSA vs. $1,10 \pm 0,04$ para la razón gHSA/HSA, $p > 0,05$, $n = 5$; $1,06 \pm 0,07$ para la razón HSA+ LY294002/HSA con respecto al efecto de la HSA, $p > 0,05$, $n = 5$; $0,96 \pm 0,10$ para la razón gHSA+ LY294002/HSA vs. $1,09,83 \pm 3,81$ para la razón gHSA/HSA, $p > 0,05$, $n = 5$).

En resumen, de las rutas de señalización analizadas, solamente la AP-1 parece controlar parte de la producción de ROS en la célula endotelial humana. Mientras que la inhibición de la AP-1 con SP600125 no parece modificar la producción de ROS inducida por gHSA, lo que sí provoca es un incremento en la producción extracelular de ROS en HUVEC tratada con HSA.

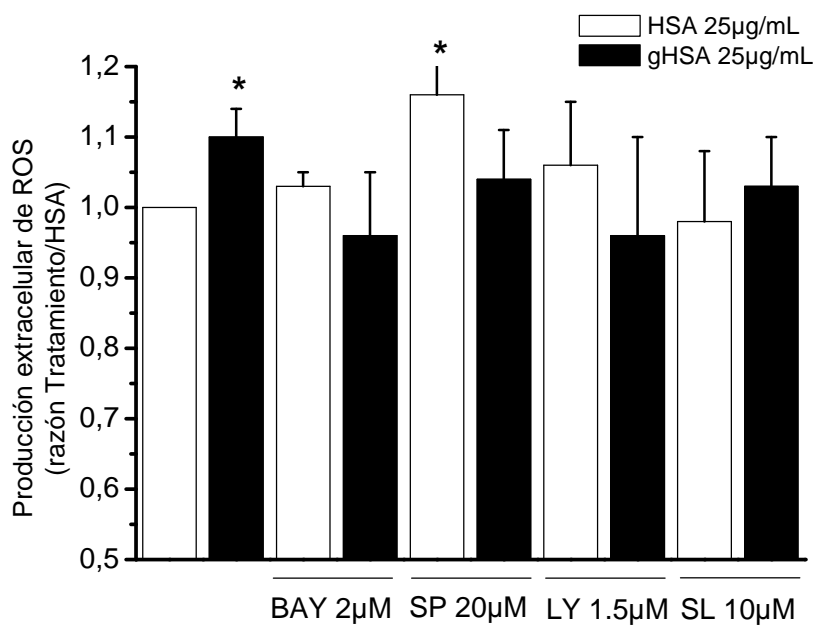


Figura 13: Medida de la producción extracelular de ROS en HUVEC, en presencia de distintos inhibidores mediante el método de reducción del citocromo c. Se sembraron 10.000 HUVEC por pocillo en placas de 96, se privaron de suplementos durante 12 horas y a continuación se trataron con HSA o gHSA 25 µg/mL con los inhibidores BAY11-7082 2µM (BAY), SP600125 20µM (SP), LY294002 1,5µM (LY) y SL327 10µM (SL) durante 4 horas. Los inhibidores se preincubaron también 30 minutos antes del tratamiento. Las columnas representan la razón tratamiento/HSA, expresados como valores de media \pm e.e.m. (barras verticales) de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ con respecto al tratamiento con HSA.

Estudio de los factores de transcripción implicados en el cambio de expresión de las subunidades de NADPH oxidasa en HUVEC

Estudiamos dos factores de transcripción, el NF- κ B y la AP-1, porque ya se describió previamente que pueden estar relacionados con un cambio de expresión de Nox4 y p22phox. Medimos la expresión génica, mediante RT-PCR en tiempo real, de Nox4 y p22phox en HUVEC estimuladas con HSA o gHSA 25 μ g/mL durante 4 horas. En una serie de experimentos incluimos en los tratamientos los inhibidores del NF- κ B (BAY11-7082, 2 μ M) o de la AP-1 (SP600125, 20 μ M). La gHSA aumentó de nuevo los niveles de expresión de Nox4 significativamente comparado con el HSA ($1,25 \pm 0,11$ de cambio relativo de Nox4 con respecto a HSA para gHSA, $p < 0,05$, $n = 13$; Figura 14a) y ocurrió lo mismo para p22phox ($1,12 \pm 0,05$ cambio relativo de p22phox con respecto a HSA para gHSA, $p < 0,05$, $n = 10$; Figura 14b).

El inhibidor de NF- κ B, BAY11-7082, suprimió de forma significativa el incremento de la expresión de Nox4 inducido por gHSA ($1,25 \pm 0,10$ de cambio relativo de Nox 4 con respecto a HSA para gHSA vs. $0,83 \pm 0,10$ de cambio relativo de Nox 4 con respecto a HSA para gHSA+BAY11-7082, $p < 0,05$, $n = 5$; Figura 14a). Sin embargo, este inhibidor, aunque pudo reducir la expresión de p22phox, esta reducción no resultó estadísticamente significativa ($1,12 \pm 0,05$ de cambio relativo de p22phox con respecto a HSA para gHSA vs. $0,91 \pm 0,16$ de cambio relativo de p22phox con respecto a HSA para gHSA+BAY11-7082, $p > 0,05$, $n = 4$; Figura 14b).

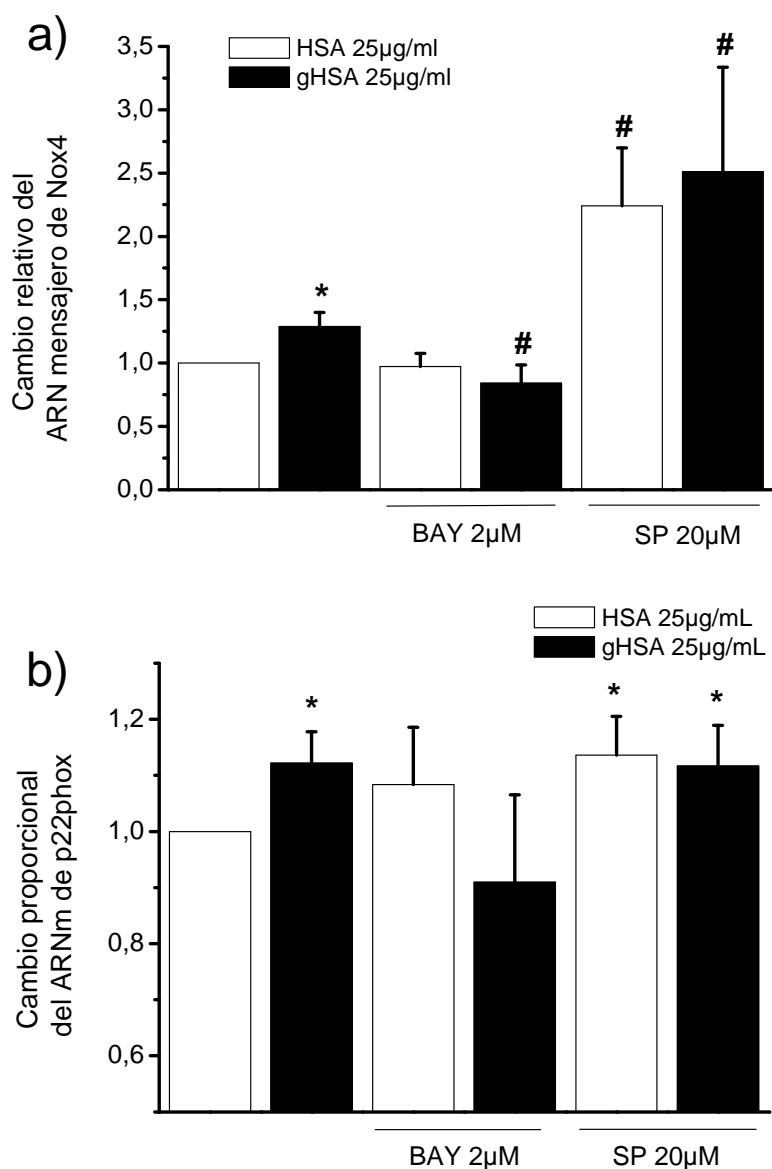


Figura 14: Cuantificación de los niveles de expresión de ARN mensajero de las subunidades de NADPH oxidasa a) Nox4 y b) p22phox mediante RT-qPCR. Se sembraron 300.000 HUVEC por pocillo en placas de 6, se privaron de suplementos durante 12 horas y a continuación se trataron con HSA o gHSA 25 µg/mL y con los inhibidores BAY11-7082 2µM (BAY) o SP600125 20 µM (SP) durante 4 horas. Los inhibidores se preincubaron también 30 minutos antes del

tratamiento. Las columnas representan el cambio relativo de la expresión de ARN mensajero para cada gen (Nox4 o p22phox) relativizado frente al gen constitutivo β -actina y con respecto al tratamiento con HSA. Se expresan los valores como media \pm e.e.m. (barras verticales) de al menos tres experimentos diferentes. * $p < 0,05$ con respecto a los valores de la HSA; # $p < 0,05$ con respecto a los valores de la gHSA.

Por otra parte, el tratamiento con el inhibidor de la AP-1, SP600125 incrementa significativamente la expresión de Nox4, independientemente de si estas células estaban tratadas con HSA ($2,16 \pm 0,32$ de cambio relativo de Nox4 con respecto a HSA para HSA+SP600125, $p < 0,05$, $n = 6$; Figura 14a) o gHSA 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($1,25 \pm 0,12$ de cambio relativo de Nox4 con respecto a HSA para gHSA vs. $2,39 \pm 0,51$ de cambio relativo de Nox4 con respecto a HSA para gHSA+SP600125, $p < 0,05$, $n = 6$; Figura 14a).

Del mismo modo, el tratamiento con el inhibidor de AP-1 incrementó significativamente la expresión de p22phox en presencia de la HSA ($1,14 \pm 0,07$ de cambio relativo de p22phox con respecto a HSA para HSA+SP600125, $p < 0,05$, $n = 4$; Figura 14b). Sin embargo, la adicción de SP600125 al tratamiento con gHSA produjo un incremento en la expresión de p22phox que no fue estadísticamente significativo respecto al gHSA solo ($1,12 \pm 0,06$ de cambio relativo de p22phox con respecto a HSA para gHSA vs. $1,12 \pm 0,07$ de cambio relativo de p22phox con respecto a HSA para gHSA+SP600125, $p < 0,05$, $n = 4$; Figura 14b).

Puesto que observamos una expresión incrementada de Nox4 con el tratamiento de gHSA 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y este efecto fue revertido por el tratamiento con BAY11-7082 2 μM , decidimos estudiar el efecto de la gHSA 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 4 horas en la activación de NF- κ B. Para ello realizamos un *Western blot* con las fracciones celulares para observar la presencia de la subunidad de NF- κ B, p65, en el citoplasma o en el núcleo, midiendo de esta manera su nivel de activación (Figura 15). De esta forma, observamos un incremento significativo de más de dos veces de la subunidad p65 en el núcleo tras el tratamiento con gHSA durante 4 horas respecto a la HSA ($2,29 \pm 0,23$ la razón de (núcleo/citoplasma) gHSA/(núcleo/citoplasma) HSA, $p < 0,01$, $n = 3$; Figura 15). Este aumento de la subunidad p65 en el núcleo nos indicó un aumento en la activación de NF- κ B.

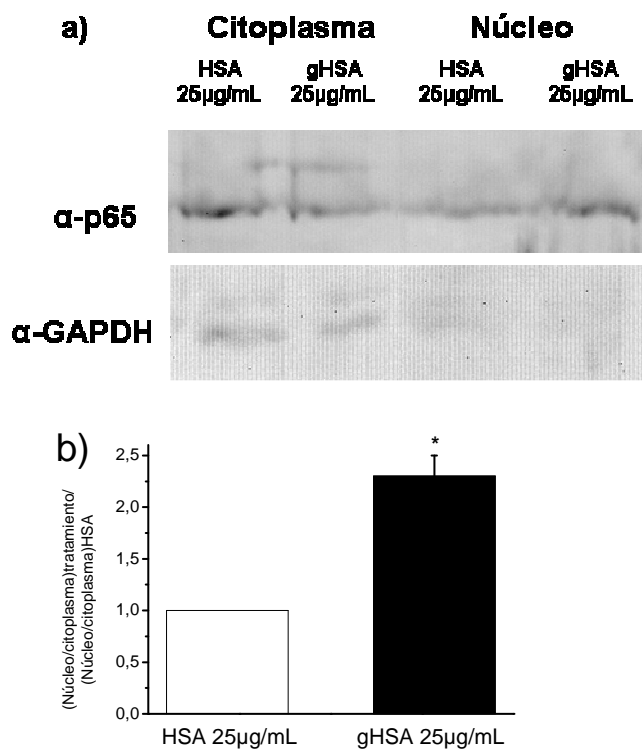


Figura 15: Imagen de un *western blot* representativo (a) y densitometría óptica (b) de proteínas nucleares y citoplasmáticas de HUVEC tratadas con HSA o gHSA (25 µg/mL) durante 4 horas. Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron transferidas a membranas de PVDF y luego incubadas con anticuerpos anti-p65 para observar la distribución núcleo/citoplasma y anti-GAPDH para analizar la contaminación citoplasmática de la fracción nuclear. Las columnas representan el cambio relativo de la densidad óptica para la razón $[(\text{núcleo/citoplasma})_{\text{gHSA}}/(\text{núcleo/citoplasma})_{\text{HSA}}]$, expresado como valores de media \pm e.e.m. (barras verticales) de al menos tres experimentos diferentes. * $p < 0,05$ con respecto al tratamiento con HSA.

En conjunto, estos resultados indican una regulación de la expresión de Nox4 inducida por gHSA 25 µg/mL a través del NF-κB. Por su parte, el inhibidor de la AP-1, SP600125 tuvo un efecto positivo en la expresión de Nox4 de forma independiente a la presencia de HSA o gHSA 25 µg/mL. La expresión incrementada de p22phox por SP600125 sólo fue estadísticamente significativa con el tratamiento de HSA 25 µg/mL. Es importante destacar que los cambios de expresión inducidos por SP600125 en la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa no explican los resultados observados en la producción extracelular de ROS inducida por HSA o gHSA 25 µg/mL en presencia de SP600125, pero esto lo discutiremos más adelante.

Papel de la eNOS en los cambios inducidos por la albúmina glicada en las HUVEC

El óxido nítrico tiene un importante papel en la célula endotelial. Es producido por un grupo de proteínas llamadas NOS que juegan un importante papel en el estrés oxidativo. El óxido nítrico puede reaccionar directamente con el anión superóxido, perdiendo sus funciones biológicas. Por otra parte, la NOS puede estar desacoplada y en este estado producir aniones superóxido en vez de óxido nítrico [16]. La NOS3 o la eNOS es la NOS más importante en las células endoteliales. En base a todo esto, nos propusimos un estudio de la expresión de eNOS para intentar explicar la pérdida del incremento en la producción de ROS inducido por gHSA 25 µg/mL en presencia de SP600125 y el aumento de ROS en presencia de la combinación de HSA 25 µg/mL y SP600125.

Los resultados de las RT-PCR en tiempo real indican que no hay ningún cambio significativo en la expresión de eNOS tras el tratamiento con gHSA 25 µg/mL ($1,09 \pm 0,05$ de cambio relativo de eNOS con respecto a HSA para gHSA, $p < 0,05$, $n = 3$; Figura 16). Por el contrario, cuando tratamos con SP600125 20µM observamos un descenso significativo en la expresión de eNOS, tanto en los tratamientos con HSA ($0,51 \pm 0,09$ de cambio relativo de eNOS con respecto a HSA para HSA+SP600125; $p < 0,05$; $n = 3$; Figura 16), como con gHSA, ($0,46 \pm 0,08$ de cambio relativo de eNOS con respecto a HSA para gHSA+SP600125 vs. $1,09 \pm 0,05$ cambio relativo de eNOS con respecto a HSA para gHSA; $p < 0,05$; $n = 3$; Figura 16).

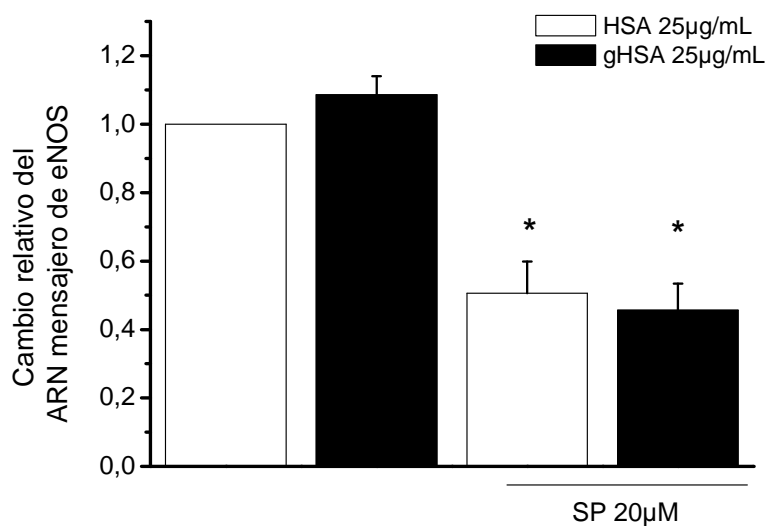


Figura 16: Cuantificación de los niveles de expresión de ARN mensajero de eNOS mediante RT-qPCR. Se sembraron 300.000 HUVEC por pocillo en placas de 6, se privaron de suplementos durante 12 horas y a continuación se trataron con HSA o gHSA 25 µg/mL y con el inhibidor SP600125 (SP) durante 4 horas. El SP se preincubó también 30 minutos antes del tratamiento. Las columnas representan el cambio relativo de la expresión de ARN mensajero para la eNOS relativizado frente al gen constitutivo, β -actina, con respecto al tratamiento con HSA, expresado en valores de media \pm e.e.m. (barras verticales) de al menos tres experimentos diferentes. * $p < 0,05$ con respecto a los valores de la HSA sola.

Estos resultados indicaron que el inhibidor de la AP-1, el SP600125, tuvo un efecto significativo reduciendo la expresión de eNOS tanto en presencia de HSA como de gHSA. Sin embargo, la gHSA 25 µg/mL por sí sola, no modificó los niveles de expresión de eNOS. Aquí encontramos una posible causa de por qué el SP600125 podría incrementar la producción de ROS en HUVEC tratadas con HSA 25 µg/mL, pero no tratadas con gHSA. Esto es, como la eNOS puede ser una fuente de aniones superóxido en estas células cuando se encuentra desacoplada y sabiendo que la inhibición de la AP-1 disminuye la expresión de eNOS, si ésta se encontrara desacoplada, también disminuiría la producción de ROS. Por lo tanto, si gHSA 25 µg/mL desacopla la eNOS, podríamos explicar los resultados obtenidos sobre la producción extracelular de ROS. Teniendo en cuenta esta hipótesis, estudiamos el papel de la eNOS en HUVEC tratadas con HSA y gHSA 25 µg/mL durante 4 horas, pretratadas y tratadas con el inhibidor de la NOS, la L-NAME 100 µM en la producción extracelular de ROS.

Así, las HUVEC tratadas con L-NAME (100 µM) y HSA incrementaron la reducción del citocromo c, esto es, la producción de ROS ($1,06 \pm 0,02$ para la razón HSA+L-NAME/HSA, $p < 0,05$, $n = 7$; Figura 17). Por otra parte, el tratamiento con L-NAME y gHSA redujo la producción de ROS, pero este descenso no resultó estadísticamente significativo ($1,03 \pm 0,05$ para la razón gHSA+L-NAME/HSA vs. $1,07 \pm 0,03$ para la razón gHSA/HSA; $p > 0,05$; $n = 7$; Figura 17).

En resumen, las HUVEC en presencia de la HSA 25 µg/mL y el L-NAME 100 µM incrementaron la producción de ROS porque en estas condiciones la producción de óxido nítrico de la eNOS estaba inhibida, permitiendo una mayor biodisponibilidad de anión superóxido. Este efecto es similar al observado en presencia del SP600125. Por el contrario, las HUVEC en presencia de gHSA 25 µg/mL y L-NAME 100 µM redujeron la producción de ROS. Esto solo puede ser explicado si la gHSA desacopla a la eNOS, con lo que al inhibir esta enzima, se reduciría también la producción de aniones superóxido.

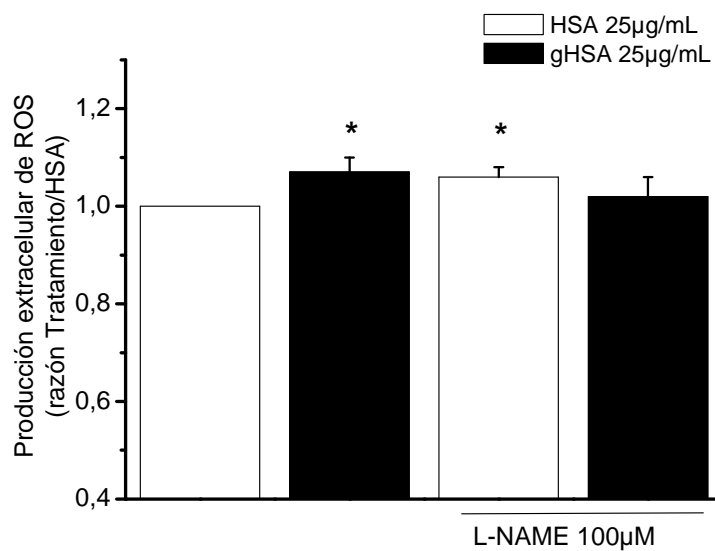


Figura 17: Medida de la producción extracelular de ROS en HUVEC tras el tratamiento con HSA o gHSA en presencia o en ausencia de L-NAME. Se sembraron 10.000 HUVEC por pocillo en placas de 96, se privaron de suplementos durante 12 horas y a continuación se trataron con HSA o gHSA 25 µg/mL y el inhibidor L-NAME 100 µM durante 4 horas. El L-NAME se preincubó también 30 minutos antes del tratamiento. Las columnas representan la razón tratamiento/HSA, expresada como valores de media \pm e.e.m. (barras verticales) de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ con respecto a los tratamientos con HSA sola.

La albúmina glicada en la producción de moléculas de adhesión y citocinas inflamatorias

Para finalizar, quisimos comprobar los efectos de la concentración de 25 µg/mL de gHSA en la activación inflamatoria de las células endoteliales. Para esto realizamos un análisis a nivel del ARN mensajero de las proteínas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 y la quimioatrayente MCP-1. Además, analizamos los niveles de proteína de la MCP-1.

Después de una privación de 12 horas, tratamos las HUVEC con HSA o gHSA (25 µg/mL) durante 4, 6 u 8 horas y extrajimos el ARN total. El análisis del ARN mensajero por RT-PCR cuantitativa reveló que el tratamiento con gHSA 25 µg/mL durante 4 horas indujo un aumento significativo con respecto al tratamiento con HSA de la expresión del ARN mensajero de las moléculas de adhesión, tanto de ICAM-1 ($1,14 \pm 0,05$ de cambio relativo de ICAM-1 con respecto al control para HSA 4 horas vs. $1,50 \pm 0,11$ de cambio relativo de ICAM-1 con respecto al control para gHSA 4 horas; $p < 0,05$, $n = 4$; $1,65 \pm 0,25$ de cambio relativo de VCAM-1 con respecto al control para HSA 4 horas vs. $2,20 \pm 0,13$ de cambio relativo de VCAM-1 con respecto al control para gHSA 4 horas; $p < 0,05$; $n = 4$; Figura 18). Es importante destacar que, sin embargo, los tratamientos con gHSA durante 6 u 8 horas, no produjeron un aumento significativo de la expresión génica de ICAM-1 ni de VCAM-1 con respecto a los tratamientos control con HSA (Figura 18).

El aumento en la expresión de VCAM-1 por gHSA 25 µg/mL durante 4 horas fue significativamente diferente a los niveles de expresión de VCAM-1 inducidos por HSA o gHSA a las 6 u 8 horas. Así, la expresión génica de VCAM-1 tras el tratamiento con gHSA durante 6 horas y 8 horas, disminuyó significativamente respecto a la expresión inducida por gHSA a las 4 horas ($0,64 \pm 0,13$ de cambio relativo de VCAM-1 con respecto al control para gHSA 6 horas vs. $2,20 \pm 0,13$ de cambio relativo de VCAM-1 con respecto al control para gHSA 4 horas; $p < 0,05$; $n = 4$; $0,84 \pm 0,19$ de cambio relativo de VCAM-1 con respecto al control para gHSA 8 horas vs. $2,20 \pm 0,13$ de cambio relativo de VCAM-1 con respecto al control para gHSA 4 horas; $p < 0,05$; $n = 4$; Figura 18). Esto viene a confirmar una vez más, que los efectos observados en la

célula endotelial en respuesta a la gHSA presentan su mayor intensidad a las 4 horas de tratamiento en nuestras condiciones experimentales.

Sin embargo, el tratamiento con gHSA 25 µg/mL no produjo ningún aumento significativo en la expresión del ARN mensajero de la MCP-1 en ninguno de los tratamientos, aunque mantuvo una tendencia ascendente a medida que aumentaba la duración del tratamiento.

Para estudiar el nivel de MCP-1 en el medio de cultivo, deprivamos las HUVEC durante 12 horas y a continuación las tratamos con HSA o gHSA 25 µg/mL durante 2, 4, 6, 8 ó 12 horas, para medir mediante un ELISA la concentración de citocina en los sobrenadantes de estos cultivos.

En estos experimentos, los niveles de expresión de la MCP-1 tras el tratamiento con gHSA no se vieron modificados respecto al tratamiento con HSA. Además, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con gHSA en los distintos tiempos estudiados. Esto indica que la producción de la MCP-1 por parte de las HUVEC no se ve afectada por el tratamiento con gHSA y esta situación no cambia en el rango de tiempos de tratamiento estudiados (2-12 horas).

De forma paralela también estudiamos como afectaban a la producción de la MCP-1 los inhibidores del NF-kB (BAY11-7082 2 µM), de la AP-1 (SP125600 20 µM), de la PI3K (LY-294002 1,5 µM) y de la MEK1/2 (SL327 10 µM) en combinación con la gHSA o la HSA 25 µg/mL durante el tratamiento de 4 horas. Los resultados de estos experimentos mostraron que las HUVEC presentan una producción basal de MCP-1 de 273 ± 32 ng/mL (en presencia de HSA; 10.000 HUVEC por pocillo de placa de 96). Esta producción no se vio afectada por el tratamiento con gHSA, ni por la inhibición de la PI3K, ni de la MEK 1/2 (inhibidores LY-294002 y SL327, respectivamente). Tampoco se vio afectada por el vehículo (dilución apropiada de DMSO) de los fármacos empleados (Figura 19). Sin embargo, observamos diferencias significativas cuando medimos la concentración de MCP-1 en los tratamientos con HSA 25 µg/mL y BAY11-7082 2 µM o gHSA 25 µg/mL y SP600125 20 µM ($0,53 \pm 0,16$ para la razón HSA+BAY/HSA con respecto al efecto de HSA; $p < 0,05$; $n = 4$; y $0,62 \pm 0,17$ para la razón gHSA+SP/HSA vs. $1,07 \pm 0,06$; $p < 0,05$; $n = 4$; Figura 19).

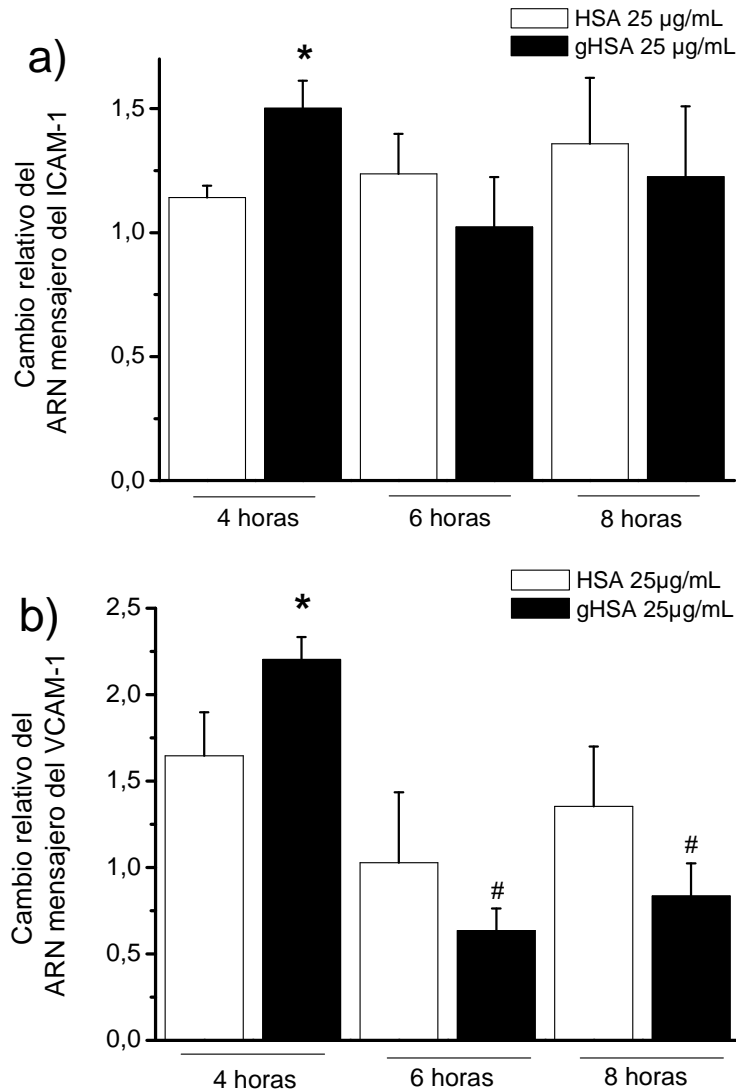


Figura 18: Cuantificación de los niveles de expresión de ARN mensajero de ICAM-1 o VCAM-1 mediante RT-qPCR. Se sembraron 300.000 HUVEC por pocillo en placas de 6, se privaron de suplementos durante 12 horas y a continuación se trataron con HSA o gHSA 25 µg/mL durante 4, 6 o 12 horas. Las columnas representan el cambio relativo de la expresión de ARN mensajero para la eNOS relativizado frente al gen constitutivo, β -actina, con respecto al tratamiento con HSA, expresado en valores de media \pm e.e.m. (barras verticales) de al menos tres experimentos diferentes. * $p < 0,05$ con respecto a los valores de la HSA sola con el mismo tiempo de tratamiento. # $p < 0,05$ con respecto a gHSA 25 µg/mL durante 4 horas.

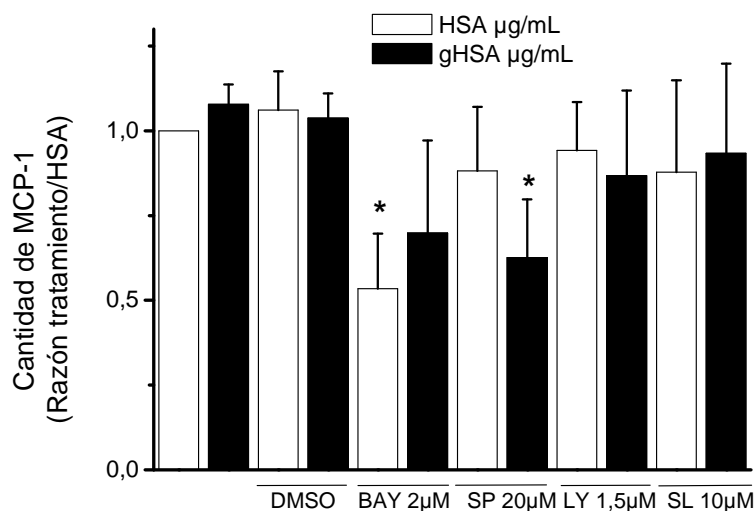


Figura 19: Cuantificación de los niveles de expresión de proteína de MCP-1 mediante ELISA. Se sembraron 10.000 HUVEC por pocillo en placas de 96, se privaron de suplementos durante 12 horas y a continuación trataron con HSA o gHSA 25 µg/mL con los inhibidores BAY11-7082 2µM (BAY), SP600125 20µM (SP), LY294002 1,5µM (LY) y SL327 10µM (SL) durante 4 horas. Las columnas representan el cambio relativo de la expresión de proteína para MCP-1 con respecto a la razón del tratamiento/HSA, expresado en valores de media \pm e.e.m. (barras verticales) de al menos tres experimentos diferentes. * $p < 0,05$ con respecto a los valores del tratamiento sin inhibidor.

Estos resultados indican que ni la activación de las cinasas PI3K y MEK 1/2 ni, por lo tanto, las rutas por ellas activadas, no influyen en la producción de la MCP-1 por parte de las HUVEC. Por el contrario, los factores de transcripción NF-kB y AP-1, parecen estar implicadas en la expresión de la MCP-1 en estas células y además, algo muy importante, la HSA y la gHSA parecen poder modular de forma diferente la expresión génica a través de estas dos vías.

Discusión

Discusión

Resumen

Los resultados de este estudio explican parte de los mecanismos por los que la albúmina glicada, un producto de Amadori, afecta al estrés oxidativo y al estado inflamatorio de la célula endotelial y en consecuencia, puede ser causa de la disfunción endotelial relacionada con la diabetes.

Nos planteamos un estudio sobre un modelo de células endoteliales que obtuvimos de la vena del cordón umbilical. Estas células expresaron las subunidades de la NADPH oxidasa, Nox4 y p22phox además de marcadores propios de este tipo celular. Sobre este modelo, las distintas concentraciones de albúmina glicada utilizadas no afectaron a la viabilidad celular.

Las HUVEC fueron tratadas con distintas concentraciones de gHSA (6-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), lo que indujo un aumento de producción de ROS de una manera dependiente de la concentración entre 6 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, descendiendo gradualmente la producción de ROS a concentraciones más altas. El incremento de producción de ROS inducido por gHSA también mostró un interesante comportamiento temporal. Alcanzó un máximo después de 4 horas de tratamiento y disminuyó gradualmente hasta las 12 horas de tratamiento, aunque manteniéndose durante todo este tiempo por encima de los niveles del tratamiento con el control no glicado (HSA). También, observamos que la producción de ROS fue dependiente del estado de confluencia celular, sugiriendo que la Nox4 está implicada en este aumento de ROS. A nivel intracelular, la producción de ROS también fue estimulada después de 4 horas de tratamiento con gHSA 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

El incremento en la producción de ROS podría deberse a que las HUVEC después de 4 horas de tratamiento con gHSA mostraron un incremento en la expresión de las principales subunidades de la NADPH oxidasa en la célula endotelial humana, la Nox4 y la p22phox, observado tanto a nivel del ARN mensajero como de la proteína.

Para analizar el mecanismo molecular que permite esta sobreexpresión inducida por gHSA estudiamos el papel de dos importantes factores de

transcripción y dos cascadas de fosforilación mediadas por la PI3K o la MEK1/2. El tratamiento con gHSA 25 µg/mL durante 4 horas aumentó la translocación de la subunidad del NF-κB, p65, lo que implica una activación del factor de transcripción por parte de la proteína glicada. Además, la inhibición del NF-κB revirtió la expresión aumentada de la Nox4 inducida por gHSA. Ambos resultados sugirieron que la inducción de la NADPH oxidasa endotelial por parte de la gHSA está mediada principalmente por el NF-κB.

Por otra parte, observamos un incremento en la producción de ROS en el tratamiento con HSA 25 µg/mL cuando estaba también presente el inhibidor de la AP-1, SP600125, efecto que no vimos en el tratamiento con gHSA 25 µg/mL. Además, pudimos medir un incremento en la expresión de Nox4 y p22phox en tratamientos con SP600125, independientemente de la presencia de HSA o gHSA en presencia del inhibidor de AP-1.

Para explicar el distinto comportamiento de la HSA y la gHSA en presencia de SP600125 en la producción de ROS en HUVEC, estudiamos un elemento fundamental en la gestión del estrés oxidativo a nivel vascular, la eNOS. El tratamiento con gHSA en HUVEC no cambió los niveles de la eNOS, pero la presencia de SP600125 disminuyó los niveles de expresión de esta enzima independientemente del tratamiento con HSA o gHSA. Esto sugirió que el tratamiento con gHSA desacoplaba a la eNOS, lo que podría explicar la diferencia en la producción extracelular de ROS inducida por la HSA y la gHSA, con o sin SP600125.

La inhibición de las cascadas de fosforilación mediadas por la PI3K o la MEK 1/2 no tuvo efecto en la producción de ROS de las HUVEC y por lo tanto, las importantes rutas de señalización intracelular en las que estas enzimas participan, no parecen estar implicadas en la regulación de la producción de ROS inducida por gHSA en el endotelio.

Por otra parte, en las HUVEC, gHSA indujo la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 y tiene un papel regulador en la expresión de MCP-1. Estos datos demostraron que la gHSA puede ser un modulador importante de la actividad inflamatoria endotelial y que esta modulación puede ejercerse de forma indirecta, a través de la inducción de respuestas oxidativas.

En conclusión, el incremento de ROS inducido por gHSA en las HUVEC es la combinación de al menos dos elementos, el aumento de la producción de ROS por el aumento de expresión de NADPH oxidasa mediado por NF- κ B y el desacoplamiento de la eNOS. Hay que destacar, además el importante papel que ejerce el AP-1 sobre la expresión de las subunidades de NADPH oxidasa y la eNOS. La modulación de la actividad oxidativa por parte de la gHSA puede jugar también un papel relevante en la respuesta inflamatoria de las células endoteliales.

Estudio del modelo endotelial

Las HUVEC es el modelo que hemos escogido para este estudio por su fácil obtención y mantenimiento en condiciones de cultivo. Es un modelo de célula endotelial ampliamente conocido y utilizado, aunque sea un modelo que no puede representar todas las propiedades de los distintos tipos de células endoteliales. Existen más de 100,000 publicaciones sobre células endoteliales y de estas, más de 10,000 son trabajos realizados con HUVEC [184].

Comprobamos que las células obtenidas de la digestión enzimática eran células endoteliales por la presencia de dos de los marcadores que pueden caracterizarlas, el factor de von Willebrand y el CD31 [185, 186]. Encontramos que las células poseían un marcaje inmunohistoquímico positivo para estos dos factores y así pudimos concluir que nuestro cultivo eran células endoteliales, única y exclusivamente. También se utilizan otros marcadores como el CD-34, el CD54 o la ICAM-1, el CD62E o la E-selectina, el CD106 o la VCAM-1, que son más o menos específicos para las células endoteliales y expresadas a menudo en HUVEC después de estimularlas [184].

Hemos utilizado células de pases comprendidos entre el 4^o y el 10^o. Comenzamos en el 4^o por que nos permitía tener el número necesario de células para los experimentos, en una cantidad suficiente para su mantenimiento y porque después de 3 pases nos aseguramos que el cultivo es totalmente homogéneo. No utilizamos cultivos a partir del pase 10, para evitar que las células perdieran su fenotipo y la capacidad de replicación. Se ha documentado que a medida que se realizan pases de estas células puede acelerarse su senescencia, provocar apoptosis o disminuir la expresión de

ciertas proteínas como la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) o disminuir la síntesis de moléculas como las de prostaciclina [187, 188].

Se ha descrito que las células endoteliales expresan la gp91phox (Nox2), la Nox4, la Nox5 y la p22phox [189]. También expresan distintas subunidades reguladoras de la actividad de la NADPH oxidasa, la p47phox y la p67phox [189]. Las células endoteliales solo expresan la Nox1 mediante la estimulación con flujo intermitente [190]. La principal subunidad de NADPH oxidasa en el endotelio es la Nox4 [182]. Nosotros hemos estudiado la presencia de las principales subunidades de NADPH oxidasa en nuestro modelo mediante RT-PCR, de manera que comprobamos la expresión del ARN mensajero de las Nox1-5 y de la p22phox de manera cualitativa. Encontramos una alta expresión de dos subunidades principalmente, la Nox4 y la p22phox y también observamos la presencia de Nox5, pero en menor medida. Adicionalmente, no solo observamos la expresión de la Nox4 de forma cualitativa por la presencia de su ARN mensajero, también comprobamos que las células expresaban la proteína de Nox4 mediante inmunocitoquímica. Así, nuestro modelo de célula endotelial es adecuado para estudiar los efectos de las proteínas glicadas no enzimáticamente sobre el principal productor de ROS en el sistema vascular, las NADPH oxidasas.

Se ha descrito que los productos de Amadori pueden producir apoptosis o cambios en el crecimiento celular. Por ello, nosotros quisimos comprobar este hecho realizando experimentos de proliferación en las HUVEC tratadas con concentraciones crecientes de gHSA (25-800 µg/mL) durante 12 horas. Aunque en nuestros experimentos observamos que no había ningún cambio en la viabilidad de las HUVEC por efecto de la gHSA, hay dos estudios que contradicen este resultado. Por un lado, se observó que en células endoteliales derivadas de células progenitoras de la sangre en presencia de altas concentraciones de glucosa y albúmina glicada (400 µg/mL) durante 72 horas, aumentaba la proliferación celular pero también la actividad de la caspasa-3, un marcador de apoptosis [191]. Por otro lado, en el trabajo realizado por Amore et al. observaron apoptosis en células endoteliales a partir de unas concentraciones de albúmina glicada de 1,2 mg/mL durante 12 horas [159]. Nosotros no encontramos ninguna diferencia en la viabilidad o el metabolismo de las HUVEC en presencia de gHSA entre 25 y 800µg/mL. Nuestro rango de

concentraciones comprende la usada por Wang et al. (400 µg/mL) [191] en el primer trabajo descrito, pero las condiciones de su estudio son muy diferentes a las nuestras. Ellos examinaron los cambios en la viabilidad de las células con 400µg/mL de gHSA, en presencia de alta glucosa durante 72 horas, lo que supone un tratamiento mucho más agresivo y prolongado que los nuestros.

En definitiva, después de realizadas las medidas y comprobaciones descritas, podemos decir que las HUVEC que obtuvimos, mantenidas en las condiciones de cultivo detalladas en la correspondiente sección, son un buen modelo de célula endotelial para el estudio del papel del estrés oxidativo en relación a las NADPH oxidasas y su viabilidad no se ve alterada por la albúmina glicada.

Producción de ROS en HUVEC tratadas con albúmina glicada

Nuestros resultados demostraron que las células endoteliales tratadas con gHSA mostraban una mayor producción de ROS que las tratadas con HSA. En este estudio, el mayor incremento en la producción de ROS en HUVEC tratadas con gHSA en comparación con HSA sucedió con una concentración de 25 µg/mL y esta concentración también obtuvo los mejores resultados a cualquiera de los tiempos de tratamiento utilizados. En comparación con otros estudios, 25 µg/mL es una concentración mucho menor que la usada por los otros autores. Sin embargo, estas discrepancias quizás se puedan explicar por las diferencias metodológicas.

Higai et al [170] detectó la producción de ROS con azul de nitrotetrazolio después de 30 minutos de tratamiento con 500 µg/mL de gHSA. La concentración que nosotros usamos proviene de un estudio de concentración-respuesta usando el método de reducción del citocromo c, mientras Higai et al. escogieron entre diferentes concentraciones según su efecto en el cambio de expresión de E-selectina. En otro estudio, midieron la producción de ROS en cardiomiocitos con cH₂-DCF-DA, y su concentración más efectiva de gBSA en ese caso fue de 400 µg/mL [131].

La concentración efectiva en los experimentos es muy baja en relación a los niveles que se encuentran en los pacientes. La concentración de albúmina en sangre es de 4g/dL, y se ha publicado que en sujetos sanos los niveles de

albúmina glicada son del 7-8% [192], mientras que en diabéticos llegan al 20%. De esta manera los niveles de la albúmina glicada en sujetos sanos serían de 2,8 a 3,2 mg/mL, una concentración 100 veces más alta que la que nosotros usamos en los experimentos *in vitro*. Realmente pocos estudios se acercan a este nivel fisiológico. Thornalley et al. estimaron que en pacientes sanos la concentración de fructosaminas es de 140 μ M, que si hay entre 4 y 5 fructosaminas por albúmina, vendría a corresponder a una concentración de albúmina glicada de aproximadamente 2 mg/mL y estos niveles son tres veces más altos en diabéticos [193]. Aunque existe discrepancia en los porcentajes que supone la albúmina glicada comparada con la total [194], está claro que los estudios utilizan concentraciones menores u observan muchos efectos que no se pueden medir en los pacientes o individuos sanos. Niveles de albúmina glicada similar o menor que los niveles de sujetos sanos se ha visto que producen muerte celular por apoptosis en células endoteliales o reducen su proliferación [159, 161, 166]. Esto es claramente un ejemplo en el que se aprecian las diferencias entre los efectos observables en condiciones *in vitro* y la situación en condiciones *in vivo*. De ello se desprende que las condiciones de cultivo pueden ser las principales causantes de los efectos deletéreos de la albúmina glicada a concentraciones bajas o normales. En cultivo, las células endoteliales no se encuentran bajo el flujo de la sangre, no les rodea el mismo ambiente extracelular que en las venas o arterias y la disponibilidad de la albúmina glicada para las células es mucho mayor. Que exista un máximo de estimulación alrededor de la concentración de 25 μ g/mL se podría explicar con dos hipótesis. La primera es que la presencia de las proteínas glicadas a esas concentraciones active los sistemas productores de ROS, como la NADPH oxidasa o el desacoplamiento de la eNOS, pero que no sea capaz de activar genes antioxidantes, como podría ser la SOD. Un estudio previo observó que células del músculo liso vascular tratadas durante 24 horas con albúmina glicada mostraban un aumento en la expresión de la SOD2 [168]. La otra posibilidad está relacionada con la propiedad antioxidante de la propia albúmina, que captaría los ROS extracelulares impidiendo que ejerzan su función. La concentración activa *in vitro* sería la concentración de proteína glicada adecuada para aumentar la producción extracelular de ROS, pero no sería suficiente cantidad de albúmina para captar los ROS producidos e impedir que transmitan su señal. El principal residuo con modificaciones de Amadori en la albúmina es la lisina 525 [121]. Por el contrario, los principales aminoácidos

que ejercen una función antioxidante en la albúmina son varias metioninas y la cisteína. Estos aminoácidos no estarían afectados por la formación de modificaciones de Amadori sobre la albúmina [195]. Aunque se ha observado que la albúmina pierde parte de sus propiedades antioxidantes cuando se modifica con metilglioxal [196] y se observó que las propiedades antioxidantes de la albúmina se encuentran reducidas en los diabéticos [197].

A pesar de la baja concentración de gHSA y de un incremento relativamente bajo en la producción extracelular e intracelular de ROS, observamos que el efecto fue mantenido en el tiempo (hasta las 12 horas según nuestras condiciones). Esta es una característica importante porque la hiperglicemia en la *diabetes mellitus* es una condición crónica y nuestros resultados nos indican que pequeños niveles de proteínas circulantes glicadas no enzimáticamente pueden producir un estrés oxidativo inicial en células endoteliales lo cual puede llevar a la disfunción endotelial y las consiguientes complicaciones vasculares. Además, según lo que vimos en este estudio, el aumento de la producción de ROS sería consecuencia del cambio en proteínas de función constitutiva, como son la Nox4 y la eNOS, con lo que el aumento en la producción de ROS sería bajo, prolongado y crónico mientras se mantuviesen las condiciones que lo propician [16, 97].

Teniendo en cuenta el tiempo-respuesta de la producción de ROS inducido por gHSA, observamos un incremento significativo después de 4 horas de tratamiento. Esta producción extracelular de ROS se mantuvo, aunque en menor medida, durante 6 y 12 horas. Estos datos concuerdan con los observados por Zhang et al [131], quien observó un aumento significativo en la producción de ROS de 4 a 48 horas en cardiomiocitos tratados con gBSA. En un estudio que relacionaba los efectos de la albúmina glicada sobre la actividad metabólica y la sensibilidad a la insulina en células del músculo liso vascular vieron que los efectos de la albúmina glicada se mantenían hasta 24 horas [198].

Hemos observado que la producción de ROS por NAPDH oxidasa es dependiente del estado de confluencia de las células. Cuando realizamos los tratamientos con la HSA o con la gHSA sobre 7.500 ó 10.000 células por pocillo en placas de 96 (a esta densidad no se encuentran en confluencia)

comprobamos que aumentaba la cantidad de ROS producida en presencia de gHSA. Esto no ocurría en el caso de los mismos tratamientos sobre 12.000 ó 15.000 células por pocillo. En estos resultados observamos también que el DPI conseguía los mayores porcentajes de inhibición cuando las células no estaban en confluencia, relacionando la NADPH oxidasa con este aumento de ROS. Esto es coherente con un estudio realizado por Peshavariya et al. en el que observaron que la expresión de Nox4 disminuía cuando las células endoteliales se encontraban en confluencia [183].

La técnica de reducción del citocromo c mide el incremento de ROS extracelularmente, ya que el citocromo c no es capaz de atravesar la membrana celular. El método del citocromo c es sensible a la reducción causada por los aniones superóxido. El ritmo de transferencia de electrones de los aniones superóxido al ferricitocromo c es lo suficientemente rápido ($k = 2.6 \times 10^5 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$) para reaccionar con un alto porcentaje de aniones superóxido antes de con el H_2O_2 [199]. La producción de ROS medida con este método fue inhibida en presencia de la SOD. Este resultado, además de por la relativa especificidad de reacción del citocromo c, nos asegura que las ROS que se están produciendo son aniones superóxido. Adicionalmente, la inhibición de la respuesta con el DPI indica que la producción de ROS es dependiente de las NADPH oxidasas u otra flavoproteína. Todos estos datos apuntan a que el aumento de las ROS extracelulares era debido a un incremento de los aniones superóxido generados por la NADPH oxidasa, al ser estas proteínas las principales productoras de aniones superóxido en el endotelio.

Hay pocos estudios que observaron que la inhibición farmacológica de las subunidades de NADPH oxidasa lleva a una pérdida de ciertos efectos inducidos por las proteínas glicadas. Nuestros resultados mostraron una clara inhibición de la producción de ROS en las células endoteliales por el DPI, algo que ya se había visto en otros estudios, como por ejemplo, en células mesangiales la producción del anión superóxido por gBSA fue inhibida por DPI [169]. En células del sistema cardiovascular, la inhibición de la NADPH oxidasa por el DPI o la apocinina también ha mostrado que tiene influencia en efectos del tratamiento de la albúmina glicada. En células endoteliales, la presencia de DPI redujo la expresión de E-selectina inducida por gHSA [170], y la apocinina, otro inhibidor de NADPH oxidasa, inhibió la activación de NF- κ B y los niveles

de factor atrial natriurético inducidos por la gBSA en cardiomiocitos [131]. En relación a los efectos de la apocinina, nosotros también estudiamos el efecto del tratamiento con apocinina durante 4 horas en la producción extracelular de ROS. Sorprendentemente, cuando tratamos las HUVEC con apocinina observamos un aumento de la producción de ROS, que fue aún mayor en presencia de gHSA, pero que no aumentó cuando lo incubamos con HSA. Un estudio anterior observó que la apocinina aumentó la producción de ROS cuando no está “activada” mediante una reacción previa con H_2O_2 y peroxidasa de rábano o mediante la acción de las mieloperoxidasas [200]. Esta “activación” lleva a la formación de un dímero simétrico 5,5' que actúa como un potente inhibidor del ensamblaje de las subunidades de la NADPH oxidasa [201]. Nosotros no activamos la apocinina y en este mismo estudio observaron que la producción de ROS en células no fagocíticas con apocinina no activada se encuentra incrementada, siendo inhibida por la SOD y el DPI. Observamos un mayor aumento de ROS cuando tratamos las HUVEC con gHSA y apocinina no activada y este fue revertido en presencia del DPI, indicando pues que la NADPH oxidasa participaba en este aumento adicional inducido por gHSA en presencia de apocinina no activada.

Para estudiar la producción de ROS intracelular empleamos una sonda fluorescente, la cH_2 -DCF-DA, la cual emite fluorescencia cuando entra en una célula y se reduce. Observamos que las HUVEC en presencia de gHSA 25 μ g/mL durante 4 horas presentaban una mayor oxidación del cH_2 -DCF-DA. Varios estudios ya habían usado este método para medir la producción de ROS intracelular. Altas concentraciones de gHSA (500 μ g/mL o más) incrementaron la fluorescencia intracelular en HUVEC [170] y en macrófagos RAW 264.7 [152] después de tratamientos cortos y largos, respectivamente. En cardiomiocitos, se demostró que la gBSA aumentó la producción de ROS intracelular [131].

Es importante destacar la detección de ROS en el espacio extracelular. Tanto el citocromo c como la SOD que añadimos en la medida de la reducción del citocromo c no deberían atravesar la membrana extracelular. Esto es coherente con que la SOD no fuera capaz de impedir la oxidación del cH_2 -DCF-DA, con lo que no tenía efectos intracelulares. Sin embargo, en el espacio extracelular observamos como el citocromo c se reducía y esa reducción era inhibida por la SOD, lo que relacionaba este efecto con el anión superóxido. El

anión superóxido extracelular puede regular la señalización intracelular. El anión superóxido en solución dismuta a H_2O_2 con un ritmo constante de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a un pH 7. La SOD aumenta la velocidad de esta reacción en 4 veces. Así, conociendo su vida media y su potencial de difusión, la distancia que alcanza el anión superóxido es muy corta, estimada en $0,5 \mu\text{m}$ [202], aunque otros autores dicen que la distancia alcanzada es de $0,16 \mu\text{m}$ [203]. Muchos autores atribuyen parte de los efectos del anión superóxido al H_2O_2 , ya que es relativamente estable en solución y es capaz de atravesar membranas, aunque también puede pasar a través de los canales de las acuaporinas [204]. Que el H_2O_2 sea un transductor de señales es compatible con que el H_2O_2 tenga efecto cuando es administrada de manera exógena [205].

Aunque se acepta que el H_2O_2 es la molécula señalizadora y segundo mensajero relacionado con la actividad NADPH oxidasa, varios estudios han sugerido que el anión superóxido también puede operar en este contexto independientemente de los efectos del H_2O_2 [206-208]. Relacionado con estas diferencias, se ha observado distinta sensibilidad de las proteínas a distintos ROS. El factor de transcripción SoxR es sensible al anión superóxido mientras que el factor de transcripción Oxy-R es sensible al H_2O_2 . Parece que el anión superóxido reacciona específicamente con grupos de hierro-azufre relacionados con alta atracción electrostática [209].

Pero, si se producen aniones superóxido extracelularmente ¿cómo pueden estos regular procesos intracelulares?. La respuesta se encuentra en que se ha observado que el anión superóxido entra en la célula a través de canales aniónicos [210] y también existe un flujo de aniones superóxido extracelulares generados por la xantina oxidasa o por la adición de KO_2 (superóxido potasio) a las células endoteliales [211]. Además, este incremento del flujo de los aniones a través de la membrana se vio acompañado de un incremento en el Ca^{2+} intracelular [211], resultado de la activación de los receptores de inositol trifosfato (IP3) [208]. Tanto la oxidación de la hidroetidina como la liberación del Ca^{2+} intracelular inducidos por los aniones superóxido extracelulares fueron bloqueados en presencia del bloqueador de canales aniónicos (DIDS del inglés *4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid*) o el silenciamiento selectivo del canal de cloro 3 por el tratamiento con siARN [208, 211]. El incremento en el Ca^{2+} intracelular inducido por el anión superóxido

extracelular en células endoteliales lleva a la activación de la producción de aniones superóxido mitocondriales, amplificando la señal inicial, como lo indica el aumento de la fluorescencia de la hidroetidina [211].

En cuanto al uso de la NADH como sustrato para la producción de ROS, parece ser que la Nox4 utiliza preferentemente la NADH a la NADPH, a diferencia de la gp91phox y la Nox1. Hay varios argumentos para estas diferencias. El dominio de unión de la NADPH en la gp91phox humana sólo coincide en un 68% con el mismo dominio de la Nox4 [212]. En células del músculo liso vascular la privación de suero incrementa la expresión de la Nox4 y estas células cambian la preferencia de sustrato a favor de la NADH [213, 214]. En células endoteliales y HEK293 que expresan la Nox4, consumen la NADH [215, 216]. Tanto en células del músculo liso vascular como en células endoteliales la expresión de la Nox4 es alta, sin embargo, la producción de ROS es baja, como la concentración citoplasmática de NADH (0.01 mM) comparada con la de NADPH (0.1 mM) [217, 218]. Ya se ha estudiado la dependencia de la producción de ROS por el NADPH en células endoteliales. En el trabajo de Li et al observaron que las células endoteliales utilizaban los dos sustratos de la enzima, pero relacionaron el uso de NADPH con la activación de las NADPH oxidasas y mayor producción de ROS y relacionaron el aumento de ROS de NADH a un artefacto de las concentraciones de la lucigenina [219]. Aunque en este estudio, la inhibición con DPI no era capaz de reducir la producción de ROS dependiente de NADH, implicando un aumento en la oxidación de la lucigenina independiente de las NADPH oxidasas. Pese a que nosotros no utilizamos la lucigenina para medir las ROS hemos observado que en presencia de NADH las células endoteliales producen más ROS extracelular y esta producción fue inhibida en presencia de DPI, relacionando esta producción con las NADPH oxidasas.

Expresión de las subunidades de NADPH oxidasa en HUVEC tratadas con albúmina glicada

Tras observar el aumento de la producción del anión superóxido por la albúmina glicada en la célula endotelial nos propusimos estudiar los cambios de expresión inducidos por la gHSA de las principales subunidades de NADPH oxidasa, Nox4 y p22phox, que son la principal fuente de ROS en la célula

endotelial dependiente de la NADH y del estado de confluencia. Las NADPH oxidasas están compuestas por dos subunidades unidas a membrana, la gp91phox o sus homólogos y la p22phox, formando un complejo denominado citocromo b_{558} . La subunidad de Nox4 es el homólogo de gp91phox que se expresa con más frecuencia en células endoteliales y esta subunidad está implicada en la producción de superóxido en estas células [182, 220, 221]. La expresión de la proteína p22phox en células endoteliales fue demostrada por Jones et al. [222], y esta subunidad es crítica para la función correcta del complejo enzimático [223].

El incremento en la expresión del ARN mensajero de Nox4 se correlacionó con un incremento en los niveles de su proteína, demostrados por inmunofluorescencia. De manera interesante, la HSA tuvo unos efectos sobre la expresión de Nox4 parecidos a la gHSA a las 6 horas. Sin embargo, a pesar de los niveles parecidos en la expresión de Nox4 con los tratamientos de HSA y gHSA después de 6 horas, solo se observaron aumentos significativos en la producción extracelular de ROS en el tratamiento con la gHSA y no en los de la HSA. Estos resultados sugieren, por un lado, un aumento en la producción de ROS inducido por la gHSA debido a un aumento de la expresión de la Nox4. Por otro lado, en la activación a las 6 horas se produce una activación prolongada de la NADPH oxidasa en presencia de gHSA que no ocurre con la HSA, o bien es otra isoforma de la NADPH oxidasa diferente de la Nox4 la que pasa a tener un papel relevante.

En el caso de la subunidad Nox4, el cambio de los niveles de expresión tiene un gran efecto en su actividad como observó el grupo de Serrander et al [224]. Únicamente por la transfección con el gen de Nox4 en células HEK293, que no expresan originalmente Nox4, se incrementó la producción de ROS de forma constitutiva [225]. En este estudio transfectaron conjuntamente la Nox4 con las subunidades reguladoras NOXO1, NOXA1, p47, p67 y rac1, observando que ninguna de estas subunidades aumentó la producción de ROS por Nox4. Sin embargo, en células mesangiales la angiotensina II indujo la producción de ROS por la Nox4 de una manera dependiente de Rac1 [226].

Sólo se conocen dos proteínas que pueden regular la función de Nox4, la p22phox y la poldip2. En este estudio observamos que el aumento de los

niveles de la Nox4 fue acompañado por un aumento de los niveles de la p22phox. Previamente ya se había observado que en experimentos de transfección conjunta de la Nox4 y la p22phox demostraban la relación de interdependencia entre ambas subunidades [225, 227]. Estos autores comprobaron cómo la p22phox colocaliza con la Nox4 y se encuentran unidas a través de la histidina 115 de la Nox4, siendo necesaria la unión para la formación de ROS. La transfección por separado de estas dos subunidades en células que no expresaban las subunidades NADPH oxidasa no produjo ROS, sin embargo, al transfectar las dos subunidades conjuntamente aumentó la producción de ROS [225, 227]. Esto significa que la subunidad p22phox es fundamental para el funcionamiento de la Nox4 y como hemos visto en nuestros resultados, el incremento de la expresión de las dos subunidades lleva al aumento de la producción de ROS.

La relación entre la Poldip2 y la Nox4 es bastante reciente [228]. Utilizaron la parte c terminal de la p22phox, la región donde se unen las proteínas reguladoras, para encontrar la relación de la Poldip2 con este complejo. Así, observaron que la Poldip2 colocalizaba con la p22phox y la Nox4. No sé sabe a través de que mecanismo la Poldip2 regula la actividad de la Nox4, pero se piensa que puede dar estabilidad al complejo Nox4-p22phox.

Se ha descrito que la subunidad de Nox4 se localiza en adhesiones focales, en el núcleo y en el retículo endoplásmico [94]. En nuestros experimentos no fuimos capaces de distinguir ninguna localización particular. Por el contrario, mediante experimentos de inmunofluorescencia observamos una distribución más bien ubicua por todo el citoplasma. En referencia a esto, hay que tener en cuenta que nosotros fijamos las células con una mezcla de metanol y acetona. Este método de fijación conserva la integridad antigénica de las proteínas y la estructura de las membranas. Sin embargo, tiene un fuerte efecto deshidratante en las muestras y esto puede deslocalizar los componentes citosólicos. Puede ser entonces, que se deslocalice la Nox4 situada en vesículas en el citoplasma.

Rutas implicadas en el aumento de ROS por albúmina glicada

Nox4 es una proteína con un funcionamiento constitutivo y se conoce muy poco sobre como está regulada. Como ya hemos comentado, además de

por los cambios de expresión también está regulada por dos proteínas, la p22phox y la poldip2. Aunque se ha visto que puede ser activada de manera aguda, como por ejemplo, por los ácidos grasos poliinsaturados, aumentando la producción de ROS a las 4 horas sin alteraciones en los niveles de la Nox4 y la p22phox, siendo revertido el efecto con el silenciamiento de la subunidad de Nox4 [229]. También se ha visto que la insulina aumenta la producción de ROS en 5 minutos [230], y los lipopolisacáridos activan Nox4 a través del receptor toll like en 30 minutos [231].

Aunque no se conocen los mecanismos a través de los cuales se regula la actividad de la Nox4, se ha visto que puede activarse por translocación a compartimentos de la membrana como las balsas lipídicas [95] e incluso podría interactuar con GTPasas como Rac1 [96]. Sin embargo, principalmente se piensa que el control de la producción de ROS por la Nox4 es por la modificación de sus niveles de expresión [97].

Pese a no conocerse cuales son las rutas o mecanismos que pueden activar a la Nox4, sabemos que la presencia de albúmina glicada puede llevar a la activación de distintas rutas de señalización como PI3k-Akt, MEK1/2-ERK1/2 y PKC.

Pese a que nosotros no observamos un cambio significativo en la producción de ROS inducida por gHSA cuando inhibimos la PI3K con LY294002, hay diversos estudios que observaron la activación de PI3K por la gHSA. En HUVEC tratadas con albúmina glicada se ha visto aumentada la expresión de E-selectina y este aumento fue levemente reducido con la inhibición de PI3K, pero fue fuertemente reducido en presencia del inhibidor de PKB/Akt [170]. Además, en este estudio observaron que la producción de ROS estaba relacionada con el aumento de expresión de la E-selectina.

Hay dos estudios que muestran resultados que no corresponden con los descritos anteriormente. En células del epitelio pigmentario retinal, el tratamiento con gHSA aumentó la expresión de VEGF pero sin activar ni PI3K ni Akt [232] y por otro lado, en células del músculo esquelético, el tratamiento con gHSA disminuyó la activación de PI3K por la insulina y también disminuyó la actividad de PKB [198]. Aunque el estudio en HUVEC haya visto que PI3K participa en la regulación del aumento de expresión de E-selectina inducido por

gHSA y que en este aumento estén implicadas las NADPH oxidasas, no se demostró que PI3K tuviera algún control sobre esta producción de ROS.

Por otro lado, cuando inhibimos la MEK 1/2, la cinasa que activa a la ERK 1/2, no observamos ningún efecto significativo sobre el aumento de producción de ROS inducido por la gHSA. Hay varios estudios que muestran una activación de ERK 1/2 inducida por la gHSA en distintos tipos celulares. En células del músculo liso vascular, el tratamiento con albúmina glicada aumentó la proliferación activando ERK1/2 y esto lo observaron mediante la inhibición de MEK 1 [165]. En células del epitelio pigmentado de la retina tratadas con gHSA, se observó un aumento en la secreción de VEGF, IL-8 y MCP-1 también a través de la activación de ERK 1/2 [232, 233]. En células similares a monocitos MonoMac6 disminuyó la activación de NF- κ B inducida por gHSA con la inhibición de MEK 1 [234] y en macrófagos RAW, la combinación entre gHSA y niveles altos de glucosa activó ERK y esta activación llevó al aumento de TGF β y al aumento del estrés oxidativo, observado midiendo los TBARS [152]. gHSA disminuyó la proliferación y aumentó la producción de fibronectina en células mesangiales mientras que, la inhibición de MEK revirtió estos efectos [235]. En células de la microglia retinales, la albúmina glicada activó ERK y esta activación participa en el aumento de la síntesis de TNF- α [236]. Estos estudios nos muestran cómo la gHSA puede aumentar la activación de ERK 1/2, e incluso regular el aumento de estrés oxidativo, pero no se ha observado que regule directamente la activación de la NADPH oxidasa en los distintos tipos celulares.

Nosotros no estudiamos la posible regulación de la actividad de PKC por la gHSA. Se sabe que la PKC activa y aumenta la expresión de la NADPH oxidasa [76, 237]. Se ha relacionado la activación de PKC con cambios de expresión de Nox4, pero a tiempos largos (48 horas) [238], y en nuestros resultados vimos el aumento de expresión de Nox4 a 4 horas de tratamiento. Aún así, el tratamiento con gHSA puede llevar a la activación o a efectos regulados por la PKC en varios modelos celulares. Se ha observado esta activación en presencia de gHSA en células mesangiales [239], células endoteliales del glomérulo [240], células del músculo liso vascular [165], del epitelio pigmentario de la retina [233], en la línea celular monocítica MonoMac 6 [153, 234] y en células del músculo esquelético [198]. Al regular la expresión

de Nox4 a tiempos largos, la PKC no tendría influencia en los cambios de expresión en tratamientos de 4 horas.

Factores de transcripción implicados en la expresión de las subunidades de NADPH oxidasa

La gHSA, a través de la activación de las rutas mencionadas en el apartado anterior, lleva a la regulación de determinados factores de transcripción génica como el NF-kB [152, 153, 233, 234], el factor inducible por hipoxia-1, (HIF-1 del inglés *Hypoxia-inducible factor-1*)[232], el Elk-1 [130, 164], la AP-1 [130, 153, 164] y el proteína homóloga al C/EBP (CHOP del inglés *C/EBP-homologous protein*) [130, 164] en distintos modelos celulares. Estos factores de transcripción pueden regular la expresión de la subunidad de la NADPH oxidasa, Nox4, o la expresión de su proteína reguladora, p22phox.

Los principales factores de transcripción relacionados con los efectos de las proteínas glicadas en la expresión de genes son el NF-kB y la AP-1. Dos subunidades de la NADPH oxidasa, la gp91phox y la p47phox, son reguladas por el NF-kB [74, 172]. Las proteínas glicadas también se han relacionado con la activación del NF-kB [131, 152, 164, 173]. Incluso tanto la AP-1 como el NF-kB fueron asociados con la regulación de la expresión de p22phox [174, 175]. Además, la AP-1 fue relacionada con la actividad del promotor de la p67phox, una de las subunidades citoplásmicas reguladoras de algunas NADPH oxidasas [176], y varios estudios analizaron la relación entre las proteínas glicadas y la activación de la AP-1 [130, 153, 178].

Nuestros resultados han mostrado un aumento de la expresión de Nox4 en presencia de gHSA a las 4 horas y también un aumento de la activación del NF-kB inducido por la gHSA a este tiempo. Además, pudimos revertir el aumento de Nox4 inducido por la gHSA con la inhibición farmacológica del NF-kB. Un estudio anterior realizado por Manea et al. describió que el NF-kB regula la expresión de Nox4 en células del músculo liso vascular [241]. A diferencia de nosotros, estos autores observaron una regulación de la Nox4 mediada por el inhibidor de NF-kB a las 24 horas, pero no observaron ningún cambio a las 4 horas. En cuanto al papel del NF-kB sobre la p22phox, aunque en nuestros experimentos no observamos ningún cambio significativo de regulación de la p22phox a través del NF-kB, otros autores relacionaron este

factor con la regulación de la expresión de p22phox en células del músculo liso vascular [174].

La AP-1 demostró regular la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa. Cuando inhibimos el factor de transcripción AP-1, observamos un incremento en la expresión de las subunidades Nox4 y p22phox. Independientemente de si tratábamos las HUVEC con HSA o con gHSA, siempre que inhibíamos el AP-1 aumentaba la expresión de la Nox4. Sin embargo, en el caso de la expresión de p22phox no ocurría esto. Cuando inhibíamos la AP-1 en presencia de la HSA, la expresión de p22phox aumentaba de manera significativa en comparación con el tratamiento con HSA solo. En el caso del tratamiento con gHSA la presencia o la ausencia de la inhibición de AP-1 no afectaba al incremento causado por la gHSA en la subunidad p22phox. Contrariamente a nuestros resultados, los estudios anteriores vieron que era necesaria la activación de la AP-1 para modificar los niveles de expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa. Manea et al. observaron el papel de la AP-1 en el aumento de expresión de Nox4 y p22phox inducido por el TNF- α en células del músculo liso vasculares aórticas [175] AP-1 también sería necesario para la expresión de subunidades reguladoras de la NADPH oxidasa, como observaron Gauss et al. mostrando una modulación del ARN mensajero de la p67phox por parte de la AP-1 [176]. Nuestros resultados muestran una clara evidencia del control de la AP-1 sobre las subunidades de NADPH oxidasa en células endoteliales humanas, pero es una regulación negativa. La inhibición del factor de transcripción lleva al aumento de las subunidades de la NADPH oxidasa. También hay datos previos que apoyan este resultado, indicando que en condiciones de flujo laminar la unión del AP-1 al promotor de la Nox4 disminuye la expresión de la subunidad de la NADPH oxidasa [242].

Este efecto de la inhibición de la AP-1 puede estar sometido, además, a una posible regulación por parte de la NADPH oxidasa ya que la producción de ROS regula la activación de la AP-1. Se sabe que las NADPH oxidasas, a través de la producción de ROS, pueden aumentar la activación de la AP-1 mediada por la JNK y la p38MAPK [243], y los ROS pueden inducir la expresión del ARN de los elementos de la AP-1, cJun y la cFos [244, 245]. Se ha visto que la producción de ROS lleva a la activación de la AP-1 en células

del músculo liso vascular [246-248] y en células endoteliales [249]. La inhibición de este factor de transcripción, según nuestros resultados, conllevaría a una retroalimentación negativa mediada por la NADPH oxidasa. Así, la dependencia de la producción de ROS para la activación de la AP-1 podría ser la causante del aumento de la expresión de Nox4 y p22phox, como un intento de la célula de activar la AP-1, en situación de la inhibición de este factor.

Papel de la óxido nítrico sintasa endotelial en los cambios inducidos por albúmina glicada en HUVEC

El óxido nítrico es un importante regulador de la función endotelial, teniendo efectos en la relajación de los vasos, la antiagregación y la inflamación. En las células endoteliales es producido constitutivamente por la eNOS y tiene un papel central en el equilibrio oxidativo celular. Un incremento en la producción de ROS lleva a reducir las funciones biológicas de la eNOS, por desacoplamiento de la enzima o por el descenso de la biodisponibilidad del óxido nítrico, conllevando a la formación de peroxinitrito. Este hecho puede llevar a la disfunción endotelial, uno de los principales problemas en las enfermedades cardiovasculares [16].

En nuestros experimentos no encontramos modificaciones en la expresión génica de la eNOS cuando tratamos las células endoteliales con la gHSA. Hay pocos trabajos que hayan estudiado el papel de la albúmina con modificaciones de Amadori y la eNOS. Amore et al. tienen dos interesantes artículos que tratan sobre la albúmina glicada y el papel de las óxido nítrico sintasas en las células endoteliales [158, 159]. Estos autores vieron cambios en la expresión de la eNOS por el tratamiento con gHSA, atribuyendo la producción de óxido nítrico y la apoptosis observada a la óxido nítrico sintasa inducible. Las concentraciones de gHSA usadas en estos artículos fueron varias veces más altas que en nuestros experimentos. En su primer trabajo observaron un impresionante efecto en el incremento de óxido nítrico inducido con 35 ó 17 mg/mL de gHSA y una reducción en el ritmo de proliferación celular. Sin embargo, en su siguiente trabajo ellos usaron unas concentraciones de gHSA menores que en el primer caso (la concentración más alta fue de 10 mg/mL), y pese a ello observaron apoptosis en un 10% de las células. Por estas razones, los efectos observados en estos artículos son

difíciles de comparar con nuestro trabajo. En el trabajo de Chen et al. observaron descensos en la producción del óxido nítrico y un aumento en la expresión de eNOS en HUVEC cultivadas sobre colágeno glicado [250]. Otro estudio mostró un incremento en la producción de nitritos en células del músculo liso vascular tratadas con gHSA [164].

Por nuestra parte, cuando tratamos las células con el inhibidor de AP-1 descendió la expresión de eNOS, independientemente de la presencia de la HSA o la gHSA en el tratamiento. En relación a estos resultados se ha visto que la AP-1 regula la expresión del gen de la eNOS. El promotor de la eNOS carece de la caja TATA y tiene sitios de unión potencial a la AP-1 [251]. La AP-1 aumenta la transcripción de la eNOS inducida por la ciclosporina A, la hipoxia, el estrés de cizalla y el antioxidante ácido nordihidroguaiarético [252]. También se observó que por efecto del H₂O₂ se produce una reducción en la unión de la AP-1 al promotor de la eNOS, reduciendo por tanto la expresión de este gen [253]. Estos resultados sugieren un importante papel de la AP-1 en la expresión de la eNOS, siendo todos estos datos coherentes con nuestros resultados. Cuando inhibimos la activación de la AP-1 con el SP600125, observamos un descenso en la expresión de la eNOS en las HUVEC, de acuerdo con la idea descrita en los trabajos anteriores. De todas formas no en todos los trabajos la unión de la AP-1 al promotor aumenta la expresión de la eNOS. En células endoteliales humanas aórticas tratadas con altas concentraciones de glucosa la unión de cJun y AP-1 al promotor de la eNOS produjo un descenso en los niveles de ARN mensajero de la eNOS [254].

Nuestros datos indicaron que la eNOS es desacoplada por la albúmina con modificaciones de Amadori. En nuestros experimentos encontramos que el tratamiento con gHSA aumentaba la producción de ROS con respecto al HSA. En presencia del inhibidor de la AP-1, SP600125, en el tratamiento con HSA aumentó la producción de ROS. Dicho resultado es coherente con el descenso de expresión de la eNOS producido por el tratamiento con SP600125. Al disminuir la expresión de eNOS aumentaba la cantidad de ROS que medíamos ya que existía menos óxido nítrico capaz de reaccionar con el anión superóxido. Sin embargo, el aumento de ROS inducido por gHSA se perdió cuando se encontraba presente el inhibidor de la AP-1. Esto podría ser explicado si la eNOS se encontrase desacoplada. Si parte de la producción de

ROS proviene de este estado de la eNOS, cuando esté presente el inhibidor, SP600125, disminuirá la expresión de la óxido nítrico sintasa y en consecuencia disminuirá la producción de ROS.

Realizamos una serie de experimentos con el inhibidor de la eNOS, L-NAME, para poder saber si la sintasa se encontraba desacoplada en presencia de gHSA. Como resultado vimos que el tratamiento de HSA con L-NAME aumenta las ROS producidas, indicando que la eNOS estaba funcionando correctamente. Cuanto menos óxido nítrico producido, más anión superóxido libre que puede ser detectado. Sin embargo, cuando tratamos las HUVEC con gHSA y L-NAME, la cantidad de ROS producidas disminuyó, tal y como ocurriría si la eNOS estuviese desacoplada. La eNOS desacoplada produce aniones superóxido y esta actividad es inhibida por el L-NAME. Estudios anteriores observaron que el desacoplamiento de la eNOS es una condición que aparece en varios modelos de estudio de factores de riesgo o problemas cardiovasculares, que ya hemos comentado que se asocian a la disfunción endotelial. Se ha observado el desacoplamiento de la eNOS en aortas de rata tratadas con peroxinitrito [255], en células endoteliales tratadas con LDL [256], en vasos sanguíneos de animales con condiciones patofisiológicas tales como la hipertensión arterial espontánea o inducida [237, 257-259], o como la diabetes inducida por estreptozotocina [260] o por tolerancia a la nitroglicerina [261].

El desacoplamiento de la sintasa también se ha visto en pacientes con distintos factores de riesgo cardiovascular. El desacoplamiento de la eNOS se ha observado en pacientes con disfunción endotelial debida a la hipercolesterolemia [262], a la *diabetes mellitus* [261], a la hipertensión esencial [263] o al tabaquismo crónico [261].

En nuestro estudio hemos visto cómo la albúmina glicada puede llevar a un aumento de expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa. El estrés oxidativo producido por la NADPH oxidasa se ha relacionado también con el desacoplamiento de la eNOS. En un estudio realizado por Landmesser et al. con ratas hipertensas observaron un aumento en el estrés oxidativo dependiente de eNOS. El aumento de la tetrahidrobiopterina oxidada y parte del estrés oxidativo dependía de la subunidad citosólica reguladora de la

NADPH oxidasa, la p47phox [259]. En este estudio mostraron de forma clara que puede haber una relación entre la NADPH oxidasa y el desacoplamiento de la eNOS por agotamiento de la tetrahydrobiopterina, al estar está oxidada. En nuestros experimentos se produjo un aumento en la expresión de las subunidades de NADPH oxidasa, Nox4 y p22phox, inducido por la albúmina glicada y éste podría ser un buen mecanismo para llevar al desacoplamiento de la eNOS.

Existen varios mecanismos que llevan al desacoplamiento de la eNOS: oxidación o degradación de la tetrahydrobiopterina, el descenso de los niveles intracelulares de la L-arginina regulados por arginasas o la modificación de la L-arginina, un posible mecanismo mediado por la ADMA, un inhibidor endógeno de la NOS y la S-glutacionilación de la eNOS [16].

Los niveles de la tetrahydrobiopterina intracelular se relacionan con la producción del óxido nítrico y de la L-citrulina [264]. Los niveles intracelulares de la tetrahydrobiopterina dependen del equilibrio entre su síntesis *de novo* y su degradación u oxidación. La tetrahydrobiopterina es uno de los agentes con mayor poder reductor y el estrés oxidativo lleva a deplecionarla [109]. La reacción entre el óxido nítrico y el anión superóxido lleva a la producción de peroxinitrito y se ha descrito que éste oxida la tetrahydrobiopterina (BH4) a la trihydrobiopterina (BH3), la cual puede ser reducida de nuevo a BH4 por la eNOS o por la vitamina C [265]. La BH3 también puede dar lugar a la BH2 que de nuevo se puede reducir a la BH4 gracias a la vitamina C [266].

Las modificaciones con AGE en la L-arginina, potencialmente inhiben la actividad de la eNOS según Lai et al [267]. Estos autores observaron una pequeña inhibición de la L-arginasa por la L-arginina modificada con AGE. Además, la acción de las arginasas puede llevar al agotamiento de la L-arginina como sustrato de la enzima. Así, se ha encontrado un aumento de la expresión de la arginasa II en el cuerpo cavernoso de diabéticos [268]. En HUVEC, la actividad de la arginasa II se vio incrementada en presencia de trombina o citocinas inflamatorias [269, 270].

La ADMA, un inhibidor de la NOS, fue propuesta como un posible mecanismo para la disfunción endotelial producida por AGE [271]. En ratas tratadas con gBSA se observó un incremento en ADMA y un descenso en

DDAH, la enzima que degrada el ADMA. En células endoteliales que sobreexpresaban DDAH, la gBSA redujo los niveles de expresión y la actividad de la DDAH, y en consecuencia, aumentó los niveles de ADMA [272]. Tanto la arginina N-metiltransferasa tipo I como la DDAH son sensibles a las ROS y su activación o inactivación, respectivamente, pueden ser debidas al aumento del estrés oxidativo [273]. Se ha visto la importancia de este sistema de desacoplamiento en células endoteliales, en modelos de ratas diabéticas y en pacientes con hiperhomocisteinemia [273-275]. Todo esto sugiere una cuestión interesante: si la presencia de ADMA, un inhibidor endógeno de la eNOS desacopla esta enzima, ¿por qué el L-NAME, otro inhibidor de la enzima, no tiene el mismo efecto? La respuesta es que cuando tratamos con el L-NAME, éste ocupa el lugar de la L-arginina y la reducción del hierro del grupo hemo por parte del dominio reductasa se encuentra inhibida. Entonces, el hemo férrico no es capaz de unir el oxígeno y no producirá aniones superóxido. Sin embargo, cuando la ADMA inhibe la formación de óxido nítrico, aumenta la reducción del hierro del grupo hemo y aumenta la generación de aniones superóxido por la eNOS [276, 277].

Finalmente, se ha observado que la S-glutathionilación es un mecanismo reversible para desacoplar la eNOS [91]. Es un desacoplamiento independiente del aporte de tetrahidrobiopterina o L-arginina. La S-glutathionilación es una modificación postransduccional por la cual el tripéptido glutatión se une reversiblemente a la proteína por un puente disulfuro. Esta modificación se puede producir bajo condiciones de estrés oxidativo [91].

En definitiva, en detrimento de otros mecanismos implicados, la explicación del descenso en la producción de ROS obtenida con el SP600125 en presencia de gHSA, proviene de un desacoplamiento de la eNOS inducido por la proteína glicada. De esta manera, en presencia de la HSA y el SP600125 se produce una caída en la expresión de la eNOS, que se manifiesta en un aumento de la producción de ROS ya que hay menos óxido nítrico capaz de interaccionar con el anión superóxido generado. Por el contrario, en presencia de la gHSA y el SP600125, la caída en la expresión de la eNOS, que en este caso se encuentra desacoplada por la gHSA, se manifiesta en un descenso en la producción de ROS, porque precisamente la eNOS desacoplada deja de contribuir a la producción de ROS.

La albúmina glicada en la producción de moléculas de adhesión y citocinas inflamatorias

Ya hemos visto que la albúmina glicada tiene efectos relacionados con dos factores de transcripción, el NF- κ B y la AP-1, que a su vez regulan la inflamación y la expresión de factores de adhesión. A continuación, comprobamos los cambios en la producción de citocinas inflamatorias y moléculas de adhesión en las HUVEC en presencia gHSA 25 μ g/mL.

A nivel clínico se ha asociado la albúmina glicada con la aterosclerosis [141] y con el aumento de diferentes factores pro-inflamatorios o de adhesión leucocitaria como TNF- α , MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina [278-280]. De ahí que en nuestros experimentos hayamos querido medir la producción de parte de estos factores.

En nuestros experimentos comprobamos que la gHSA aumentaba los niveles del ARN mensajero de ICAM-1 y VCAM-1 en HUVEC tras 4 horas de tratamiento. Esta relación ya se había visto en distintos modelos celulares. La albúmina glicada aumenta la expresión de estas moléculas de adhesión en células mesangiales y en células endoteliales [281, 282]. Además se ha asociado la presencia de albúmina glicada con el aumento de ICAM-1 y VCAM-1 en el músculo liso vascular de diabéticos [278]. Todos estos datos, por lo tanto, indican que la albúmina glicada produce un incremento en la presencia de moléculas de adhesión, lo que en definitiva favorece la interacción de las células leucocitarias con el endotelio.

En nuestras condiciones experimentales, no hemos observado ningún cambio significativo inducido por la gHSA en la producción de MCP-1 tanto a nivel del ARN mensajero como de la proteína. Sin embargo, se ha visto que en diabéticos están aumentados los niveles de MCP-1, asociados a un aumento de albúmina en la orina y que la albúmina glicada inducía la producción de MCP-1 en las células mesangiales [283]. Este aumento de MCP-1 inducido por la albúmina glicada también se ha visto en células del epitelio pigmentario de la retina, en queratinocitos corneales y en células gliales de Müller [160, 233, 284-286]. También se ha visto que la albúmina glicada puede aumentar la producción de MCP-1 en células del músculo liso vascular [130, 163], sin embargo, coincidiendo con nuestros resultados, no se ha observado aumento

en la producción de MCP-1 en HUVEC tratadas con albúmina glicada [160]. Todo ello parece indicar que la producción de MCP-1 inducida por la gHSA depende del tipo celular afectado, siendo las células endoteliales unas de las menos inducibles por la albúmina glicada.

Pese a no ver diferencias en la producción de MCP-1 inducidas por la albúmina glicada, hemos estudiado el efecto de distintos inhibidores en esta producción.

Nuestros resultados mostraron que PI3K no parece desempeñar ningún papel en la expresión de MCP-1. En un estudio previo se observó un aumento de la expresión de MCP-1 en las HUVEC tratadas con IL-1 de forma independiente de la ruta regulada por PI3K [287]. En este estudio, el LY-294002 inhibió el aumento de MCP-1 inducido por IL-1, pero por inhibir la activación del NFkB. De manera contraria, otro artículo muestra un aumento de la producción de MCP-1 en HUVEC tratadas con visfatina a través de la PI3K [288]. De forma conjunta, estos datos sugieren que la participación de la PI3K en la producción de MCP-1 en la célula endotelial depende del estímulo concreto que active dicha producción.

En el caso de la inhibición de MEK 1/2, nuestros resultados no mostraron ningún efecto sobre la producción de MCP-1. Este resultado es contrario a múltiples estudios que después de diversos estímulos mostraron un aumento de MCP-1 mediado por ERK 1/2 [288-290], aunque ninguno de estos estímulos coincide con las condiciones aplicadas en nuestros experimentos.

En nuestros resultados hemos encontrado un efecto destacable. Aunque no hemos visto un incremento en la producción de MCP-1 inducida por gHSA, hemos podido observar que cuando inhibimos el NF-kB o la AP-1 se pueden diferenciar los efectos de la HSA y la gHSA. Cuando se inhibió el NF-kB pudimos observar un descenso significativo de la producción de MCP-1 cuando tratamos con HSA. Sin embargo, cuando inhibimos la AP-1, solo pudimos ver un descenso significativo en la producción de MCP-1 en presencia del gHSA.

Ya se había estudiado el descenso de la producción de MCP-1 con la inhibición de NF-kB y AP-1 y por lo tanto era un resultado esperado ya que se ha visto que estos factores de transcripción pueden regular la expresión de la

citocina [92, 163, 291, 292]. Hay un sitio de unión para la AP-1 y dos para el NF-kB en el promotor del gen de MCP-1 en humanos, ratones y ratas [293, 294] y un estudio previo en células endoteliales sugiere que la expresión de MCP-1 está regulada por la unión cooperativa de NF-kB y AP-1 [295].

Una posible explicación para los efectos diferenciales entre HSA y gHSA en la producción de MCP-1 en presencia de los inhibidores de los factores de transcripción puede ser debido a las distintas aportaciones del estrés oxidativo en los dos tratamientos. Ya se ha observado que las ROS producidas por NADPH oxidasas están implicadas en la regulación del gen de MCP-1 [291, 296]. Además, una concentración alta de glucosa puede aumentar la producción de MCP-1 [297] y este aumento puede ser revertido por dos antioxidantes [298]. Cuando en presencia del gHSA tratamos las HUVEC con el inhibidor del NF-kB, no observamos un descenso significativo de la producción de MCP-1 que sí vemos en presencia de HSA. Esto puede deberse a que la gHSA induce un aporte mayor de ROS que HSA, al poder desacoplar la eNOS, como ya hemos discutido.

Además, ya habíamos comentado que las proteínas glicadas pueden activar el NF-kB [131, 152, 164, 173] y esto fue confirmado por nuestros resultados. Esta activación del NF-kB por parte de la gHSA puede hacer que la inhibición con el BAY11-7082 no sea tan eficaz y por ese motivo, el descenso en la producción de MCP-1 no sea significativo en comparación con el descenso inducido por el tratamiento con BAY11-7082 en presencia de HSA.

En el caso de la inhibición de la AP-1, el HSA sería el tratamiento en el que encontraríamos un estrés oxidativo más elevado, como observamos en los experimentos sobre producción extracelular de ROS. Sin embargo, en presencia de la gHSA y con la AP-1 inhibida, la producción de ROS no es tan marcada, lo que podría explicar entonces el descenso significativo en la producción de MCP-1 con respecto al control en estas condiciones. Hay que tener en cuenta que con la inhibición de AP-1 se disminuye la expresión de eNOS y por lo tanto, también el aporte de ROS que supone cuando es desacoplada por la gHSA. En definitiva, parece que en ausencia de actividad de cualquiera de estos factores de transcripción, NF-kB y AP-1, disminuye la producción de MCP-1, pero que esta disminución solo será significativa con los

tratamientos que inducen menor estrés oxidativo. En consecuencia, la producción de ROS también parece que puede estar implicada en la expresión y liberación de MCP-1. Al menos en el mantenimiento de ciertos niveles de esta proteína en las células endoteliales humanas.

Estrés oxidativo, productos de Amadori y disfunción endotelial

Como hemos visto en este trabajo, la albúmina con modificaciones de Amadori, un producto que se encuentra aumentado en la diabetes, puede llevar incluso de forma temprana al aumento del estrés oxidativo tanto por aumento de las proteínas productoras de las ROS como por el desacoplamiento de la eNOS. Estos elementos están íntimamente ligados a la disfunción endotelial. Como ya hemos comentado, el aumento del estrés oxidativo está ligado a otras muchas características de la disfunción endotelial como son la respuesta inflamatoria o la pérdida de biodisponibilidad del óxido nítrico.

Debemos destacar el hecho de que nuestras concentraciones de albúmina glicada sean tan bajas. En la totalidad de los estudios en modelos celulares las concentraciones empleadas de albúmina Amadori son siempre menores que las que se encuentran en sujetos sanos. Sin embargo, incluso estas concentraciones son mayores que las que han mostrado efecto en nuestros experimentos. En referencia a este punto, hay estudios que observan como la disfunción endotelial es una de las características más tempranas en el desarrollo de la aterosclerosis y de la enfermedad coronaria [299]. Es interesante remarcar que la disfunción endotelial puede preceder a la diabetes diagnosticada en personas con tendencia a la diabetes por herencia familiar. En sujetos no diabéticos que tienen un pariente de primer grado con *diabetes mellitus* tipo 2 se observó una vasodilatación dependiente de endotelio empeorada y también marcadores de activación de la célula endotelial [23, 29, 300]. Los marcadores sanguíneos de la activación endotelial y de la inflamación sistémica también están elevados en los hijos no diabéticos pero con evidencia de resistencia a la insulina medida por un test de glucosa [300]. Además de estos estudios observacionales transversales, estudios prospectivos han mostrado que los marcadores sanguíneos de la activación endotelial predicen la incidencia de *diabetes mellitus* tipo 2 después de ajustar otros factores de riesgo, incluyendo el índice de masa corporal, el nivel de actividad física, los

lípidos, los antecedentes familiares de *diabetes mellitus* y la tolerancia a la glucosa [62, 301]. Además, el empeoramiento en la dilatación vascular mediada por flujo [302] y los polimorfismos de la eNOS (E298D, IVS18 + 27A→C) son predictores independientes de la incidencia de *diabetes mellitus* tipo 2 [303]. En definitiva, la disfunción endotelial temprana puede estar relacionada con bajos niveles de albúmina glicada que ya afecten a diversas zonas especialmente vulnerables al estrés oxidativo.

El incremento en el estrés oxidativo puede preceder a la aparición de la diabetes ya que puede producir una disfunción de las células β del páncreas. De esta manera, pequeños cambios en la concentración de albúmina glicada podrían comenzar a dañar el páncreas, siendo un mecanismo que puede llevar a la diabetes. Este órgano es especialmente sensible al estrés oxidativo al tener bajos niveles de sistemas antioxidantes tales como la glutatión peroxidasa, la catalasa o la SOD [304, 305]. En diabéticos, la hiperglicemia por si misma es capaz de producir ROS y reducir la expresión de insulina y su secreción, llevando finalmente a la apoptosis de las células β del páncreas [306], pudiéndose revertir el efecto en presencia de antioxidantes [306, 307]. Además, se ha encontrado un aumento de dos marcadores de la oxidación como son la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG) y la 4-hidroxi-2, 3-nonenal (4-HNE) en los islotes pancreáticos en condiciones diabéticas [308, 309]. Efectos similares fueron observados en ratas obesas y diabéticas Zucker y en hamsters diabéticos, otro modelo de diabetes tipo 2 [310, 311]. En estos hamsters los niveles de albúmina glicada fueron tres veces más altos que en los animales control, y estos niveles fueron disminuidos con antioxidantes y con piridoxamina, que es un inhibidor de AGE que actúa capturando a los productos de Amadori. En el estudio de la intolerancia a la glucosa en hamsters diabéticos ésta sólo mejoró con antioxidantes y con la piridoxamina. Por otra parte, solamente con el tratamiento antioxidante se consiguió un aumento tardío y débil de los niveles de insulina en el plasma. El tratamiento con piridoxamina disminuyó los niveles de albúmina glicada, y de dos marcadores de oxidación, la 8-OHdG y los lípidos peroxidados. Así, en este modelo animal se pudo ver la clara relación entre todos los elementos estudiados en nuestro trabajo, los niveles de albúmina glicada, el aumento de estrés oxidativo y la mejora de la diabetes en presencia de antioxidantes e inhibidores de la glicación de proteínas [311]. Recientemente se ha visto que la albúmina glicada

afecta a la producción de insulina y al metabolismo de la glucosa en células β del páncreas de rata [312].

Este aumento del estrés oxidativo temprano inducido por bajas concentraciones de productos de Amadori puede también tener algún efecto en la resistencia a la insulina, pudiendo tener un papel en la diabetes tipo 2. La producción de ROS evita la redistribución celular del IRS-1 y de la PI3K, impidiendo la translocación del transportador de la glucosa 4 (GLUT4 del inglés *glucose transporter type 4*) en los adipocitos 3T3-L1 [313, 314]. Además, el tratamiento con antioxidantes previene la resistencia a la insulina inducida por hiperglicemia *in vivo* [315]. En diabéticos tipo 2, tanto la administración crónica como la aguda de ácido α -lipoico, un antioxidante, mejoran la resistencia a la insulina, sugiriendo un papel para los ROS [316, 317]. Se ha observado que la albúmina glicada disminuye la captación de glucosa mediada por la insulina y la formación de glucógeno en la célula muscular lisa. Esta disminución sucede a través de la reducción de la fosforilación de la tirosina del IRS-1, un aumento de la fosforilación en serinas/treoninas y un aumento en la actividad de PKC, actividad que fue inhibida por un antioxidante [198].

Al principio de este apartado comentamos que la disfunción endotelial puede preceder a la aterosclerosis. De una manera interesante, con nuestros resultados se podría abrir una nueva línea de trabajo que puede relacionar la aterosclerosis con la disfunción endotelial en lugares vulnerables de los vasos.

La disfunción endotelial tiene características comunes con las zonas de los vasos con ausencia de estrés de cizalla y la presencia de la albúmina glicada, que serían sitios propensos a la aterosclerosis. Nuestro modelo celular es un modelo estático, pero sería interesante poder estudiar de manera conjunta los efectos del flujo turbulento y los productos de glicación para ver si sus efectos son sinérgico, aportando un posible mecanismo temprano de inicio de aterosclerosis en sitios vulnerables de los vasos al aumentar el estrés oxidativo local.

La razón por la que existen ciertas zonas en los vasos que son especialmente vulnerables a la aparición de la aterosclerosis no está clara, pero se ha relacionado con las turbulencias en el flujo que llevan a diferencias en el estrés de cizalla. Los vasos sanguíneos están constantemente sujetos a

varios tipos de fuerzas hemodinámicas (incluyendo la presión hidroestática, el estiramiento circunferencial y el estrés de cizalla inducido por el fluido) debidas a la presión y el flujo sanguíneo pulsátil. La capa de células endoteliales soporta el estrés de cizalla que ejercen las fuerzas de fricción del flujo sanguíneo y que actúan de manera paralela a la superficie luminal de los vasos [17]. Cuando la célula endotelial no está sometida a este estrés de cizalla, siendo el flujo discontinuo o turbulento, puede sufrir una serie de cambios que llevan a la disfunción endotelial. El flujo discontinuo o turbulento es característico de las ramificaciones o curvaturas de las arterias y venas. En el endotelio, la pérdida del estrés de cizalla provoca un aumento de estímulos pro-inflamatorios o pro-coagulantes. Las células endoteliales bajo el flujo turbulento exhiben un aumento en los niveles de NF- κ B, de c-Fos, de c-Jun [318], además de la expresión aumentada de ICAM-1 y E-selectina [319]. Por otro lado, la respuesta inflamatoria de las células endoteliales al lipopolisacárido y al TNF- α , es bloqueada por efecto del flujo laminar, pero no por el flujo discontinuo [320]. Las células endoteliales bajo un flujo laminar de poca intensidad, sin producir estrés de cizalla, aumentan la activación y la expresión de NF- κ B, ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, MCP-1, gp91phox, Nox4, JNK y presentan un mayor estrés oxidativo [17], además de disminuir la expresión de genes protectores como son la SOD, la hemo oxigenasa-1, la eNOS y la disminución de factores como la tetrahidrobiopterina o la prostaciclina. Sin embargo, se aprecia el efecto opuesto, esto es, la disminución de los factores de activación endotelial y un aumento de los genes protectores, en presencia de un flujo laminar lo suficientemente fuerte como para producir estrés de cizalla [17]. *In vivo*, se ha visto que en las zonas propensas a la aterosclerosis las células endoteliales han aumentado su proliferación, la captación de lípidos, la adhesión de monocitos, presentan un incremento en la expresión de ICAM-1, VCAM-1, E-selectina, angiotensina 2, NF- κ B, JNK, MCP-1 y factor similar al factor eritroide nuclear (Nrf2 del inglés *nuclear factor erythroid 2-like 2*) y el estrés oxidativo es mayor que en los segmentos de vasos rectilíneos [17].

En nuestro estudio observamos una particularidad que quizás esté relacionada con la regulación del estado endotelial por el estrés de cizalla. En este estrés existe un equilibrio entre cuatro factores de transcripción, por un lado el NF- κ B y la AP-1, los protagonistas proinflamatorios y procoagulantes, y

por otro lado, el factor similar al factor Krüppel (KLF2 del inglés *factor Krüppel-like factor 2*) y Nrf2, con efectos anti-inflamatorios y anti-coagulantes. En el caso de que haya estrés de cizalla se aumenta la actividad del KLF2 y del Nrf2 [321], el primero es específicamente activado por este estrés y el segundo controla genes relacionados con la defensa antioxidante [322]. Estos dos factores de transcripción se han visto inducidos en zonas con poca predisposición a presentar aterosclerosis de vasos sanguíneos *in vivo* [323, 324].

En nuestro modelo estático de cultivo celular en presencia de gHSA observamos la activación de NF- κ B y un importante papel de la inhibición de AP-1 sobre la regulación de la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, como las subunidades de la NADPH oxidasa y la eNOS. Sería una cuestión interesante estudiar si en esta relación tiene algún papel el Nrf2 y el KLF2 o si estos efectos causados por la albúmina glicada se ven intensificados en presencia del flujo turbulento. La inhibición de la AP-1 puede activar respuestas compensatorias que provoquen estos cambios pero también puede ocurrir que estemos desequilibrando la acción contrapuesta de estos factores de transcripción. Nrf2 y KLF2 están regulados por distintos mecanismos. Los niveles de expresión de Nrf2 están regulados por su degradación en el proteosoma, y a su vez, ésta está regulada por la proteína asociada a ECH similar a Kelch (Keap1 del inglés *Kelch-like ECH-associated protein 1*), que es sensible al estrés oxidativo [325]. Como ya hemos comentado, el Nrf2 controla la expresión de genes con funciones antioxidantes, como la hemo oxigenasa 1 o la NADPH dehidrogenasa quinona 1. El Nrf2 controla esta expresión por la unión a secuencias que regulan distintas proteínas con propiedades antioxidantes, éstas secuencias reciben el nombre de elementos de respuesta antioxidante (ARE del inglés *antioxidant response element*).

Por otro lado, el KLF2 está modulado por el estrés de cizalla y también puede ser activado por estatinas. KLF2 aumenta la expresión de eNOS y trombomodulina por un lado y por otro, disminuye la expresión del PAI-1, la IL-8 y el factor tisular [321].

En resumen, en este trabajo hemos estudiado los efectos de la albúmina glicada sobre las células endoteliales humanas, consiguiendo relacionar la

diabetes, el estrés oxidativo y la disfunción endotelial. Hemos observado que la gHSA aumenta el estrés oxidativo en la célula endotelial a través de dos mecanismos, el aumento de la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa y el desacoplamiento de la eNOS. También hemos observado un importante papel de la AP-1 en el estrés oxidativo vascular. Además, nuestros resultados mostraron que la gHSA puede tener una importante función reguladora sobre la expresión de moléculas de adhesión y de la MCP-1

Los cambios observados en la célula endotelial nos permiten explicar parte de las características conocidas de la diabetes, el estrés oxidativo y la disfunción endotelial. Nuestro trabajo abre nuevas vías de estudio sobre como se inicia y desarrolla la disfunción endotelial, un problema que se encuentra relacionado tanto con factores de riesgo como directamente con las patologías cardiovasculares. Este conocimiento permite el desarrollo de nuevas estrategias de prevención y descubre nuevas dianas terapéuticas para las enfermedades cardiovasculares, además de suponer una ampliación del conocimiento de la *diabetes mellitus*.

Conclusiones

Conclusiones

1. Las células endoteliales aisladas de la vena umbilical humana son un buen modelo de estudio del papel de las proteínas glicadas en la producción de ROS.

2. El tratamiento de las HUVEC con un producto de Amadori, como es la albúmina glicada, a bajas concentraciones aumenta la producción de aniones superóxido extracelularmente de manera dependiente de la concentración a través de la NADPH oxidasa. Este efecto en la producción sucede a tiempos cortos y se mantiene al menos durante 12 horas. El aumento de ROS también se produce a nivel intracelular

3. El tratamiento de las HUVEC con albúmina glicada aumenta la expresión de las principales subunidades endoteliales de NADPH oxidasa, la Nox4 y la p22phox. Esto se debe, probablemente, a la activación del NF-kB por parte de la gHSA

4. El tratamiento de las HUVEC con albúmina glicada desacopla la eNOS.

5. La inhibición de la AP-1 aumenta la expresión de las subunidades de NADPH oxidasa, Nox4 y p22phox, pero disminuye la expresión de la eNOS esto explica que la inhibición de la AP-1 aumente el estrés oxidativo en HUVEC tratadas con albúmina pero no con albúmina glicada

6. El aumento de ROS inducido por la gHSA en HUVEC se debe al aumento de expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa, la Nox4 y la p22phox, además de por el desacoplamiento de la eNOS. Las rutas mediadas por PI3K o MEK 1/2 no están implicadas en este efecto.

7. La gHSA aumenta la expresión de ICAM-1, VCAM-1, pero no modifica la producción de MCP-1. Sin embargo el papel modulador de la gHSA sobre el estrés oxidativo podría regular indirectamente los niveles de producción de MCP-1 en la célula endotelial.

8. Los productos de Amadori, precursores de los AGE, pueden provocar respuestas a nivel del endotelio vascular que pueden llevar a la disfunción del endotelio y a los problemas cardiovasculares asociados.

Bibliografía

Bibliografia

1. Munzel, T., et al., *Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction*. Ann Med, 2008. **40**(3): p. 180-96.
2. Hirata, Y., et al., *Diagnosis and treatment of endothelial dysfunction in cardiovascular disease*. Int Heart J, 2010. **51**(1): p. 1-6.
3. Tabit, C.E., et al., *Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications*. Rev Endocr Metab Disord, 2010. **11**(1): p. 61-74.
4. Cai, H. and Harrison, D.G., *Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress*. Circ Res, 2000. **87**(10): p. 840-4.
5. Ciccone, M.M., et al., *Clinical correlates of endothelial function in chronic heart failure*. Clin Res Cardiol, 2010.
6. Lassegue, B. and Clempus, R.E., *Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003. **285**(2): p. R277-97.
7. Fichtlscherer, S., et al., *Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease*. Circulation, 2000. **102**(9): p. 1000-6.
8. Frey, R.S., Ushio-Fukai, M., and Malik, A.B., *NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(4): p. 791-810.
9. van den Oever, I.A., et al., *Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**: p. 792393.
10. Goldberg, R.B., *Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(9): p. 3171-82.
11. Ushio-Fukai, M., et al., *Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis*. Circ Res, 2002. **91**(12): p. 1160-7.
12. Ikeda, S., et al., *IQGAP1 regulates reactive oxygen species-dependent endothelial cell migration through interacting with Nox2*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(11): p. 2295-300.
13. Burdon, R.H., *Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation*. Free Radic Biol Med, 1995. **18**(4): p. 775-94.
14. Petry, A., et al., *NOX2 and NOX4 mediate proliferative response in endothelial cells*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(9-10): p. 1473-84.
15. Parman, T., Wiley, M.J., and Wells, P.G., *Free radical-mediated oxidative DNA damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity*. Nat Med, 1999. **5**(5): p. 582-5.

16. Forstermann, U., *Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease*. Pflügers Arch, 2010. **459**(6): p. 923-39.
17. Chiu, J.J. and Chien, S., *Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives*. Physiol Rev, 2011. **91**(1): p. 327-87.
18. Zoungas, S. and Patel, A., *Cardiovascular outcomes in type 2 diabetes: the impact of preventative therapies*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1212**: p. 29-40.
19. Johnstone, M.T., et al., *Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus*. Circulation, 1993. **88**(6): p. 2510-6.
20. McVeigh, G.E., et al., *Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus*. Diabetologia, 1992. **35**(8): p. 771-6.
21. Steinberg, H.O., et al., *Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance*. J Clin Invest, 1996. **97**(11): p. 2601-10.
22. de Jongh, R.T., et al., *Impaired microvascular function in obesity: implications for obesity-associated microangiopathy, hypertension, and insulin resistance*. Circulation, 2004. **109**(21): p. 2529-35.
23. Balletshofer, B.M., et al., *Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance*. Circulation, 2000. **101**(15): p. 1780-4.
24. Campia, U., et al., *Insulin impairs endothelium-dependent vasodilation independent of insulin sensitivity or lipid profile*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(1): p. H76-82.
25. Shinozaki, K., et al., *Coronary endothelial dysfunction in the insulin-resistant state is linked to abnormal pteridine metabolism and vascular oxidative stress*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(7): p. 1821-8.
26. Pasimeni, G., et al., *Non-invasive evaluation of endothelial dysfunction in uncomplicated obesity: relationship with insulin resistance*. Microvasc Res, 2006. **71**(2): p. 115-20.
27. Ardigo, D., et al., *Relation of plasma insulin levels to forearm flow-mediated dilatation in healthy volunteers*. Am J Cardiol, 2006. **97**(8): p. 1250-4.
28. Lteif, A.A., Han, K., and Mather, K.J., *Obesity, insulin resistance, and the metabolic syndrome: determinants of endothelial dysfunction in whites and blacks*. Circulation, 2005. **112**(1): p. 32-8.
29. Caballero, A.E., et al., *Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes*. Diabetes, 1999. **48**(9): p. 1856-62.
30. Hamburg, N.M., et al., *Metabolic syndrome, insulin resistance, and brachial artery vasodilator function in Framingham Offspring participants without clinical evidence of cardiovascular disease*. Am J Cardiol, 2008. **101**(1): p. 82-8.

31. Baron, A.D., et al., *Effect of perfusion rate on the time course of insulin-mediated skeletal muscle glucose uptake*. Am J Physiol, 1996. **271**(6 Pt 1): p. E1067-72.
32. Mather, K., et al., *Evidence for physiological coupling of insulin-mediated glucose metabolism and limb blood flow*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**(6): p. E1264-70.
33. Baron, A.D., *Insulin resistance and vascular function*. J Diabetes Complications, 2002. **16**(1): p. 92-102.
34. Steinberg, H.O., et al., *Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release*. J Clin Invest, 1994. **94**(3): p. 1172-9.
35. Pistrosch, F., et al., *In type 2 diabetes, rosiglitazone therapy for insulin resistance ameliorates endothelial dysfunction independent of glucose control*. Diabetes Care, 2004. **27**(2): p. 484-90.
36. Caballero, A.E., et al., *The effects of troglitazone, an insulin-sensitizing agent, on the endothelial function in early and late type 2 diabetes: a placebo-controlled randomized clinical trial*. Metabolism, 2003. **52**(2): p. 173-80.
37. Mather, K.J., Verma, S., and Anderson, T.J., *Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus*. J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(5): p. 1344-50.
38. de Aguiar, L.G., et al., *Metformin improves endothelial vascular reactivity in first-degree relatives of type 2 diabetic patients with metabolic syndrome and normal glucose tolerance*. Diabetes Care, 2006. **29**(5): p. 1083-9.
39. Campia, U., Matuskey, L.A., and Panza, J.A., *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation with pioglitazone improves endothelium-dependent dilation in nondiabetic patients with major cardiovascular risk factors*. Circulation, 2006. **113**(6): p. 867-75.
40. Hetzel, J., et al., *Rapid effects of rosiglitazone treatment on endothelial function and inflammatory biomarkers*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(9): p. 1804-9.
41. Cheetham, C., et al., *Losartan, an angiotensin type 1 receptor antagonist, improves endothelial function in non-insulin-dependent diabetes*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(5): p. 1461-6.
42. O'Driscoll, G., et al., *Improvement in endothelial function by angiotensin-converting enzyme inhibition in non-insulin-dependent diabetes mellitus*. J Am Coll Cardiol, 1999. **33**(6): p. 1506-11.
43. Shaul, P.W., et al., *Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae*. J Biol Chem, 1996. **271**(11): p. 6518-22.
44. Michel, J.B., et al., *Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin*. J Biol Chem, 1997. **272**(25): p. 15583-6.
45. Lam, T.Y., et al., *Impairment of the vascular relaxation and differential expression of caveolin-1 of the aorta of diabetic +db/+db mice*. Eur J Pharmacol, 2006. **546**(1-3): p. 134-41.

46. Bucci, M., et al., *Diabetic mouse angiopathy is linked to progressive sympathetic receptor deletion coupled to an enhanced caveolin-1 expression*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(4): p. 721-6.
47. Garcia-Cardena, G., et al., *Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90*. *Nature*, 1998. **392**(6678): p. 821-4.
48. Lei, H., et al., *Protein kinase A-dependent translocation of Hsp90 alpha impairs endothelial nitric-oxide synthase activity in high glucose and diabetes*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(13): p. 9364-71.
49. Okon, E.B., et al., *Compromised arterial function in human type 2 diabetic patients*. *Diabetes*, 2005. **54**(8): p. 2415-23.
50. Muniyappa, R., et al., *Cardiovascular actions of insulin*. *Endocr Rev*, 2007. **28**(5): p. 463-91.
51. Nacci, C., Tarquinio, M., and Montagnani, M., *Molecular and clinical aspects of endothelial dysfunction in diabetes*. *Intern Emerg Med*, 2009. **4**(2): p. 107-16.
52. Wheatcroft, S.B., et al., *Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function*. *Diabet Med*, 2003. **20**(4): p. 255-68.
53. Piatti, P.M., et al., *Hypertriglyceridemia and hyperinsulinemia are potent inducers of endothelin-1 release in humans*. *Diabetes*, 1996. **45**(3): p. 316-21.
54. Montagnani, M., et al., *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(3): p. 1794-9.
55. Boger, R.H., *The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor*. *Cardiovasc Res*, 2003. **59**(4): p. 824-33.
56. Libby, P., Ridker, P.M., and Maseri, A., *Inflammation and atherosclerosis*. *Circulation*, 2002. **105**(9): p. 1135-43.
57. Huang, A.L. and Vita, J.A., *Effects of systemic inflammation on endothelium-dependent vasodilation*. *Trends Cardiovasc Med*, 2006. **16**(1): p. 15-20.
58. Keaney, J.F., Jr., et al., *Heritability and correlates of intercellular adhesion molecule-1 in the Framingham Offspring Study*. *J Am Coll Cardiol*, 2004. **44**(1): p. 168-73.
59. Festa, A., et al., *Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS)*. *Circulation*, 2000. **102**(1): p. 42-7.
60. Dandona, P., et al., *Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. **83**(8): p. 2907-10.
61. Vozarova, B., et al., *Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion*. *Obes Res*, 2001. **9**(7): p. 414-7.
62. Meigs, J.B., et al., *Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus*. *JAMA*, 2004. **291**(16): p. 1978-86.

63. Schulze, M.B., et al., *C-reactive protein and incident cardiovascular events among men with diabetes*. *Diabetes Care*, 2004. **27**(4): p. 889-94.
64. Pradhan, A.D., et al., *C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus*. *JAMA*, 2001. **286**(3): p. 327-34.
65. Shoelson, S.E., Lee, J., and Goldfine, A.B., *Inflammation and insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(7): p. 1793-801.
66. Read, M.A., et al., *NF-kappa B and I kappa B alpha: an inducible regulatory system in endothelial activation*. *J Exp Med*, 1994. **179**(2): p. 503-12.
67. Kim, J.A., et al., *Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms*. *Circulation*, 2006. **113**(15): p. 1888-904.
68. Kim, F., Gallis, B., and Corson, M.A., *TNF-alpha inhibits flow and insulin signaling leading to NO production in aortic endothelial cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. **280**(5): p. C1057-65.
69. Bierhaus, A., et al., *Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells*. *Diabetes*, 1997. **46**(9): p. 1481-90.
70. Bierhaus, A., et al., *Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB*. *Diabetes*, 2001. **50**(12): p. 2792-808.
71. de Alvaro, C., et al., *Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(17): p. 17070-8.
72. Kim, F., et al., *Free fatty acid impairment of nitric oxide production in endothelial cells is mediated by IKKbeta*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(5): p. 989-94.
73. Kim, F., et al., *Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(11): p. 1982-8.
74. Pierce, G.L., et al., *Nuclear factor-(kappa)B activation contributes to vascular endothelial dysfunction via oxidative stress in overweight/obese middle-aged and older humans*. *Circulation*, 2009. **119**(9): p. 1284-92.
75. Giacco, F. and Brownlee, M., *Oxidative stress and diabetic complications*. *Circ Res*, 2010. **107**(9): p. 1058-70.
76. Inoguchi, T., et al., *High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells*. *Diabetes*, 2000. **49**(11): p. 1939-45.
77. Cohen, R.A. and Tong, X., *Vascular oxidative stress: the common link in hypertensive and diabetic vascular disease*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010. **55**(4): p. 308-16.

78. Hammes, H.P., et al., *Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy*. Nat Med, 2003. **9**(3): p. 294-9.
79. Berrone, E., et al., *Regulation of intracellular glucose and polyol pathway by thiamine and benfotiamine in vascular cells cultured in high glucose*. J Biol Chem, 2006. **281**(14): p. 9307-13.
80. Marchetti, V., et al., *Benfotiamine counteracts glucose toxicity effects on endothelial progenitor cell differentiation via Akt/FoxO signaling*. Diabetes, 2006. **55**(8): p. 2231-7.
81. Du, X., Edelstein, D., and Brownlee, M., *Oral benfotiamine plus alpha-lipoic acid normalises complication-causing pathways in type 1 diabetes*. Diabetologia, 2008. **51**(10): p. 1930-2.
82. Ting, H.H., et al., *Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus*. J Clin Invest, 1996. **97**(1): p. 22-8.
83. Jagadeesha, D.K., et al., *Tempol therapy attenuates medial smooth muscle cell apoptosis and neointima formation after balloon catheter injury in carotid artery of diabetic rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **289**(3): p. H1047-53.
84. Nishikawa, T., et al., *Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage*. Nature, 2000. **404**(6779): p. 787-90.
85. Matsumoto, S., et al., *Confirmation of superoxide generation via xanthine oxidase in streptozotocin-induced diabetic mice*. Free Radic Res, 2003. **37**(7): p. 767-72.
86. Bravard, A., et al., *Inhibition of xanthine oxidase reduced hyperglycaemia-induced oxidative stress and improved mitochondrial alterations in skeletal muscle of diabetic mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011.
87. Inkster, M.E., Cotter, M.A., and Cameron, N.E., *Treatment with the xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, improves nerve and vascular function in diabetic rats*. Eur J Pharmacol, 2007. **561**(1-3): p. 63-71.
88. Desco, M.C., et al., *Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol*. Diabetes, 2002. **51**(4): p. 1118-24.
89. Kuppusamy, U.R., Indran, M., and Rokiah, P., *Glycaemic control in relation to xanthine oxidase and antioxidant indices in Malaysian Type 2 diabetes patients*. Diabet Med, 2005. **22**(10): p. 1343-6.
90. Anderssohn, M., et al., *Asymmetric dimethylarginine as a mediator of vascular dysfunction and a marker of cardiovascular disease and mortality: an intriguing interaction with diabetes mellitus*. Diab Vasc Dis Res, 2010. **7**(2): p. 105-18.
91. Chen, C.A., et al., *S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function*. Nature, 2010. **468**(7327): p. 1115-8.

92. Griendling, K.K., Sorescu, D., and Ushio-Fukai, M., *NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease*. *Circ Res*, 2000. **86**(5): p. 494-501.
93. Touyz, R.M., et al., *Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II*. *Circ Res*, 2002. **90**(11): p. 1205-13.
94. Lassegue, B. and Griendling, K.K., *NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(4): p. 653-61.
95. Han, W., et al., *Lipid rafts keep NADPH oxidase in the inactive state in human renal proximal tubule cells*. *Hypertension*, 2008. **51**(2): p. 481-7.
96. Lee, S., et al., *A role for NADPH oxidase 4 in the activation of vascular endothelial cells by oxidized phospholipids*. *Free Radic Biol Med*, 2009. **47**(2): p. 145-51.
97. Bedard, K. and Krause, K.H., *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(1): p. 245-313.
98. Quagliari, L., et al., *Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: the distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production*. *Atherosclerosis*, 2005. **183**(2): p. 259-67.
99. Ding, H., Aljofan, M., and Triggle, C.R., *Oxidative stress and increased eNOS and NADPH oxidase expression in mouse microvessel endothelial cells*. *J Cell Physiol*, 2007. **212**(3): p. 682-9.
100. Liu, S., et al., *Glucose down-regulation of cGMP-dependent protein kinase I expression in vascular smooth muscle cells involves NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species*. *Free Radic Biol Med*, 2007. **42**(6): p. 852-63.
101. Tong, X. and Schroder, K., *NADPH oxidases are responsible for the failure of nitric oxide to inhibit migration of smooth muscle cells exposed to high glucose*. *Free Radic Biol Med*, 2009. **47**(11): p. 1578-83.
102. Wendt, M.C., et al., *Differential effects of diabetes on the expression of the gp91phox homologues nox1 and nox4*. *Free Radic Biol Med*, 2005. **39**(3): p. 381-91.
103. Vecchione, C., et al., *Selective Rac-1 inhibition protects from diabetes-induced vascular injury*. *Circ Res*, 2006. **98**(2): p. 218-25.
104. Ebrahimian, T.G., et al., *NADPH oxidase-derived overproduction of reactive oxygen species impairs postischemic neovascularization in mice with type 1 diabetes*. *Am J Pathol*, 2006. **169**(2): p. 719-28.
105. Al-Shabraway, M., et al., *Role of NADPH oxidase in retinal vascular inflammation*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008. **49**(7): p. 3239-44.
106. Hayaishi-Okano, R., et al., *NAD (P) H oxidase p22 phox C242T polymorphism affects LDL particle size and insulin resistance in Japanese subjects*. *J Atheroscler Thromb*, 2002. **9**(4): p. 200-5.

107. Fatehi-Hassanabad, Z., Chan, C.B., and Furman, B.L., *Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes*. Eur J Pharmacol, 2010. **636**(1-3): p. 8-17.
108. Du, X., et al., *Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation*. J Clin Invest, 2006. **116**(4): p. 1071-80.
109. Milstien, S. and Katusic, Z., *Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrite: implications for vascular endothelial function*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **263**(3): p. 681-4.
110. Beckman, J.S. and Koppenol, W.H., *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly*. Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 1): p. C1424-37.
111. Vanhoutte, P.M., *Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis*. Circ J, 2009. **73**(4): p. 595-601.
112. Lamb, D.J., Wilkins, G.M., and Leake, D.S., *The oxidative modification of low density lipoprotein by human lymphocytes*. Atherosclerosis, 1992. **92**(2-3): p. 187-92.
113. Morel, D.W., DiCorleto, P.E., and Chisolm, G.M., *Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation*. Arteriosclerosis, 1984. **4**(4): p. 357-64.
114. Parthasarathy, S., et al., *Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor*. Arteriosclerosis, 1986. **6**(5): p. 505-10.
115. Ujihara, N., et al., *Association between plasma oxidized low-density lipoprotein and diabetic nephropathy*. Diabetes Res Clin Pract, 2002. **58**(2): p. 109-14.
116. Baynes, J.W., Thorpe, S.R., and Murtiashaw, M.H., *Nonenzymatic glucosylation of lysine residues in albumin*. Methods Enzymol, 1984. **106**: p. 88-98.
117. Schalkwijk, C.G. and Miyata, T., *Early- and advanced non-enzymatic glycation in diabetic vascular complications: the search for therapeutics*. Amino Acids, 2010.
118. Cohen, M.P., *Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin*. Arch Biochem Biophys, 2003. **419**(1): p. 25-30.
119. Smith, P.R. and Thornalley, P.J., *Mechanism of the degradation of non-enzymatically glycated proteins under physiological conditions. Studies with the model fructosamine, N epsilon-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)hippuryl-lysine*. Eur J Biochem, 1992. **210**(3): p. 729-39.
120. Kato, M., et al., *Radioimmunoassay for non-enzymatically glycated serum proteins*. Horm Metab Res, 1989. **21**(5): p. 245-8.
121. Shaklai, N., Garlick, R.L., and Bunn, H.F., *Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function*. J Biol Chem, 1984. **259**(6): p. 3812-7.
122. Farmer, D.G. and Kennedy, S., *RAGE, vascular tone and vascular disease*. Pharmacol Ther, 2009. **124**(2): p. 185-94.

123. Curtiss, L.K. and Witztum, J.L., *A novel method for generating region-specific monoclonal antibodies to modified proteins. Application to the identification of human glucosylated low density lipoproteins*. J Clin Invest, 1983. **72**(4): p. 1427-38.
124. Cohen, M.P. and Ziyadeh, F.N., *Amadori glucose adducts modulate mesangial cell growth and collagen gene expression*. Kidney Int, 1994. **45**(2): p. 475-84.
125. Coussons, P.J., et al., *Glucose modification of human serum albumin: a structural study*. Free Radic Biol Med, 1997. **22**(7): p. 1217-27.
126. Wu, V.Y., Shearman, C.W., and Cohen, M.P., *Identification of calnexin as a binding protein for Amadori-modified glycosylated albumin*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **284**(3): p. 602-6.
127. Krantz, S., et al., *Purification and partial amino acid sequencing of a fructosyllysine-specific binding protein from cell membranes of the monocyte-like cell line U937*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1266**(1): p. 109-12.
128. Brandt, R., et al., *Nucleophosmin is a component of the fructosyllysine-specific receptor in cell membranes of Mono Mac 6 and U937 monocyte-like cells*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1670**(2): p. 132-6.
129. Schmidt, A.M., et al., *Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis*. Circ Res, 1999. **84**(5): p. 489-97.
130. Hattori, Y., et al., *Vascular smooth muscle cell activation by glycosylated albumin (Amadori adducts)*. Hypertension, 2002. **39**(1): p. 22-8.
131. Zhang, M., et al., *Glycosylated proteins stimulate reactive oxygen species production in cardiac myocytes: involvement of Nox2 (gp91phox)-containing NADPH oxidase*. Circulation, 2006. **113**(9): p. 1235-43.
132. Jaleel, A., et al., *Identification of Amadori-modified plasma proteins in type 2 diabetes and the effect of short-term intensive insulin treatment*. Diabetes Care, 2005. **28**(3): p. 645-52.
133. Schalkwijk, C.G., et al., *Amadori albumin in type 1 diabetic patients: correlation with markers of endothelial function, association with diabetic nephropathy, and localization in retinal capillaries*. Diabetes, 1999. **48**(12): p. 2446-53.
134. Schalkwijk, C.G., et al., *Pathophysiological role of Amadori-glycosylated proteins in diabetic microangiopathy*. Semin Vasc Med, 2002. **2**(2): p. 191-7.
135. Chaturvedi, N., et al., *Circulating and urinary transforming growth factor beta1, Amadori albumin, and complications of type 1 diabetes: the EURODIAB prospective complications study*. Diabetes Care, 2002. **25**(12): p. 2320-7.
136. Sakai, H., et al., *Localization of glycosylated proteins in the glomeruli of patients with diabetic nephropathy*. Nephrol Dial Transplant, 1996. **11 Suppl 5**: p. 66-71.

137. Miller, K. and Michael, A.F., *Immunopathology of renal extracellular membranes in diabetes mellitus. Specificity of tubular basement-membrane immunofluorescence*. Diabetes, 1976. **25**(8): p. 701-8.
138. Michael, A.F. and Brown, D.M., *Increased concentration of albumin in kidney basement membranes in diabetes mellitus*. Diabetes, 1981. **30**(10): p. 843-6.
139. Kelly, S.B., et al., *A method for localizing the early products of nonenzymatic glycosylation in fixed tissue*. J Invest Dermatol, 1989. **93**(3): p. 327-31.
140. Kennedy, L., et al., *Anti-glycation and anti-albuminuric effects of GLY-230 in human diabetes*. Am J Nephrol, 2010. **31**(2): p. 110-6.
141. Cohen, M.P., Ziyadeh, F.N., and Chen, S., *Amadori-modified glycated serum proteins and accelerated atherosclerosis in diabetes: pathogenic and therapeutic implications*. J Lab Clin Med, 2006. **147**(5): p. 211-9.
142. Cohen, M.P., Hud, E., and Wu, V.Y., *Amelioration of diabetic nephropathy by treatment with monoclonal antibodies against glycated albumin*. Kidney Int, 1994. **45**(6): p. 1673-9.
143. Clements, R.S., Jr., Robison, W.G., Jr., and Cohen, M.P., *Anti-glycated albumin therapy ameliorates early retinal microvascular pathology in db/db mice*. J Diabetes Complications, 1998. **12**(1): p. 28-33.
144. Cohen, M.P., et al., *Inhibiting albumin glycation ameliorates diabetic nephropathy in the db/db mouse*. Exp Nephrol, 2000. **8**(3): p. 135-43.
145. Cohen, M.P., et al., *Inhibiting albumin glycation attenuates dysregulation of VEGFR-1 and collagen IV subchain production and the development of renal insufficiency*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(2): p. F789-95.
146. Cohen, M.P., et al., *Amelioration of diabetes-associated abnormalities in the vitreous fluid by an inhibitor of albumin glycation*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(11): p. 5089-93.
147. Cohen, M.P., et al., *Inhibiting albumin glycation in vivo ameliorates glomerular overexpression of TGF-beta1*. Kidney Int, 2002. **61**(6): p. 2025-32.
148. Cohen, M.P., et al., *Evidence linking glycated albumin to altered glomerular nephrin and VEGF expression, proteinuria, and diabetic nephropathy*. Kidney Int, 2005. **68**(4): p. 1554-61.
149. Cohen, M.P., et al., *Glycated albumin promotes a generalized vasculopathy in the db/db mouse*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **218**(1): p. 72-5.
150. Sabbatini, M., et al., *Early glycosylation products induce glomerular hyperfiltration in normal rats*. Kidney Int, 1992. **42**(4): p. 875-81.
151. McVerry, B.A., et al., *Production of pseudodiabetic renal glomerular changes in mice after repeated injections of glucosylated proteins*. Lancet, 1980. **1**(8171): p. 738-40.
152. Cohen, M.P., et al., *Glycated albumin increases oxidative stress, activates NF-kappa B and extracellular signal-regulated kinase (ERK), and stimulates ERK-dependent transforming growth factor-beta 1*

- production in macrophage RAW cells. *J Lab Clin Med*, 2003. **141**(4): p. 242-9.
153. Salazar, R., Brandt, R., and Krantz, S., *Binding of Amadori glucose-modified albumin by the monocytic cell line MonoMac 6 activates protein kinase C epsilon protein tyrosine kinases and the transcription factors AP-1 and NF-kappaB*. *Glycoconj J*, 2001. **18**(10): p. 769-77.
154. Mandl-Weber, S., et al., *Early glycosylated albumin, but not advanced glycosylated albumin, methylglyoxal, or 3-deoxyglucosone increases the expression of PAI-1 in human peritoneal mesothelial cells*. *Perit Dial Int*, 2001. **21**(5): p. 487-94.
155. Mandl-Weber, S., et al., *Vascular endothelial growth factor production and regulation in human peritoneal mesothelial cells*. *Kidney Int*, 2002. **61**(2): p. 570-8.
156. Wu, V.Y. and Cohen, M.P., *Identification of aortic endothelial cell binding proteins for Amadori adducts in glycosylated albumin*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993. **193**(3): p. 1131-6.
157. Wu, V.Y. and Cohen, M.P., *Receptors specific for Amadori-modified glycosylated albumin on murine endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **198**(2): p. 734-9.
158. Amore, A., et al., *Nonenzymatically glycosylated albumin (Amadori adducts) enhances nitric oxide synthase activity and gene expression in endothelial cells*. *Kidney Int*, 1997. **51**(1): p. 27-35.
159. Amore, A., et al., *Amadori-configured albumin induces nitric oxide-dependent apoptosis of endothelial cells: a possible mechanism of diabetic vasculopathy*. *Nephrol Dial Transplant*, 2004. **19**(1): p. 53-60.
160. Bian, Z.M., et al., *Glycosylated human serum albumin induces IL-8 and MCP-1 gene expression in human corneal keratocytes*. *Curr Eye Res*, 1998. **17**(1): p. 65-72.
161. Cohen, M.P., et al., *Glycosylated albumin modified by Amadori adducts modulates aortic endothelial cell biology*. *Mol Cell Biochem*, 1995. **143**(1): p. 73-9.
162. Chen, S., Jim, B., and Ziyadeh, F.N., *Diabetic nephropathy and transforming growth factor-beta: transforming our view of glomerulosclerosis and fibrosis build-up*. *Semin Nephrol*, 2003. **23**(6): p. 532-43.
163. Ichiki, T., et al., *Expression of monocyte chemoattractant protein-1 by nonenzymatically glycosylated albumin (Amadori adducts) in vascular smooth muscle cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **269**(3): p. 666-70.
164. Hattori, Y., et al., *Glycosylated serum albumin-induced nitric oxide production in vascular smooth muscle cells by nuclear factor kappaB-dependent transcriptional activation of inducible nitric oxide synthase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **259**(1): p. 128-32.
165. Hattori, Y., et al., *Glycosylated serum albumin-induced vascular smooth muscle cell proliferation through activation of the mitogen-activated*

- protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by protein kinase C*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **281**(4): p. 891-6.
166. Kim, J., et al., *The effect of antioxidants on glycated albumin-induced cytotoxicity in bovine retinal pericytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **292**(4): p. 1010-6.
167. Singh, N.R., et al., *Identification of preferential protein targets for carbonylation in human mature adipocytes treated with native or glycated albumin*. Free Radic Res, 2007. **41**(10): p. 1078-88.
168. Lee, B.W., et al., *Amadori-glycated albumin-induced vascular smooth muscle cell proliferation and expression of inhibitor of apoptosis protein-1 and nerve growth factor-gamma*. Biofactors, 2007. **31**(3-4): p. 145-53.
169. Yoo, C.W., et al., *Glycated albumin induces superoxide generation in mesangial cells*. Cell Physiol Biochem, 2004. **14**(4-6): p. 361-8.
170. Higai, K., Shimamura, A., and Matsumoto, K., *Amadori-modified glycated albumin predominantly induces E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells through NADPH oxidase activation*. Clin Chim Acta, 2006. **367**(1-2): p. 137-43.
171. Nojima, H., et al., *Effect of aerobic exercise training on oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus*. Metabolism, 2008. **57**(2): p. 170-6.
172. Anrather, J., Racchumi, G., and Iadecola, C., *NF-kappaB regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox*. J Biol Chem, 2006. **281**(9): p. 5657-67.
173. Nevado, J., et al., *Amadori adducts activate nuclear factor-kappaB-related proinflammatory genes in cultured human peritoneal mesothelial cells*. Br J Pharmacol, 2005. **146**(2): p. 268-79.
174. Manea, A., et al., *Regulation of NADPH oxidase subunit p22(phox) by NF-kB in human aortic smooth muscle cells*. Arch Physiol Biochem, 2007. **113**(4-5): p. 163-72.
175. Manea, A., et al., *AP-1-dependent transcriptional regulation of NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells: role of p22phox subunit*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(5): p. 878-85.
176. Gauss, K.A., Bunger, P.L., and Quinn, M.T., *AP-1 is essential for p67(phox) promoter activity*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(1): p. 163-72.
177. Pedruzzi, E., et al., *NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(24): p. 10703-17.
178. Okumura, A., et al., *Glycated albumin induces activation of activator protein-1 in retinal glial cells*. Jpn J Ophthalmol, 2007. **51**(3): p. 236-7.
179. Choi, K.H., et al., *Cellular factors involved in CXCL8 expression induced by glycated serum albumin in vascular smooth muscle cells*. Atherosclerosis, 2010. **209**(1): p. 58-65.
180. Park, S., et al., *Sustained expression of NADPH oxidase 4 by p38 MAPK-Akt signaling potentiates radiation-induced differentiation of lung fibroblasts*. J Mol Med, 2010. **88**(8): p. 807-16.

181. Hunt, J.V., Dean, R.T., and Wolff, S.P., *Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing*. *Biochem J*, 1988. **256**(1): p. 205-12.
182. Van Buul, J.D., et al., *Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells*. *Antioxid Redox Signal*, 2005. **7**(3-4): p. 308-17.
183. Peshavariya, H., et al., *NADPH oxidase isoform selective regulation of endothelial cell proliferation and survival*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2009. **380**(2): p. 193-204.
184. Baudin, B., et al., *A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(3): p. 481-5.
185. Ruggeri, Z.M. and Ware, J., *von Willebrand factor*. *FASEB J*, 1993. **7**(2): p. 308-16.
186. DeYoung, B.R., et al., *CD31 immunoreactivity in mesenchymal neoplasms of the skin and subcutis: report of 145 cases and review of putative immunohistologic markers of endothelial differentiation*. *J Cutan Pathol*, 1995. **22**(3): p. 215-22.
187. Noveral, J.P., Mueller, S.N., and Levine, E.M., *Release of angiotensin I-converting enzyme by endothelial cells in vitro*. *J Cell Physiol*, 1987. **131**(1): p. 1-5.
188. Dimmeler, S. and Zeiher, A.M., *Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression*. *Circ Res*, 2000. **87**(6): p. 434-9.
189. Brandes, R.P. and Schroder, K., *Composition and functions of vascular nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases*. *Trends Cardiovasc Med*, 2008. **18**(1): p. 15-9.
190. Sorescu, G.P., et al., *Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen species production from a nox1-based NADPH oxidase*. *Circ Res*, 2004. **95**(8): p. 773-9.
191. Wang, S. and Hirschberg, R., *Diabetes-relevant regulation of cultured blood outgrowth endothelial cells*. *Microvasc Res*, 2009. **78**(2): p. 174-9.
192. Day, J.F., et al., *Nonenzymatic glycosylation of rat albumin. Studies in vitro and in vivo*. *J Biol Chem*, 1979. **254**(19): p. 9394-400.
193. Thornalley, P.J., Langborg, A., and Minhas, H.S., *Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose*. *Biochem J*, 1999. **344 Pt 1**: p. 109-16.
194. Roohk, H.V. and Zaidi, A.R., *A review of glycated albumin as an intermediate glycation index for controlling diabetes*. *J Diabetes Sci Technol*, 2008. **2**(6): p. 1114-21.
195. Roche, M., et al., *The antioxidant properties of serum albumin*. *FEBS Lett*, 2008. **582**(13): p. 1783-7.
196. Faure, P., et al., *Albumin antioxidant capacity is modified by methylglyoxal*. *Diabetes Metab*, 2005. **31**(2): p. 169-77.

197. Faure, P., et al., *Impairment of the antioxidant properties of serum albumin in patients with diabetes: protective effects of metformin*. Clin Sci (Lond), 2008. **114**(3): p. 251-6.
198. Miele, C., et al., *Human glycated albumin affects glucose metabolism in L6 skeletal muscle cells by impairing insulin-induced insulin receptor substrate (IRS) signaling through a protein kinase C alpha-mediated mechanism*. J Biol Chem, 2003. **278**(48): p. 47376-87.
199. Gersten, R.A., et al., *Maillard reaction of ribose 5-phosphate generates superoxide and glycation products for bovine heart cytochrome c reduction*. Carbohydr Res, 2010. **345**(17): p. 2499-506.
200. Vejrazka, M., Micek, R., and Stipek, S., *Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1722**(2): p. 143-7.
201. Johnson, D.K., et al., *Inhibition of NADPH oxidase activation in endothelial cells by ortho-methoxy-substituted catechols*. Endothelium, 2002. **9**(3): p. 191-203.
202. Mikkelsen, R.B. and Wardman, P., *Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms*. Oncogene, 2003. **22**(37): p. 5734-54.
203. Forkink, M., et al., *Detection and manipulation of mitochondrial reactive oxygen species in mammalian cells*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1797**(6-7): p. 1034-44.
204. Bienert, G.P., et al., *Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes*. J Biol Chem, 2007. **282**(2): p. 1183-92.
205. Stone, J.R. and Yang, S., *Hydrogen peroxide: a signaling messenger*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(3-4): p. 243-70.
206. Madesh, M. and Hajnoczky, G., *VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release*. J Cell Biol, 2001. **155**(6): p. 1003-15.
207. Devadas, S., et al., *Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression*. J Exp Med, 2002. **195**(1): p. 59-70.
208. Madesh, M., et al., *Selective role for superoxide in InsP3 receptor-mediated mitochondrial dysfunction and endothelial apoptosis*. J Cell Biol, 2005. **170**(7): p. 1079-90.
209. D'Autreaux, B. and Toledano, M.B., *ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 813-24.
210. Lynch, R.E. and Fridovich, I., *Effects of superoxide on the erythrocyte membrane*. J Biol Chem, 1978. **253**(6): p. 1838-45.
211. Hawkins, B.J., et al., *Superoxide flux in endothelial cells via the chloride channel-3 mediates intracellular signaling*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(6): p. 2002-12.

212. Lambeth, J.D., et al., *Novel homologs of gp91phox*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(10): p. 459-61.
213. Lassegue, B., et al., *Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways*. Circ Res, 2001. **88**(9): p. 888-94.
214. Sorescu, D., et al., *Electron spin resonance characterization of the NAD(P)H oxidase in vascular smooth muscle cells*. Free Radic Biol Med, 2001. **30**(6): p. 603-12.
215. Shiose, A., et al., *A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1417-23.
216. Somers, M.J., Burchfield, J.S., and Harrison, D.G., *Evidence for a NADH/NADPH oxidase in human umbilical vein endothelial cells using electron spin resonance*. Antioxid Redox Signal, 2000. **2**(4): p. 779-87.
217. Safer, B., Smith, C.M., and Williamson, J.R., *Control of the transport of reducing equivalents across the mitochondrial membrane in perfused rat heart*. J Mol Cell Cardiol, 1971. **2**(2): p. 111-24.
218. Schafer, F.Q. and Buettner, G.R., *Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple*. Free Radic Biol Med, 2001. **30**(11): p. 1191-212.
219. Li, J.M. and Shah, A.M., *Differential NADPH- versus NADH-dependent superoxide production by phagocyte-type endothelial cell NADPH oxidase*. Cardiovasc Res, 2001. **52**(3): p. 477-86.
220. Ago, T., et al., *Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase*. Circulation, 2004. **109**(2): p. 227-33.
221. Alvarez, E., et al., *Pravastatin counteracts angiotensin II-induced up-regulation and activation of NADPH oxidase at plasma membrane of human endothelial cells*. J Cardiovasc Pharmacol, 2010. **55**(2): p. 203-12.
222. Jones, S.A., et al., *Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells*. Am J Physiol, 1996. **271**(4 Pt 2): p. H1626-34.
223. Ushio-Fukai, M., et al., *p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(38): p. 23317-21.
224. Serrander, L., et al., *NOX4 activity is determined by mRNA levels and reveals a unique pattern of ROS generation*. Biochem J, 2007. **406**(1): p. 105-14.
225. Martyn, K.D., et al., *Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases*. Cell Signal, 2006. **18**(1): p. 69-82.
226. Gorin, Y., et al., *Nox4 mediates angiotensin II-induced activation of Akt/protein kinase B in mesangial cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **285**(2): p. F219-29.

227. Ambasta, R.K., et al., *Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase*. J Biol Chem, 2004. **279**(44): p. 45935-41.
228. Lyle, A.N., et al., *Poldip2, a novel regulator of Nox4 and cytoskeletal integrity in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 2009. **105**(3): p. 249-59.
229. Rossary, A., Arab, K., and Steghens, J.P., *Polyunsaturated fatty acids modulate NOX 4 anion superoxide production in human fibroblasts*. Biochem J, 2007. **406**(1): p. 77-83.
230. Mahadev, K., et al., *The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(5): p. 1844-54.
231. Park, H.S., et al., *Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B*. J Immunol, 2004. **173**(6): p. 3589-93.
232. Treins, C., et al., *Regulation of vascular endothelial growth factor expression by advanced glycation end products*. J Biol Chem, 2001. **276**(47): p. 43836-41.
233. Bian, Z.M., et al., *Signaling pathways for glycated human serum albumin-induced IL-8 and MCP-1 secretion in human RPE cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(7): p. 1660-8.
234. Brandt, R. and Krantz, S., *Glycated albumin (Amadori product) induces activation of MAP kinases in monocyte-like MonoMac 6 cells*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1760**(11): p. 1749-53.
235. Cohen, M.P., Shea, E., and Shearman, C.W., *ERK mediates effects of glycated albumin in mesangial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **283**(3): p. 641-3.
236. Ibrahim, A.S., et al., *Genistein attenuates retinal inflammation associated with diabetes by targeting of microglial activation*. Mol Vis, 2010. **16**: p. 2033-42.
237. Mollnau, H., et al., *Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling*. Circ Res, 2002. **90**(4): p. E58-65.
238. Xu, H., et al., *Differential roles of PKCalpha and PKCepsilon in controlling the gene expression of Nox4 in human endothelial cells*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(8): p. 1656-67.
239. Cohen, M.P., et al., *Glycated albumin stimulation of PKC-beta activity is linked to increased collagen IV in mesangial cells*. Am J Physiol, 1999. **276**(5 Pt 2): p. F684-90.
240. Chen, S., et al., *Glycated albumin stimulates TGF-beta 1 production and protein kinase C activity in glomerular endothelial cells*. Kidney Int, 2001. **59**(2): p. 673-81.
241. Manea, A., et al., *Transcriptional regulation of NADPH oxidase isoforms, Nox1 and Nox4, by nuclear factor-kappaB in human aortic*

- smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(4): p. 901-7.
242. Stielow, C., et al., *AP-1-Mediated Downregulation of Nox4 Promoter Activity by Laminar Shear Stress in Human Endothelial Cells*. 2006, Circulation. p. 119.
243. Touyz, R.M., et al., *Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells*. J Hypertens, 2004. **22**(6): p. 1141-9.
244. Rao, G.N., et al., *Hydrogen peroxide stimulates transcription of c-jun in vascular smooth muscle cells: role of arachidonic acid*. Oncogene, 1993. **8**(10): p. 2759-64.
245. Rao, G.N., et al., *Hydrogen peroxide-induced c-fos expression is mediated by arachidonic acid release: role of protein kinase C*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(5): p. 1259-63.
246. Vendrov, A.E., et al., *NADPH oxidases regulate CD44 and hyaluronic acid expression in thrombin-treated vascular smooth muscle cells and in atherosclerosis*. J Biol Chem. **285**(34): p. 26545-57.
247. Ryu, J., et al., *FcγRIIIa mediates C-reactive protein-induced inflammatory responses of human vascular smooth muscle cells by activating NADPH oxidase 4*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(3): p. 555-65.
248. Patel, D.N., et al., *TLR4-NOX4-AP-1 signaling mediates lipopolysaccharide-induced CXCR6 expression in human aortic smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **347**(4): p. 1113-20.
249. Furst, R., et al., *Atrial natriuretic peptide induces mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in human endothelial cells via Rac1 and NAD(P)H oxidase/Nox2-activation*. Circ Res, 2005. **96**(1): p. 43-53.
250. Chen, J., et al., *Glycated collagen I induces premature senescence-like phenotypic changes in endothelial cells*. Circ Res, 2002. **90**(12): p. 1290-8.
251. Marsden, P.A., et al., *Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene*. J Biol Chem, 1993. **268**(23): p. 17478-88.
252. Kumar, S., Wedgwood, S., and Black, S.M., *Nordihydroguaiaretic acid increases endothelial nitric oxide synthase expression via the transcription factor AP-1*. DNA Cell Biol, 2007. **26**(12): p. 853-62.
253. Kumar, S., et al., *Hydrogen peroxide decreases endothelial nitric oxide synthase promoter activity through the inhibition of AP-1 activity*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **295**(2): p. L370-7.
254. Srinivasan, S., et al., *Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells*. Diabetologia, 2004. **47**(10): p. 1727-34.
255. Laursen, J.B., et al., *Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin*. Circulation, 2001. **103**(9): p. 1282-8.

256. Pritchard, K.A., Jr., et al., *Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion*. *Circ Res*, 1995. **77**(3): p. 510-8.
257. Cosentino, F. and Luscher, T.F., *Tetrahydrobiopterin and endothelial function*. *Eur Heart J*, 1998. **19 Suppl G**: p. G3-8.
258. Kerr, S., et al., *Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium*. *Hypertension*, 1999. **33**(6): p. 1353-8.
259. Landmesser, U., et al., *Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(8): p. 1201-9.
260. Hink, U., et al., *Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus*. *Circ Res*, 2001. **88**(2): p. E14-22.
261. Heitzer, T., et al., *Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers : evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase*. *Circ Res*, 2000. **86**(2): p. E36-41.
262. Stroes, E., et al., *Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(1): p. 41-6.
263. Higashi, Y., et al., *Tetrahydrobiopterin enhances forearm vascular response to acetylcholine in both normotensive and hypertensive individuals*. *Am J Hypertens*, 2002. **15**(4 Pt 1): p. 326-32.
264. Rosenkranz-Weiss, P., et al., *Regulation of nitric oxide synthesis by proinflammatory cytokines in human umbilical vein endothelial cells. Elevations in tetrahydrobiopterin levels enhance endothelial nitric oxide synthase specific activity*. *J Clin Invest*, 1994. **93**(5): p. 2236-43.
265. Kuzkaya, N., et al., *Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(25): p. 22546-54.
266. Werner, E.R., et al., *Tetrahydrobiopterin and nitric oxide: mechanistic and pharmacological aspects*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003. **228**(11): p. 1291-302.
267. Lai, Y.L., et al., *Inhibition of L-arginine metabolizing enzymes by L-arginine-derived advanced glycation end products*. *J Clin Biochem Nutr*, 2010. **46**(2): p. 177-85.
268. Bivalacqua, T.J., et al., *Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **283**(4): p. 923-7.
269. Bachetti, T., et al., *Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions*. *J Mol Cell Cardiol*, 2004. **37**(2): p. 515-23.
270. Ming, X.F., et al., *Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction*. *Circulation*, 2004. **110**(24): p. 3708-14.
271. Yin, Q.F., et al., *Dimethylarginine dimethylaminohydrolase inhibition and asymmetric dimethylarginine accumulation contribute to endothelial*

- dysfunction in rats exposed to glycosylated protein: effects of aminoguanidine. *Atherosclerosis*, 2007. **190**(1): p. 53-61.
272. Lu, C.W., Xiong, Y., and He, P., *Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-2 overexpression improves impaired nitric oxide synthesis of endothelial cells induced by glycated protein*. *Nitric Oxide*, 2007. **16**(1): p. 94-103.
273. Lin, K.Y., et al., *Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase*. *Circulation*, 2002. **106**(8): p. 987-92.
274. Boger, R.H., et al., *LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases*. *Circ Res*, 2000. **87**(2): p. 99-105.
275. Sydow, K., et al., *ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins*. *Cardiovasc Res*, 2003. **57**(1): p. 244-52.
276. Cardounel, A.J., et al., *Evidence for the pathophysiological role of endogenous methylarginines in regulation of endothelial NO production and vascular function*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(2): p. 879-87.
277. Druhan, L.J., et al., *Regulation of eNOS-derived superoxide by endogenous methylarginines*. *Biochemistry*, 2008. **47**(27): p. 7256-63.
278. Ribau, J.C., et al., *Endothelial adhesion molecule expression is enhanced in the aorta and internal mammary artery of diabetic patients*. *J Surg Res*, 1999. **85**(2): p. 225-33.
279. Jin, C., et al., *Association of serum glycated albumin, C-reactive protein and ICAM-1 levels with diffuse coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Clin Chim Acta*, 2009. **408**(1-2): p. 45-9.
280. Pu, L.J., et al., *Increased serum glycated albumin level is associated with the presence and severity of coronary artery disease in type 2 diabetic patients*. *Circ J*, 2007. **71**(7): p. 1067-73.
281. Alique, M., et al., *All-trans retinoic acid and glycated albumin reciprocally influence their effects in human mesangial cells*. *Int J Vitam Nutr Res*, 2005. **75**(1): p. 47-53.
282. Desfaits, A.C., Serri, O., and Renier, G., *Gliclazide reduces the induction of human monocyte adhesion to endothelial cells by glycated albumin*. *Diabetes Obes Metab*, 1999. **1**(2): p. 113-20.
283. Banba, N., et al., *Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy*. *Kidney Int*, 2000. **58**(2): p. 684-90.
284. Bian, Z.M., et al., *Glycated serum albumin induces chemokine gene expression in human retinal pigment epithelial cells*. *J Leukoc Biol*, 1996. **60**(3): p. 405-14.
285. Bian, Z.M., et al., *Synergy between glycated human serum albumin and tumor necrosis factor-alpha for interleukin-8 gene expression and protein secretion in human retinal pigment epithelial cells*. *Lab Invest*, 1998. **78**(3): p. 335-44.

286. Harada, C., et al., *Role of monocyte chemotactic protein-1 and nuclear factor kappa B in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy*. Diabetes Res Clin Pract, 2006. **74**(3): p. 249-56.
287. Choi, E.K., et al., *LY294002 inhibits monocyte chemoattractant protein-1 expression through a phosphatidylinositol 3-kinase-independent mechanism*. FEBS Lett, 2004. **559**(1-3): p. 141-4.
288. Liu, S.W., et al., *Visfatin stimulates production of monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-6 in human vein umbilical endothelial cells*. Horm Metab Res, 2009. **41**(4): p. 281-6.
289. Goebeler, M., et al., *The MKK6/p38 stress kinase cascade is critical for tumor necrosis factor-alpha-induced expression of monocyte-chemoattractant protein-1 in endothelial cells*. Blood, 1999. **93**(3): p. 857-65.
290. Ni, C.W., et al., *Activation of PKC-epsilon and ERK1/2 participates in shear-induced endothelial MCP-1 expression that is repressed by nitric oxide*. J Cell Physiol, 2003. **195**(3): p. 428-34.
291. Tumor, Z., et al., *Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NF-kappaB activation*. Am J Nephrol, 2010. **31**(5): p. 435-41.
292. Chen, B., et al., *Thioredoxin 1 downregulates MCP-1 secretion and expression in human endothelial cells by suppressing nuclear translocation of activator protein 1 and redox factor-1*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **298**(5): p. C1170-9.
293. Ueda, A., et al., *Transcriptional regulation of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. Cooperation of two NF-kappaB sites and NF-kappaB/Rel subunit specificity*. J Biol Chem, 1997. **272**(49): p. 31092-9.
294. Wang, Y., et al., *Lipopolysaccharide-induced MCP-1 gene expression in rat tubular epithelial cells is nuclear factor-kappaB dependent*. Kidney Int, 2000. **57**(5): p. 2011-22.
295. Ma, L., et al., *Grape seed proanthocyanidin extracts inhibit vascular cell adhesion molecule expression induced by advanced glycation end products through activation of peroxisome proliferators-activated receptor gamma*. J Cardiovasc Pharmacol, 2007. **49**(5): p. 293-8.
296. Dandapat, A., et al., *Small concentrations of oxLDL induce capillary tube formation from endothelial cells via LOX-1-dependent redox-sensitive pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(11): p. 2435-42.
297. Panicker, S.R. and Kartha, C.C., *Curcumin attenuates glucose-induced monocyte chemoattractant protein-1 synthesis in aortic endothelial cells by modulating the nuclear factor-kappaB pathway*. Pharmacology, 2010. **85**(1): p. 18-26.
298. Panicker, S.R., et al., *Quercetin attenuates Monocyte Chemoattractant Protein-1 gene expression in glucose primed aortic endothelial cells through NF-kappaB and AP-1*. Pharmacol Res, 2010. **62**(4): p. 328-36.

299. Moller, D.E. and Kaufman, K.D., *Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective*. Annu Rev Med, 2005. **56**: p. 45-62.
300. Tesauro, M., et al., *Vascular, metabolic, and inflammatory abnormalities in normoglycemic offspring of patients with type 2 diabetes mellitus*. Metabolism, 2007. **56**(3): p. 413-9.
301. Meigs, J.B., et al., *Hemostatic markers of endothelial dysfunction and risk of incident type 2 diabetes: the Framingham Offspring Study*. Diabetes, 2006. **55**(2): p. 530-7.
302. Rossi, R., et al., *Endothelial-dependent vasodilation and incidence of type 2 diabetes in a population of healthy postmenopausal women*. Diabetes Care, 2005. **28**(3): p. 702-7.
303. Monti, L.D., et al., *Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome*. Diabetes, 2003. **52**(5): p. 1270-5.
304. Tiedge, M., et al., *Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells*. Diabetes, 1997. **46**(11): p. 1733-42.
305. Robertson, R.P., et al., *Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection*. Diabetes, 2003. **52**(3): p. 581-7.
306. Kaneto, H., et al., *Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis*. Mediators Inflamm, 2009. **2010**: p. 453892.
307. Kaneto, H., et al., *Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity*. Diabetes, 1999. **48**(12): p. 2398-406.
308. Gorogawa, S., et al., *Probucol preserves pancreatic beta-cell function through reduction of oxidative stress in type 2 diabetes*. Diabetes Res Clin Pract, 2002. **57**(1): p. 1-10.
309. Ihara, Y., et al., *Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes*. Diabetes, 1999. **48**(4): p. 927-32.
310. Tanaka, Y., et al., *Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(19): p. 10857-62.
311. Takatori, A., et al., *Amelioration of the beta-cell dysfunction in diabetic APA hamsters by antioxidants and AGE inhibitor treatments*. Diabetes Metab Res Rev, 2004. **20**(3): p. 211-8.
312. Shiraki, T., et al., *Glycated albumin suppresses glucose-induced insulin secretion by impairing glucose metabolism in rat pancreatic beta-cells*. Nutr Metab (Lond). **8**(1): p. 20.
313. Rudich, A., et al., *Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes*. Diabetes, 1998. **47**(10): p. 1562-9.
314. Tirosh, A., et al., *Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-*

- kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J Biol Chem*, 1999. **274**(15): p. 10595-602.
315. Haber, C.A., et al., *N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. **285**(4): p. E744-53.
316. Jacob, S., et al., *Oral administration of RAC-alpha-lipoic acid modulates insulin sensitivity in patients with type-2 diabetes mellitus: a placebo-controlled pilot trial*. *Free Radic Biol Med*, 1999. **27**(3-4): p. 309-14.
317. Konrad, T., et al., *alpha-Lipoic acid treatment decreases serum lactate and pyruvate concentrations and improves glucose effectiveness in lean and obese patients with type 2 diabetes*. *Diabetes Care*, 1999. **22**(2): p. 280-7.
318. Nagel, T., et al., *Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(8): p. 1825-34.
319. Chiu, J.J., et al., *Analysis of the effect of disturbed flow on monocytic adhesion to endothelial cells*. *J Biomech*, 2003. **36**(12): p. 1883-95.
320. Dunzendorfer, S., Lee, H.K., and Tobias, P.S., *Flow-dependent regulation of endothelial Toll-like receptor 2 expression through inhibition of SP1 activity*. *Circ Res*, 2004. **95**(7): p. 684-91.
321. Boon, R.A. and Horrevoets, A.J., *Key transcriptional regulators of the vasoprotective effects of shear stress*. *Hamostaseologie*, 2009. **29**(1): p. 39-40, 41-3.
322. Chen, X.L., et al., *Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(2): p. 703-11.
323. Dai, G., et al., *Biomechanical forces in atherosclerosis-resistant vascular regions regulate endothelial redox balance via phosphoinositol 3-kinase/Akt-dependent activation of Nrf2*. *Circ Res*, 2007. **101**(7): p. 723-33.
324. Dekker, R.J., et al., *Endothelial KLF2 links local arterial shear stress levels to the expression of vascular tone-regulating genes*. *Am J Pathol*, 2005. **167**(2): p. 609-18.
325. Kensler, T.W., Wakabayashi, N., and Biswal, S., *Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007. **47**: p. 89-116.