



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

EXPRESIÓN Y RELEVANCIA FUNCIONAL DE NADPH OXIDASA 5
EN CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS HUMANAS

Aitor Andueza Lizarraga



Universidad de Navarra

Facultad de Ciencias

EXPRESIÓN Y RELEVANCIA FUNCIONAL DE NADPH OXIDASA 5 EN CÉLULAS
ESTELARES HEPÁTICAS HUMANAS

**Memoria presentada por D. Aitor Andueza Lizarraga para aspirar al grado de
Doctor por la Universidad de Navarra**

El presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Genética y autorizo su presentación ante el Tribunal que lo ha de juzgar.

Pamplona, 3 de septiembre de 2018

Dr. Juan José Martínez Irujo

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda de una beca concedida por la Asociación de Amigos de la Universidad de Navarra y la Obra Social "la Caixa". Además, ha sido financiado por el Plan de Investigación de la Universidad de Navarra y el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (SAF 2016-79151-R).

Gurasoei
Arrebari
Joni

Itzarari

ESKER ONAK - AGRADECIMIENTOS

En este apartado me gustaría agradecer, de todo corazón, a las personas que han estado junto a mí animándome, apoyándome, asesorándome o guiándome. A todos ellos muchas gracias.

Lehendabizi, eskerrik asko amatxo niregatik egindako guztiagatik, bai etxean, bai eskolan, bai institutuan eta bai unibertsitatean. Zu ere lan onen parte zara. Mila esker aitatzu eredu, sostengu eta momentu on eta txarretan nire ondoan egoteagatik. Esker mila Amaia, arreba kuttuna, munduko pertsonarik eskuzabal eta esker onekoa izateagatik. Beti edukiko nauzu zure ondoan. Eskerrik asko Jon zaren bezala izateagatik eta baita nire arreba zaindu eta maitatzeagatik. Azkenik, eskerrik beroena eta goxoena Itzarari, nire emazte, nire maitale, nire aholkulari, nire psikologo eta nire eustarririk onena izateagatik. Duela hamar urte ezagutu eta nirekin bizi osoan ondoan izan nahi dudana. Mila milioika esker guztioi bene-benetan. Maite zaituztet.

Me gustaría agradecer a la Universidad de Navarra, y en particular al departamento de Bioquímica y Genética, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo y por la formación tanto personal como profesional. Además, quiero agradecer a la Asociación de amigos y a la fundación “la Caixa” por su apoyo en la financiación de este proyecto y de mi contrato.

A mi director de tesis, Juan José Martínez Irujo, un gran sabio, un excelente científico y aún mejor persona. Han sido siete años donde hemos vivido momentos muy buenos, pero también momentos de nervios y estrés. Pero como dices tú: “De todo se sale”. Por ello, gracias, gracias y mil veces gracias.

A Naiara Garde, por tu perseverancia, por tu dedicación y por tu mérito en el diseño y obtención del plásmido de Nox5 ϵ . Tu trabajo fue esencial para el desarrollo de este trabajo, así que el mayor de mis agradecimientos.

A Álvaro Pejenaute por generar y prestar el adenovirus de Nox5 β mediante el cual he podido poner a punto muchas de las técnicas de actividad y SDS/PAGE-Western-blot realizadas durante la tesis. Muchas gracias.

A Guillermo Zalba, muchas gracias por proporcionarme todas las herramientas que disponías con toda tu generosidad, pero, sobre todo, gracias por asesorarme y ayudarme a buscar un nuevo futuro.

A Eduardo Ansorena y a María Iraburu, mi mayor agradecimiento por vuestros consejos y por correcciones a la hora de escribir artículos o la tesis. Suerte en vuestros nuevos proyectos y no cambiéis nunca. A María José Collados por escucharme, por apoyarme y por todo el trabajo que has hecho. Al director del departamento, Carlos de Miguel, muchas gracias

por escuchar nuestras sugerencias y hacer todo lo posible por llevarlas a cabo. A Silvia Cenoz, por contar conmigo y por enseñarme todo acerca del laboratorio. A Iñigo Izal por ser una gran persona, un excelente profesor y mejor artista.

No puedo olvidar a mis compañeros de laboratorio, los cuales han sido grandes apoyos y consejeros en los momentos complicados, pero también increíbles pilares durante de mi estancia. Gracias a Antonia García Garzón, mi predecesora, referente en los primeros años y amiga de por vida. A Alex Urdiciain por su capacidad de hacer reír, pero sobre todo por ser una gran persona. A mi primera alumna, Alba Yanguas, por todo tu trabajo y paciencia. A Jorge García y Adriana Cortés, muchas gracias por todo vuestro apoyo y por vuestras sugerencias e ideas para que este trabajo saliese adelante.

Por último, querría agradecer a mis amigos, empezado desde Uharte Arakil y Unanua, pasando por Tafalla y terminado por Orisoain. Muchas gracias por ser como sois y por apoyarme en todo.

ABREVIATURAS

A

- α -SMA:** alfa actina de músculo liso
(alpha smooth muscle actin)
- ACE:** enzima convertidora de Angiotensina
(Angiotensin-converting enzyme)
- ADAM:** dominio de la metalopeptidasa ADAM
(ADAM metallopeptidase domain)
- AdNox5 β :**
Adenovirus Nox5 β
(adenovirus Nox5 β)
- Akt:** Proteína quinasa B
(protein kinase B)
- ALK:** quinasa similar al receptor de activina
(activin receptor like kinase)
- Ang II:** Angiotensina II
(Angiotensin II)
- AT1/2:** receptor de Angiotensina II tipo 1 y 2
(Angiotensin II receptor type 1 and 2)

B

- BCA:** ácido bicinconínico
(bicinchoninic acid)
- BSA:** seroalbúmina bovina
(bovine serum albumin)

C

- Cat:** catalasa
(catalase)
- Cav-1:** caveolina 1
(caveoline1)
- CAMKII:** calmodulina quinasa tipo II
(calmodulina kinase II)
- C/EBP:** factor de transcripción (CCAAT)
(CCAAT/enhancer-binding protein)
- Cit c:** citocromo c
(cytochrome c)
- CIP:** Fosfatasa alcalina de intestino de ternero
(calf intestinal alkaline phosphatase)
- COL1A1:** colágeno tipo 1 alfa 1
(collagen type 1 alpha 1)

- COX:** ciclooxigenasa
(ciclooxygenase)
- CREB:** elemento de respuesta al cAMP
(cAMP response element binding)

D

- DAG:** diacilglicerol
(diacylglycerol)
- DEPC:** dietilpirocarbonato
(diethylpyrocarbonate)
- DHE:** dihidroetidio
(dihydroethidium)
- DMEM:** medio Eagle Dulbecco modificado
(Dulbecco's modified Eagle's medium)
- DMSO:** dimetil sulfóxido
(dimethyl sulfoxide)
- DPP:** decapentaplégico
(decapentaplegic)
- Duox:** dual oxidasa
(dual oxidase)

E

- ECM:** matriz extracelular
(extracelular matrix)
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
(ethylenediaminetetraacetic acid)
- EGF:** factor de crecimiento epidérmico
(epidermal growth factor)
- EGTA:** ácido etilenglicol del ácido tetraacético
(ethylene glycol tetraacetic acid)
- ERK:** quinasa regulada por señales extracelulares
(extracellular-signal-regulated kinase)
- ET-1:** endotelina-1
(endothelin-1)

F

- FBS:** suero fetal bovino
(fetal bovine serum)
- FGF:** factor de crecimiento de fibroblastos
(fibroblast growth factor)
- FOXO:** factor de transcripción de la familia que contiene la caja Forkhead, subgrupo O
(forkhead box O)

G

- GSH:** glutation reducido
(reduced glutathione)
- GSSG:** glutation oxidado
(oxidized glutathione)
- GPx:** glutation peroxidasa
(glutathione peroxidase)
- Grb2:** proteína 2 unidora del receptor de factor de crecimiento
(Growth factor receptor bound protein 2)

H

- HASMC:** células lisas musculares de aorta humana
(human aortic smooth muscle cells)
- HEPES:** ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etano-sulfónico
(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
- HSC:** células estelares hepáticas
(hepatic stellate cells)
- HRP:** peroxidasa de rábano
(horseradish peroxidase)
- Hsp90:** proteína de choque térmico de 90 KDa
(heat-shock protein 90)

I

- IGF:** factor de crecimiento insulínico
(insulin-like growth factor)
- IL:** interleuquina
(interleukin)
- Iono:** Ionomicina
(ionomycin)
- IP3:** inositol trifosfato
(inositol trisphosphate)

J

- JNK:** quinasa c-Jun N-terminal
(c-Jun N-terminal kinase)

L

- LAP:** péptido inhibidor asociado a lactencia
(latency-associated peptide)
- LB:** medio Luria-Bertani
(Luria-Bertani medium)

M

- MAPK:** proteína quinasa activada por mitógenos
(mitogen-activated protein kinase)
- MEK:** proteína quinasa quinasa activado por mitógenos
(mitogen-activated protein kinase kinase)
- MEM:** medio esencial mínimo
(minimum essential media)
- MMP:** metaloproteasa de matriz
(matrix metalloproteinase)
- MOI:** multiplicidad de infección
(multiplicity of infection)
- mTOR:** diana de la rapamicina en mamíferos
(mammalian target of rapamycin)

N

- NAC:** N-acetilcisteína
(N-acetylcysteine)
- NF-κB:** factor nuclear kappa B
(nuclear factor kappa B)
- NGF:** factor de crecimiento nervioso
(nerve growth factor)
- NO:** óxido nítrico
(nitric oxide)
- NOS:** sintasa de óxido nítrico
(nitric oxide synthase)
- Nox:** NADPH oxidase
(NADPH oxidase)
- Nox5-L:** isoformas largas de Nox5
(large isoforms of Nox5)
- Nox5-S:** isoforma corta de Nox5
(short isoform of Nox5)

P

- PBS:** tampón fosfato salino
(phosphate buffered saline)
- PDGF:** factor de crecimiento derivado de plaquetas
(platelet-derived growth factor)
- PI3K:** fosfoinositol-3-quinasa
(phosphoinositide 3 kinase)
- PKB:** proteína quinasa B (=Akt)
(protein kinase B)
- PKC:** proteína quinasa C
(protein kinase C)
- PLGF:** factor de crecimiento de placenta
(placental growth factor)
- PLA:** fosfolipasa A
(phospholipase A)
- PLC:** fosfolipasa C
(phospholipase C)
- PLD:** fosfolipasa D
(phospholipase D)
- PMA:** forbol-12-miristato-13-acetato
(phorbol 12-myristate 13-acetate)
- P/S:** penicilina/streptomina
(penicillin/streptomycin)

R

- Rac:** sustrato de la toxina botulínica C3 relacionado con Ras
(Ras-related C3 botulinum toxin substrate)
- RACE:** amplificación rápida de extremos de cDNA
(Rapid Amplification of cDNA Ends)
- Rho:** Proteína homóloga a Ras
(Ras homolog protein)
- RNOS:** especies reactivas de nitrógeno
(reactive nitrogen species)
- ROS:** especies reactivas de oxígeno
(reactive oxxygen species)

S

- SDS:** dodecil sulfato de sodio
(sodium dodecyl sulfate)

- Smad:** (caenorhabditis elegans protein SMA and drosophila melanogaster mothers against DPP homolog protein type 1)
- SOD:** superóxido dismutasa
(superoxide dismutase)
- Src:** proteína quinasa Src originariamente aislada en el virus del sarcoma de Rous.
(Sarcoma protein kinase)
- STAT:** transductor de señal y activador de la transcripción
(signal transducer and activator of transcription)

T

- TβRI:** receptor tipo I de TGF-β
(TGF-β receptor type I)
- TβRII:** receptor tipo II de TGF-β
(TGF-β receptor type II)
- TGF:** factor de crecimiento transformante
(transforming growth factor)
- TIMP:** inhibidor tisular de las metaloproteasas
(tissue inhibitor of metalloproteinases)
- TNF:** factor de necrosis tumoral
(tumor necrosis factor)
- TORC2:** complejo quinasa TOR de tipo 2
(Tor kinase complex 2)

V

- VEGF:** factor de crecimiento de endotelio vascular
(vascular endothelial growth factor)

X

- XDH:** xantina deshidrogenasa
(xanthine deshhydrogenase)
- XO:** xantina oxidasa
(xanthine oxidase)
- XOR:** xantina oxidoreductasa
(xanthine oxidoreductase)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. FIBROSIS HEPÁTICA	3
1.1. Fisiología del hígado	3
1.2. Características generales y patogénesis	4
1.3. Incidencia	5
2. COMPOSICIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR	6
3. LAS CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS EN LA FIBROSIS HEPÁTICA	7
3.1. Localización y morfología	7
3.2. Funciones	7
3.3. Activación de las HSC	9
3.4. Principales citoquinas profibrogénicas	11
3.4.1. TFG- β	11
3.4.1.1. Origen, tipos y estructura	12
3.4.1.2. Rutas de señalización del TGF- β	12
3.4.1.3. Función del TGF- β en HSC	16
3.4.2. Angiotensina II	16
3.4.2.1. Rutas de señalización de la Angiotensina II	16
3.4.2.2. Función de la Angiotensina II en HSC	18
4. NADPH OXIDASAS (NOX)	18
4.1. Estrés oxidativo	18
4.2. Fuentes principales de ROS	20
4.3. Tipos, estructura y actividad enzimática de las Nox	21
4.4. Expresión y localización celular de la Nox	23
4.5. Regulación	24
5. NOX5	25
5.1. Origen, isoformas de Nox5 y distribución tisular	25
5.2. Estructura y actividad de Nox5	28
5.3. Localización subcelular	29
5.4. Inducción de Nox5	29
5.5. Regulación de la actividad de Nox5	30
5.5.1. Regulación dependiente de calcio	30
5.5.2. Fosforilación	31
5.5.3. Interacción con otras proteínas	31
5.5.4. Chaperonas	32
5.6. Relevancia fisiopatológica	32
6. PAPEL DE LAS NOX EN LA FIBROSIS HEPÁTICA	34
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
1. HIPÓTESIS	39
2. OBJETIVOS	39
MATERIAL Y MÉTODOS	41
1. CULTIVOS CELULARES	43
1.1. Líneas celulares empleadas	43
1.2. Mantenimiento del cultivo celular	43

1.3. Subcultivo y congelado de las células	44
2. GENERACIÓN Y TRANSFECCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS	45
2.1. Estructura del plásmido pcDNA3.2-NOX5 β	45
2.2. Generación del plásmido pcDNA3.2-Nox5 ϵ	46
2.2.1. Transformación bacteriana de XL1-BLUE con pcDNA-Nox5 β	46
2.2.2. Realización de cultivo líquido y Maxiprep	46
2.2.3. Digestión enzimática con endonucleasas de restricción y ligación	47
2.2.4. Secuenciación de los plásmidos obtenidos	48
2.3. Transfección de las células con los plásmidos	49
3. PRODUCCIÓN DEL ADENOVIRUS NOX5β	50
4. SILENCIAMIENTO MEDIANTE RNA DE INTERFERENCIA	50
5. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD NOX	52
5.1. Producción extracelular de peróxido de hidrógeno	52
5.2. Determinación de anión superóxido mediante reducción de citocromo c	53
5.3. Otros métodos para medir ROS	53
5.3.1. Quimioluminiscencia mediante L-012	53
5.3.2. Oxidación del dihidroetidio (DHE)	54
6. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD	54
7. EXTRACCIÓN Y PROCESAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	56
7.1. Extracción del RNA total	56
7.2. Determinación de la concentración de RNA	56
7.3. Tratamiento con DNasa I	57
7.4. Transcripción inversa	57
8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CONVENCIONAL	57
9. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL	59
9.1. Por sonda Taqman	59
9.2. Por sonda de SYBR Green	60
10. AMPLIFICACIÓN DEL EXTREMO 5' DEL mRNA DE NOX5 (RACE 5')	62
10.1. Síntesis de cDNA específico del gen de Nox5	63
10.2. Purificación e inserción de colas homopoliméricas	63
10.3. Amplificación del extremo 5'UTR a partir del poliC-cDNA	63
10.4. Amplificación del cDNA unido a la cola poliC por PCR	64
11. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN-BLOT	64
11.1. Preparación de extractos celulares	64
11.2. Determinación de la concentración de proteínas	64
11.3. Electroforesis SDS-PAGE	65
11.4. Western blot	65
11.5. Inmunodetección	66
11.6. Cuantificación de las membranas	66
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	68
RESULTADOS	69
<hr/>	
1. EXPRESIÓN DE NOX5 Y SUS ISOFORMAS EN LX-2	71
1.1. Variantes de Nox presentes en HSC	71
1.2. Expresión de Nox5 en LX-2	72
1.3. Silenciamiento de Nox5	73

2. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE NOX5β Y NOX5ϵ	74
2.1. Sobreexpresión de Nox5 β mediante infección	74
2.2. Generación del plásmido pcDNA3.2-Nox5 ϵ	77
2.3. Producción de ROS tras sobreexpresar Nox5 β y Nox5 ϵ en LX-2	83
3. EFECTO DE NOX5β Y NOX5ϵ SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LX-2	89
4. INDUCCIÓN DE NOX5 POR TGF-β Y ANGIOTENSINA II	89
4.1. TGF- β y Angiotensina II inducen la expresión de Nox5	89
4.2. Efecto de catalasa y antioxidantes sobre la inducción de Nox5	91
4.3. Nox5 no es inducida por la producción de H ₂ O ₂ de Nox4	92
5. EFECTOS PROFIBROGÉNICOS DE NOX5 EN LX-2	93
5.1. Inducción de colágeno por TGF- β y Angiotensina II	93
5.2. Efectos del silenciamiento y la sobreexpresión de Nox5 sobre el colágeno	94
DISCUSIÓN	99
1. EXPRESIÓN DE NOX5 EN CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS HUMANAS	101
2. ACTIVIDAD DE LAS DISTINTAS ISOFORMAS DE NOX5	103
3. POSIBLE RELEVANCIA DE NOX5 EN LA FIBROSIS HEPÁTICA	105
4. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	110
CONCLUSIONES	113
BIBLIOGRAFÍA	117
ANEXOS	137
1. ANEXO 1: SECUENCIA PLÁSMIDO pcDNA 3.2-NOX5 β	139
2. ANEXO 2: SECUENCIA PLÁSMIDO pcDNA 3.2-NOX5 ϵ	141
3. ANEXO 3: PUBLICACIONES	144

INTRODUCCIÓN

1. FIBROSIS HEPÁTICA

1.1. Fisiología del hígado

El hígado es el órgano más voluminoso del cuerpo y uno de los más importantes desde el punto de vista metabólico y detoxificador. Presenta diversas funciones como son la síntesis de proteínas plasmáticas, proteínas de transporte lipídico y colesterol, el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno, la conversión del amonio en urea, la desintoxicación de compuestos y fármacos, el procesamiento de la hemoglobina y el almacenamiento de vitaminas y glucógeno.

A simple vista, la arquitectura del hígado se divide en dos lóbulos de distinto tamaño. Sin embargo, cada lóbulo está dividido a su vez en lobulillos hepáticos que presentan una forma hexagonal y constituyen la llamada unidad morfológica hepática. Cada lobulillo se construye alrededor de una vena centrolobulillar y en las esquinas o vértices se sitúan las tríadas portales (**Figura I-1**).

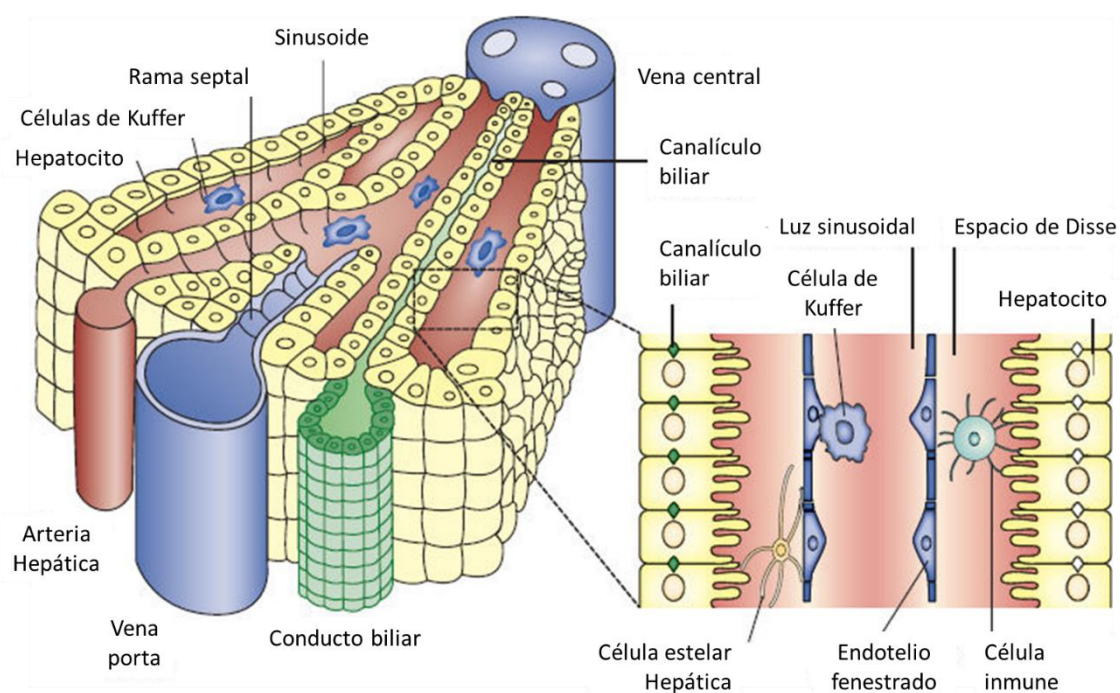


Figura I-1. Descripción gráfica de los componentes celulares y funcionales de lobulillo hepático. Imagen tomada y modificada de Adams et al. [1].

Esta unidad morfológica está formada por distintos tipos celulares que se clasifican en dos grupos: células parenquimatosas y células no parenquimatosas. Dentro de las células parenquimatosas están los hepatocitos, los cuales constituyen el 80-85% de las células del lobulillo. Son las células más abundantes y son las principales responsables de las funciones del hígado. Las células no parenquimatosas son menos abundantes y más pequeñas, pero poseen vital importancia en el correcto mantenimiento de la arquitectura y funcionamiento de este órgano [2]. Dentro de este grupo se incluyen los siguientes tipos celulares:

- Células endoteliales: forman el endotelio fenestrado de los sinusoides hepáticos.
- Células estelares hepáticas (HSC): también llamadas células de Ito. Encargadas de almacenar la vitamina A o retinol y de la síntesis de la matriz extracelular.
- Células de Kupffer: macrófagos del hígado.
- Células inmunes

1.2. Características generales y patogénesis

El hígado es un órgano imprescindible y se caracteriza por una gran capacidad de regeneración. En respuesta a agresiones como la infección por hepatitis, alcohol, esteatohepatitis o enfermedades autoinmunes, el hígado promueve distintos mecanismos dirigidos a reparar el daño. Muchas veces esta agresión suele ser aguda o de corta duración por lo que el hígado reacciona y lo soluciona en un breve periodo de tiempo [3]. Por el contrario, la lesión hepática crónica, desencadenada por diferentes etiologías, induce un daño continuado, por lo que la capacidad regenerativa resulta alterada y las reacciones locales no son capaces de revertir esta situación. La respuesta a la lesión crónica se caracteriza por necrosis y/o apoptosis de células parenquimatosas y su reemplazo por matriz extracelular (ECM) desencadenando la enfermedad de fibrosis hepática [3]. Además, este proceso va acompañado de un aumento en la infiltración de células inmunes aumentando la inflamación y acelerando el proceso fibrótico. Aunque inicialmente esta reacción es beneficiosa, el proceso de curación de la herida puede volverse patogénico reemplazando progresivamente el parénquima con tejido fibrótico y distorsionando la arquitectura vascular del hígado, lo que puede causar una disfunción del órgano [4].

La cicatriz generada por el daño hepático se acumula muy lentamente generando una fibrosis hepática que no presenta ningún síntoma detectable. Tras 20 años en los pacientes alcohólicos [5] o con esteatohepatitis [6] o 30 años en el caso de los pacientes con hepatitis C [7], la fibrosis hepática evoluciona a una cirrosis que se detecta gracias a la alteración de los marcadores hepáticos. Además, una vez que se establece la cirrosis, el potencial para revertir este proceso disminuye y se desarrollan complicaciones como el incremento de riesgo de fallo hepático, la hipertensión portal o la aparición de un hepatocarcinoma [8]. Si se elimina el agente causante del daño hepático puede ocurrir una resolución, reversión casi normal y completa de la arquitectura hepática, de la fibrosis hepática temprana (**Figura I-2**). En el caso de la cirrosis, aunque la restauración completa del hígado no es posible, podría darse una regresión o mejoría, disminución de la fibrosis, mejorando levemente los resultados clínicos [7].

Los estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que las terapias antifibróticas podrían ralentizar, detener o revertir la progresión de la fibrosis [9–12]. Sin embargo, en la actualidad, los únicos tratamientos disponibles para la cirrosis son la eliminación del agente causante para los pacientes alcohólicos, los antiretrovirales para los pacientes con hepatitis B o C o el trasplante de hígado [11].

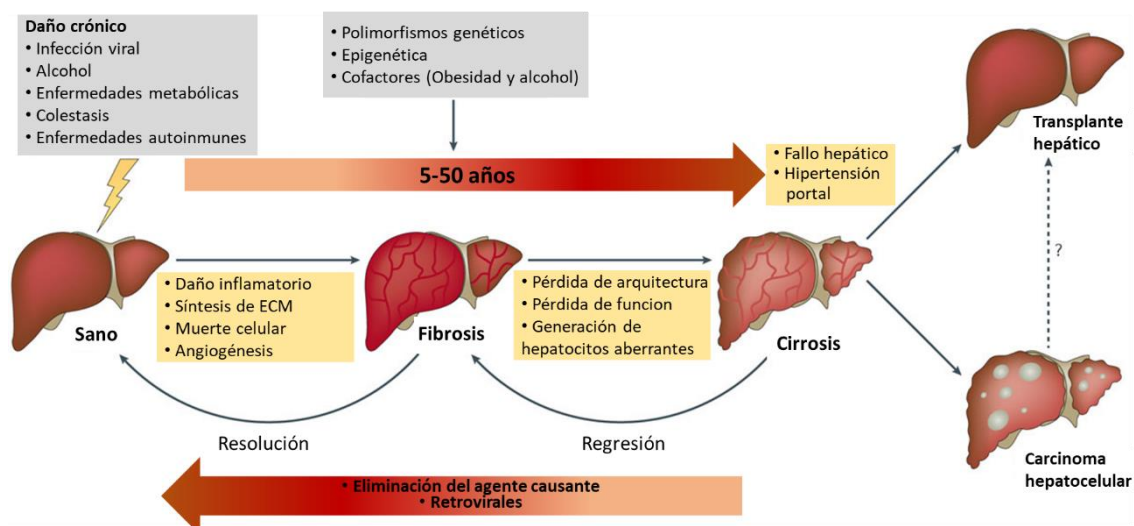


Figura I-2. Transcurso de la enfermedad hepática desde un hígado sano a un hepatocarcinoma pasando previamente por un hígado fibrótico y cirrosis. Imagen tomada y modificada de Pellicoro et al. [7].

1.3. Incidencia

La fibrosis hepática es un estadio intermedio de la cirrosis y no muestra ni signos ni síntomas detectables. Esto hace que esta lesión sea muy difícil de diagnosticar al paciente. Los síntomas, normalmente, aparecen años más tarde cuando el paciente ya sufre de cirrosis. Por ello, no existen datos de epidemiológicos acerca de la fibrosis hepática.

La cirrosis hepática, en cambio, es un importante problema de salud pública y una fuente importante de morbilidad, mortalidad prevenible y subestimada [13]. Representa la indicación principal para el trasplante de hígado en Estados Unidos y Europa [14]. Los cambios en la mortalidad por cirrosis en diferentes países reflejan las diferencias existentes en la prevalencia de factores de riesgo como el abuso de alcohol y la infección por hepatitis B o C. En 2010, la cirrosis hepática fue la 23ª causa de muerte en el mundo (31 millones), pero sobre todo son preocupantes los datos obtenidos de Asia y centro de Europa situándose en los puestos 9º y 10º del ranking de 2010, respectivamente [15]. En 2009, el Centro Nacional de Estadísticas de Salud (NCHS) de Estados Unidos estimaba que la enfermedad hepática crónica y la cirrosis representaban la 12ª principal causa de muerte en general y la 5ª causa principal de muerte en pacientes de 45 a 54 años [16]. En Inglaterra, en cambio, se estima que las enfermedades hepáticas son la 5ª mayor causa de muerte y está creciendo [2]. Con respecto a España, las enfermedades crónicas del hígado y cirrosis se sitúan en el 11º puesto de la lista de las principales causas de muerte en España en 2015, con un total de 4.400 muertos [17]. Por si fuera poco, es probable que en unos años aumente la prevalencia de la cirrosis debido al envejecimiento de la cohorte de hepatitis C y también por el aumento de la enfermedad del hígado graso que se da principalmente en países desarrollados [18].

Como hemos comentado en el apartado anterior, la cirrosis es una enfermedad irreversible el cual requiere en la mayoría de los casos un trasplante de órgano [7]. Por el

contrario, muchos estudios afirman que la fibrosis hepática podría revertirse eliminando el agente causante o mediante tratamientos antifibróticos [10]. Teniendo en cuenta la capacidad de resolución y los problemas existentes en la detección de la fibrosis hepática, hoy día los esfuerzos están centrados en la búsqueda de nuevos biomarcadores por tecnología de imagen [19] o proteómica [20]. A pesar de los esfuerzos todavía no hay nada concluyente.

2. COMPOSICIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

La fibrosis hepática se caracteriza por una sustitución de los hepatocitos muertos por una matriz extracelular (ECM). Esta matriz es un componente complejo y dinámico del hígado que tiene múltiples funciones. Las fibras de la ECM presentan funciones arquitectónicas y mecánicas, que proporcionan resistencia a la tracción y elasticidad, modulan la difusión y el flujo vascular, y regulan el movimiento celular. La ECM es determinante para el comportamiento celular normal y patológico. De hecho, las proteínas de la ECM regulan adicionalmente la señalización, sirviendo como ligandos, depósitos de almacenamiento [21,22].

La matriz extracelular del hígado sano está compuesta de una serie de macromoléculas que incluyen colágenos (tipos I, III, IV, V y VI) o glucoproteínas no colagenosas como laminina y fibronectina y proteoglicanos [23]. En el sinusoides normal, existe una matriz de membrana compuesta por laminina y colágeno de tipo IV. Durante el desarrollo de la fibrosis, esta matriz se reemplaza progresivamente por otra rica en colágenos intersticiales, particularmente colágeno tipo I y III [24]. Inicialmente esta acumulación de ECM fibrilar se asocia con la capilarización de los sinusoides, es decir, con una pérdida de la fenestración endotelial y pérdida de las microvellosidades de los hepatocitos. Finalmente, la acumulación de colágeno aumenta hasta que las estructuras vasculares se unen y la arquitectura del hígado se altera de manera significativa.

Los estudios han demostrado un aumento de 4-7 veces en el contenido de colágeno y glicosaminoglicanos en el hígado cirrótico en comparación con el hígado normal [25]. Hay un aumento desproporcionado en el colágeno fibrilar, colágeno tipo I, y también hay aumentos en laminina y proteoglicanos. El hígado cirrótico, en etapa terminal, presenta franjas o cicatrices formadas por matriz extracelular densa rica en elastina además de los colágenos fibrilares descritos anteriormente [26,27].

Durante el transcurso de la enfermedad también existen evidencias de degradación de la matriz extracelular. De hecho, la matriz puede degradarse por varias familias enzimáticas, pero las más importantes son las metaloproteasas (MMP). Se trata de una familia de endopeptidasas dependientes de zinc y calcio que son producidas por hepatocitos, células del tejido conectivo y células inflamatorias y tienen distinto rango de actividad contra los constituyentes principales de la ECM, incluidos los colágenos fibrilares y no fibrilares,

fibronectina y la elastina [28]. La expresión de MMP principalmente ocurre en hepatocitos, células estelares hepáticas, células de Kupffer y macrófagos. Las metaloproteasas más importantes en la fibrosis hepática son la MMP-1, MMP-2, MMP-9 o MMP-13, y presentan gran importancia en la resolución de esta enfermedad [4,29,30].

Sin embargo, también existe un gran control de la homeostasis de la ECM, ya que los miembros de la familia inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP) funcionan como inhibidores importantes de la actividad extracelular de las MMPs [31]. Tanto TIMP-1 como TIMP-2 son ambos expresados por células estelares hepáticas (HSC) y, de hecho, la expresión de TIMP-1 está estrechamente relacionada con la activación de HSC. Esta estrecha correlación que existe entre los niveles de TIMP-1 y la actividad fibrótica, convierte a TIMP-1 en un marcador fibrótico sérico no invasivo [32,33].

3. LAS CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS EN LA FIBROSIS HEPÁTICA

3.1. Localización y morfología

Las células estelares hepáticas (HSC) son células no parenquimatosas que se localizan en el espacio de Disse, es decir, entre las células endoteliales de los capilares fenestrados y los hepatocitos. Se descubrieron por primera vez en 1876 [34]. Constituyen el 10% de las células del hígado y son esenciales para el mantenimiento de su homeostasis [35]. En un hígado normal las HSC mantienen un fenotipo quiescente, no proliferativo, con prolongaciones, con núcleo ovalado y con un retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi moderadamente desarrollados. Su citoplasma es rico en microtúbulos, desmina y retinol o vitamina A [36]. Esta morfología varía mucho cuando estas células reciben citoquinas inflamatorias secretadas por células adyacentes. Este proceso de cambio morfológico y funcional se denomina activación de células estelares hepáticas.

3.2. Funciones

- *Homeostasis de la matriz extracelular*

En el hígado normal, la ECM comprende el 0,5% del hígado total en peso y se distribuye entre las tríadas portales, venas centrales y la cápsula de Glisson, con solo una pequeña porción presente también en el espacio de Disse. Los tres tipos de células que rodean el espacio de Disse (hepatocitos, células endoteliales y células estelares hepáticas) son los encargados de secretar cada producto de la ECM en hígado normal. Si bien todos ellos expresan colágeno tipo I, los hepatocitos producen principalmente fibronectina, las células endoteliales expresan el colágeno tipo IV y las HSC en reposo secretan laminina y colágeno de tipo III y IV [37]. A causa de un daño continuado, las HSC activadas aumentan la síntesis de colágeno predominando entre todos ellos el tipo I y III.

El mantenimiento de la homeostasis de la ECM se fundamenta en el equilibrio que existe entre la producción de nuevos componentes de la ECM y las tasas de degradación. Las metaloproteasas de la matriz (MMP) son los efectores primarios de la degradación de ECM, cuya actividad, a su vez, es regulada por inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs).

- *Metabolismo del retinol*

La vitamina A (retinol) se almacena principalmente en el hígado en mamíferos, concretamente, en las células estelares hepáticas que son el depósito celular primario de esta molécula. Normalmente, los retinoides son absorbidos por el intestino y transportados en restos de quilomicrones como ésteres de retinilo a los hepatocitos, donde se hidrolizan en retinol libre. Éste luego se transfiere a las HSC, donde se reesterifican. Es importante destacar que estas gotitas contienen no solo retinoides, sino también triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y ácidos grasos libres, entre otros [38,39].

- *Control del sistema inmune hepático*

Estudios recientes ha demostrado el papel fundamental de las HSC en la inmunología hepática. Las HSC son esenciales para el correcto funcionamiento del sistema inmune, ya que son una fuente versátil de muchos factores inmunológicos solubles que incluyen citoquinas como, interleuquina-17 (IL-17) y quimiocinas [40]. A su vez, estas células pueden actuar como una célula presentadoras de antígeno (APC), y tiene actividad de autofagia [40]. Además, responden a muchos factores inmunológicos a través de receptores tipo toll (TLR), transducen señales a través de vías y mediadores encontrados tradicionalmente en células inmunes, incluida la ruta Hedgehog (Hh). En general, las HSC promueven respuestas más bien inmunosupresoras en homeostasis, como inducción de células T reguladoras, apoptosis de células T o inhibición de células T citotóxicas. En condiciones de lesión hepática, las HSC son sensores importantes de la integridad del tejido, ya que interactúan directamente o a través de mediadores solubles con distintas células inmunes [41].

- *Secreción de factores y citoquinas hepáticas*

Las funciones descritas anteriormente y otras muchas están reguladas por citoquinas y mediadores secretados por las HSC. De hecho, estas células son esenciales en la comunicación célula-célula, secretando citoquinas paracrina o autocrinamente y captando mediante receptores factores secretados por otras células [3,42]. Entre los mediadores más importantes destacan TGF- α y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), dos potentes factores del crecimiento epitelial que desempeñar funciones importantes en la proliferación de hepatocitos durante regeneración del hígado. También existe una secreción del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) al producirse un daño hepático. El PDGF está formado por una familia de isoformas diméricas que inducen estimulación del crecimiento, quimiotaxis, cambios en la forma de las células y señalización intracelular en HSC. Otro factor que destaca es el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) secretado autocrina y paracrinamente y caracterizado por su efecto profibrogénico. Por último, las HSC son una

fuerza importante de endotelina-1 (ET-1), así como una diana de esta citoquina durante la lesión hepática. ET-1 tiene un efecto contráctil prominente sobre las HSC, que pueden contribuir a la hipertensión portal en el hígado cirrótico [37].

3.3. Activación de las HSC

Una consecuencia común de la lesión hepática es el daño del parénquima el cual produce un aumento en la liberación de citoquinas que inducen la apoptosis de los hepatocitos, la activación de células de Kupffer, la producción de especies reactivas del oxígeno y la remodelación de la ECM, desencadenando la activación de las HSC. La mayoría de las células estelares hepáticas activadas provienen de las células estelares hepáticas quiescentes, pero cada vez está más claro que otras poblaciones de células mesenquimales también contribuyen a la acumulación de matriz extracelular. Los fibroblastos portales son importantes en lesiones biliares, aunque la médula ósea y el epitelio-mesenquimal también puede contribuir [37,43].

Por tanto, la activación de las HSC es esencial para la producción de colágeno tipo I y el transcurso de la enfermedad. Este proceso de activación comprende dos fases bien establecidas: la iniciación y la perpetuación.

- *Fase de iniciación o preinflamatoria*

La fase de iniciación de la activación de las HSC se caracteriza por sufrir cambios en la expresión génica y en el fenotipo. Las células pasan de un estado quiescente a un estado activado, promieloblástico, donde los cambios morfológicos más importantes son la pérdida de vesículas de retinol y el aumento de la expresión de proteínas del citoesqueleto como la α -SMA (α -actina de músculo liso) [36,44,45]. Las primeras señales que desencadenan el inicio de la activación de las HSC son las secretadas de forma paracrina por poblaciones de células vecinas como son las células endoteliales, plaquetas, células inmunes y hepatocitos (**Figura I-3**). Las células endoteliales que forman el revestimiento vascular de los sinusoides del hígado, juegan un papel vital en estas primeras etapas [46]. Además, el endotelio secreta fibronectina y TGF- β , pero también endotelina-1 y angiotensina II, modulando la inflamación y activando a los macrófagos y a las HSC. Los efectos producidos por la fibronectina son en gran medida promigratorios, lo que sugiere que la migración es esencial en la activación de las HSC. Las plaquetas también pueden contribuir mediante la secreción de TGF- β [47], así como serotonina y PDGF, el mitógeno más potente descrito hasta ahora de las HSC [35].

Además, durante este proceso hay una infiltración conocida de células de Kupffer. Estas células liberan factores inflamatorios como TNF- α o interleuquinas atrayendo células inflamatorias, pero también secretan TGF- β induciendo la activación de las HSC y estimulando la síntesis de ECM [48,49]. Los monocitos y macrófagos producen mediadores parecidos a las células de Kupffer, aunque los macrófagos durante la activación también producen especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la NADPH oxidasa 2 (Nox2) [50]

pudiendo inducir las síntesis de colágeno al perpetuar el fenotipo de células estelares activadas.

Por último, la lesión hepática lleva consigo un aumento de la apoptosis de los hepatocitos y de HSC. Esto ocurre gracias a la secreción de factores como Fas-L, TNF- α o TRAIL los cuales inducen apoptosis a través de las vías de señalización de Fas, TNF-receptor 1 y TRAIL-R [51]. Consecuentemente, los cuerpos apoptóticos generados pueden ser captados por las HSC induciendo su activación [37,52]. Los hepatocitos al entrar en fase apoptótica también son capaces de secretar citoquinas como TGF- α , TGF- β o IL-6 produciendo una retroalimentación positiva.

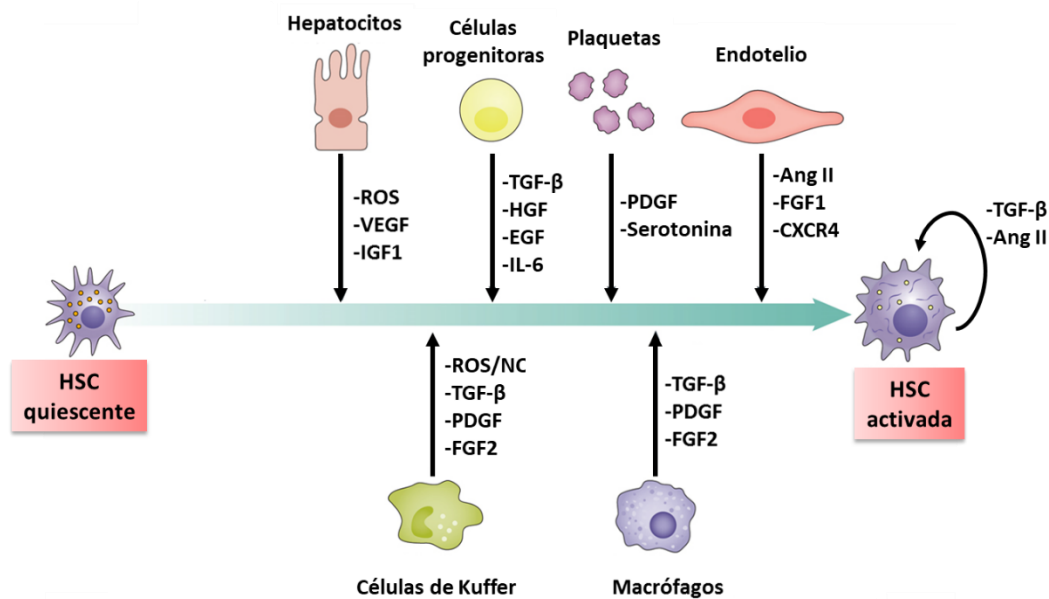


Figura I-3. Citoquinas paracrinamente secretadas durante la activación de HSC. Imagen tomada y modificada de Tsuchida y Friedman [35].

- *Fase de perpetuación:*

La perpetuación de las HSC es el resultado de los factores descritos anteriormente que mantienen el fenotipo activado y se caracteriza por tener como resultado final el aumento de la deposición de proteínas de la ECM. En esta etapa existe una producción tanto paracrina como autocrina de citoquinas por parte las HSC (**Tabla I-1**) [53]. De hecho, estas células aumentan su propia producción y secreción de citoquinas y receptores desencadenando cambios celulares que afectan a la proliferación, fibrogénesis, contractilidad, depósitos de retinol y degradación de la matriz [3].

En esta fase de perpetuación cabe destacar el papel del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) [54,55]. Se produce una secreción de PDGF y síntesis de sus receptores induciendo la proliferación de las HSC con fenotipo miofibroblástico. Además, hay que destacar el papel fundamental de los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMPs), ya que inhiben la degradación de la matriz y promueven la supervivencia de las HSC.

Además, la fibrogénesis o producción masiva de ECM, en particular de colágeno tipo I, es potenciada mayormente por la secreción paracrina y autocrina de TGF- β en este proceso de activación [54,56]. Este factor induce un aumento de los genes que codifican colágeno y otros componentes de la ECM y, además, inhibe la degradación de estas proteínas al disminuir la expresión de genes que codifican para MMP y aumentar la de genes TIMPs.

Tabla I-1. Citoquinas autocrinas y paracrinas implicadas en la perpetuación de la activación de HSC.

Cambios funcionales	Citoquinas y agonistas paracrinos y autocrinos implicados
Proliferación	PDGF, EGF, bFGF, TGF- α y IGF-1.
Quimiotaxis de los HSC	PDGF, M-CSF y MCP-1
Quimiotaxis de los Leucocitos	M-CSF y MCP-1
Fibrogénesis	TGF- β , IL-1 y IL-6
Contractilidad	ET-1, óxido nítrico y trombina.

3.4. Principales citoquinas profibrogénicas

Como hemos explicado en el apartado anterior la activación de las HSC, está mediada por citoquinas proinflamatorias, proliferativas o profibrogénicas. En la fase de iniciación la secreción es paracrina, es decir, por células vecinas o adyacentes. Por el contrario, en la fase de perpetuación las citoquinas presentes son generadas paracrina y autocrinamente por las propias HSC.

Entre todas las citoquinas que participan en este proceso de activación, en el presente trabajo nos hemos centrado en dos de ellas: TGF- β y Angiotensina II. La primera, TGF- β , es una citoquina clave en la activación de HSC, en el aumento de la ECM, en la apoptosis de los hepatocitos e incluso por su efecto citostático de las células epiteliales del conducto biliar [57,58]. De hecho, la inhibición del receptor de este factor de crecimiento en modelos experimentales de fibrosis hepática ha favorecido la resolución de esta enfermedad [59–61].

Además de esta citoquina profibrogénica, también destaca la Angiotensina II debido a su gran poder profibrogénico y proliferativo. Su concentración sérica es mayor en pacientes cirróticos y el bloqueo de sus receptor AT1 atenúa notablemente la fibrosis en modelos con daño hepático crónico [62,63].

3.4.1. TFG- β

Tras la lesión hepática crónica inicial se produce un proceso de inflamación y un aumento de la síntesis de ECM, principalmente colágeno tipo I. Si el daño persiste la fibrosis hepática puede terminar en una cirrosis o hepatocarcinoma. En este proceso el factor de

crecimiento transformante β (TGF- β) es secretado por las células de Kupffer, pero también por hepatocitos, macrófagos y HSC. Además, el TGF- β es un factor esencial en el transcurso de la enfermedad, ya que es la citoquina encargada de la activación de las HSC induciendo un aumento en la síntesis de colágeno tipo I, aumenta la apoptosis de los hepatocitos y también induce la supervivencia, migración e invasión de células inflamatorias [57,58].

3.4.1.1. Origen, tipos y estructura

La superfamilia del TGF- β está formada por 33 proteínas estructural y funcionalmente relacionadas que ha ido creciendo con el transcurso de los años. Las subfamilias más importantes son: TGF- β , activina, proteína morfogenética ósea (BMP), decapentapléptico (DPP)... A su vez, la subfamilia TGF- β está formada por tres isoformas: TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3. TGF- β 1, en particular, es un potente modulador de la proliferación celular, diferenciación celular y fibrogénesis.

El TGF- β inmaduro es sintetizado como un polipéptido latente (L-TGF- β), el cual se acumula en grandes cantidades en suero y unido a proteoglicanos dentro de la ECM [64–66]. L-TGF- β se activa a su forma madura mediante la disociación del péptido inhibidor asociado a latencia (LAP). Esa rotura es catalizada por proteasas de tipo furina que rompen la unión con el LAP generando dos fragmentos: LAP y el TGF- β . Luego, 2 fragmentos LAP y 2 de TGF- β se unen por uniones no covalentes generando un complejo llamado complejo latente pequeño (SLC). A continuación, la subunidad LAP mediante puentes disulfuro puede asociarse a proteínas de alto peso molecular llamadas proteínas de unión a TGF- β latentes (LTBP) creando así el gran complejo latente (LLC). De este modo LLC está formado por TGF- β -SLC-LTBP [67–70]. Después, la molécula resultante queda anclada sobre la ECM hasta que las proteasas actúan liberando definitivamente el TGF- β en forma activa. En HSC una de las hipótesis es que la plasmina secretada por estas células puede ser la causante de la maduración del TGF- β [71,72]. A su vez, existen otros mecanismos de maduración o de activación implicados como el producido por la trombospondina-1, integrinas, ROS o el pH ácido [66,73–76]. El TGF- β activo (maduro) es un homodímero de 25 kD, que se une a receptores específicos del TGF- β .

3.4.1.2. Rutas de señalización del TGF- β

La señalización del TGF- β está regulada por dos importantes receptores: receptor TGF- β tipo I (T β RI) y tipo II (T β RII). Generalmente el TGF- β , primero, se une fuertemente al receptor tipo II (T β RII), esta unión permite la incorporación posterior del receptor tipo I (T β RI), formando un gran complejo ligando-receptor que implica un dímero de ligando y cuatro moléculas receptoras. En humanos, existen siete T β RI, también conocidos como quinasas de pseudorreceptores de activina (ALK), y cinco T β RII. En la mayoría de las células, T β RII unido a TGF- β se une a ALK-5 formando un tetrámero, pero existen otros tejidos

celulares donde TBR1 se une a ALK-1. Para que la señalización continúe es imprescindible que TBR1 fosforile los dominios GS (glicina-serina) de ALK-5 desencadenando una cascada de señalización a través de dos vías principales de señalización denominadas como la ruta canónica y la no canónica [77].

- *Ruta clásica o canónica:*

En HSC la activación del receptor, TBR1-ALK5, por TGF- β propaga una cascada intracelular a través de proteínas efectoras de la vía canónica, como son los factores de transcripción Smad2 y Smad3. Una vez fosforiladas, estas proteínas forman un complejo con Smad4 que conduce a la translocación nuclear induciendo un aumento en la síntesis de colágeno tipo I (**Figura I-4**). Otros autores han descrito que este aumento de síntesis de colágeno también puede suceder por una vía paralela en el cual el TGF- β provoca la asociación de TBR1 con ALK-1 induciendo la fosforilación de Smad1/5/8 y la unión de éstos con Smad4 [78].

En el caso de los hepatocitos, la activación de Smads mediada por TGF- β conduce a la inhibición del crecimiento celular y apoptosis [79]. En células endoteliales, TGF- β puede unirse a TBR1 y a ALK-1 induciendo la fosforilación de Smad1/5/8 y la unión de éstos con Smad4. A continuación, este complejo transloca al núcleo pudiendo aumentar la expresión de genes relacionados con la angiogénesis [80].

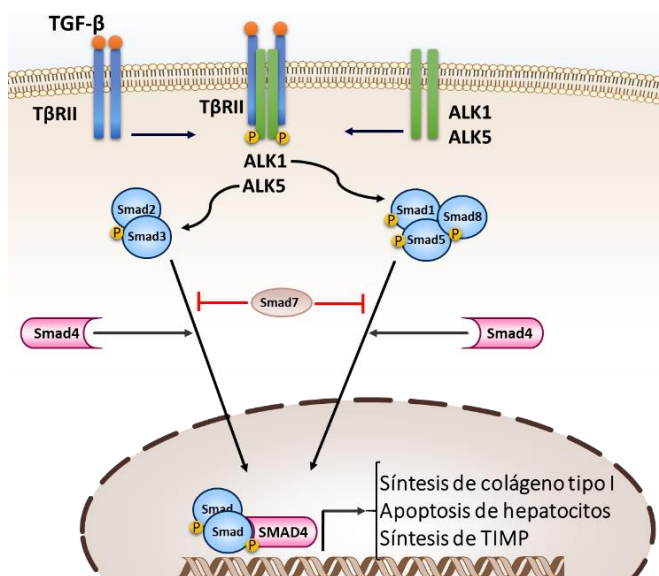


Figura I-4. Vía canónica de la ruta de señalización inducida por la citoquina TGF- β . Descripción gráfica de las proteínas que participan en la señalización.

Como todas las vías de señalización, en la vía del TGF- β también existen proteínas que lo regulan como es el caso de Smad6 o Smad7, también denominadas I-Smad [81]. Éstas son transcripcionalmente inducidas por las citoquinas de la familia TGF- β y su función es regular negativamente estas vías de señalización estableciendo un importante circuito de retroalimentación negativa. De estos dos I-Smads, Smad7 es un antagonista común de la familia del TGF- β , mientras que Smad6 es específico para la señalización de proteína

morfogenética ósea. Ambas proteínas, Smad6 y Smad7, han conservado el dominio MH2 del extremo carboxi-terminal, pero a diferencia de las demás Smads, carecen del dominio MH1 del extremo N-terminal y del sitio de fosforilación [81,82]. A su vez, Smad7 además de bloquear el complejo Smad2/3/4, también puede actuar sobre el receptor T β RI [81].

- *Ruta no canónica:*

Existen otras que presentan gran importancia en la señalización del TGF- β (**Figura I-5**). Son rutas que están interrelacionadas o comunicadas con las Smad y entre ellas. La inhibición de una de las vías impide el efecto funcional de esta vía concreta, pero no bloquea la señalización del TGF- β . Las vías de señalización más importantes son:

Activación de la vía ERK: Los receptores de TGF- β de tipo I y tipo II son propiamente serina-treonina quinasas, sin embargo, la vía de ERK requiere de una fosforilación por tirosina quinasas para su activación. Recientemente se ha descrito que T β RII puede autofosforilarse en tres residuos de tirosina o puede ser fosforilado por Src permitiendo la activación de esta vía [83]. T β RII forma parte del receptor heterotetramérico con T β RI el cual debe ser fosforilado bien por la autofosforilación o por la transfosforilación por T β RII [83]. T β RI ya activada puede reclutar y fosforilar directamente ShcA en residuos de tirosina y serina, promoviendo así la formación de un complejo ShcA/Grb2 /Sos, capaz de activar Ras en la membrana plasmática, lo que lleva a la activación secuencial de c-Raf, MEK y Erk. La activación de Erk es importante para la proliferación celular y para la transición epitelio-mesenquima (EMT), que es una de las principales funciones biológicas de TGF- β [84]. La EMT es un proceso fisiológico normal necesario para el desarrollo embrionario, y es una característica patológica asociada con la metástasis y la fibrosis.

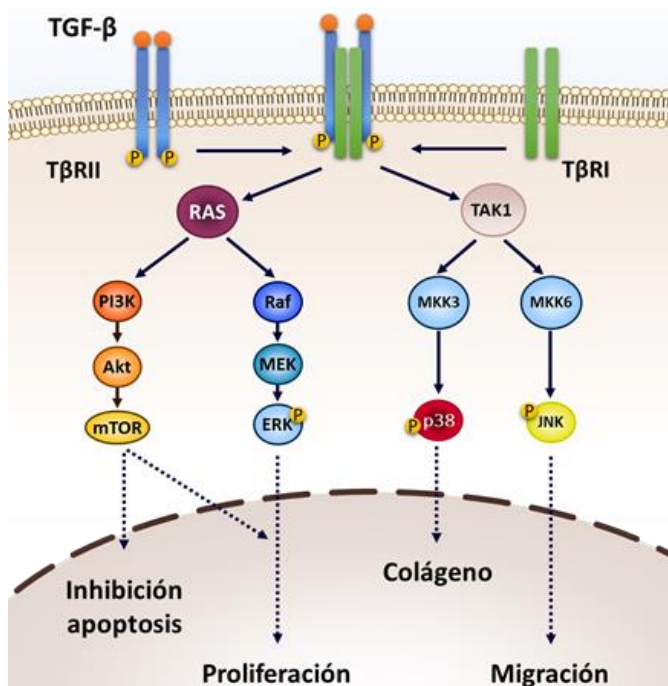


Figura I-5. Vía no canónica de la ruta de señalización inducida por la citoquina TGF- β . Descripción gráfica de las proteínas implicadas en las 4 vías de la señalización no canónicas

Activación de la vía p38/JNK: La ruta señalización de p38 MAPK es una de las rutas claves en la potenciación de la síntesis de colágeno en HSC mediada por TGF- β [85,86]. Aunque se ha demostrado que las rutas de señalización Smad y p38 MAPK influyen en la expresión génica del colágeno, se desconocen la contribución relativa y los mecanismos que estas dos vías de señalización tienen para regular su expresión génica. El descubrimiento y descripción de esta ruta de señalización ha sido compleja debido a la cantidad de proteínas que requiere. Brevemente, el TGF- β se une a l receptor T β RII y produce una fosforilación y reclutamiento de T β RI. A continuación, el complejo de los receptores con TGF- β une a TRAF6 gracias a un motivo de unión a TRAF6 que presenta T β RI. Consecuentemente, TRAF6 se poliubiquitina y promueve la asociación con TAK1 y TAB1 induciendo la activación de la vía por poliubiquitinación, ahora, de TAK1. Esta proteína, TAK1, miembro de la familia MAPKKK, interacciona con MEKK1 y este complejo finalmente puede activar a JNK mediante MKK4 o también a p38 por MKK3 o MKK6 [84,87]. Paralelamente, algunos autores se ha demostrado que la activación de la vía p38 también puede darse en respuesta a estrés donde se incluyen las ROS [88,89]. En el caso de la fibrosis hepática se ha demostrado que las rutas de señalización de p38 y Smad regulan de forma independiente y aditiva la expresión del colágeno tipo I [90,91]. Con respecto a JNK, ésta contribuye a la expresión de α -SMA en las primeras etapas de la activación de HSC, induce la muerte de los hepatocitos y promueve la migración de HSC apoyando un posible papel de JNK en el desarrollo de la fibrosis hepática [92].

Activación de la vía PI3K/Akt: Al unirse TGF- β con T β RII, produce la fosforilación y reclutamiento de T β RI. A continuación, PI3K puede asociarse al receptor e inducir la fosforilación de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) generando así el fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3). Consecuentemente, PIP3 interactúa y transloca AKT a la membrana plasmática, donde AKT se activa por fosforilación en Thr308 por la quinasa dependiente de fosfoinosítido 1 (PDK1) y en Ser473 por mTORC2 y otras quinasas [93,94]. La fosforilación de AKT produce cascadas de señalización que afecta a la funcionalidad celular de las HSC, como puede ser un aumento en la proliferación, crecimiento celular e inhibición de la apoptosis [95,96].

Además de estas dos vías principales la secreción de TGF- β y su unión con el receptor genera un aumento instantáneo de ROS. Esta producción es muy rápida (5-10 min), difícil de ser detectada y a día de hoy se desconoce la fuente que lo genera [97,98]. Algunos autores afirman que son las NADPH oxidasas basalmente expresadas [97,99], mientras que otros autores creen que el origen de las ROS es mitocondrial [100]. Las ROS generadas desencadenan cascadas de señalización como MAPKs [98] pero también actúan sobre factores de transcripción como NF- κ B [101] o AP-1 [98] induciendo genes como el colágeno tipo I, genes relacionados con la proliferación o diversas NADPH oxidasas que dan lugar a un incremento de ROS más tardío.

3.4.1.3. Función del TGF- β en HSC

El TGF- β es un factor de crecimiento multifuncional que desempeña muchas funciones en respuesta a lesión tisular en órganos parenquimatosos como el riñón y el hígado [58]. El papel del TGF- β en el hígado es de particular interés, ya que se cree que esta citoquina es la principal contribuyente para la apoptosis de los hepatocitos, la activación de HSC, la secreción de colágeno tipo I y de inhibidores de proteasas tisulares (TIMP-1), y por tanto inductor de la fibrosis [53,58]. Las células de Kupffer son las principales productoras, aunque también es secretado por el endotelio, hepatocitos o las propias HSC [53].

En HSC el TGF- β junto a otras provoca la transdiferenciación a miofibroblasto que es la principal responsable del aumento de síntesis de colágeno tipo I [53]. Este incremento de colágeno ocurre tras la unión del TGF- β maduro con su receptor el cual activa la fosforilación de Smad2/3, la asociación de éstos con Smad4 para la translocación al núcleo donde se induce una mayor síntesis de colágeno tipo I [57]. A su vez, paralelamente, el TGF- β induce un aumento en la transcripción y traducción de Nox4 [102] en HSC que origina un aumento de la concentración intracelular de H₂O₂ y consecuentemente la activación de factores de transcripción y vías de señalización como las MAPK que contribuyen a una mayor síntesis de colágeno tipo I [57,103].

3.4.2. Angiotensina II

Angiotensina II (Ang II) es una hormona multifuncional que tiene gran influencia en la función cardiovascular a través de una serie de interacciones intracelulares donde Ang II interacciona con los receptores de Angiotensina 1 y 2 (AT1 y AT2). De esta forma regula la presión sanguínea, el volumen plasmático y la actividad del sistema simpático. Sin embargo, desde hace unos años, se sabe que Ang II también posee propiedades similares a un factor de crecimiento o citoquina. De hecho, está demostrado que Ang II promueve muchos de los efectos en miofibroblastos o HSC activados, como son la contracción, la proliferación, la liberación de citoquinas inflamatorias y el aumento de la deposición de la ECM [104,105].

3.4.2.1. Rutas de señalización de la Angiotensina II

Una vez sintetizada la hormona/citoquina Ang II, esta molécula es captada por los receptores AT1-4, los cuales son proteínas transmembrana acopladas a proteínas G. Sin embargo, los más importantes son los receptores AT1 y AT2.

- *Ruta mediada por el receptor AT1:*

En humanos, entre los receptores de esta familia, AT1 se ha identificado como el receptor con mayor poder fisiológico. Este receptor se expresa en cardiomiocitos y fibroblastos y la unión de su ligando produce la activación de proteínas G debido al intercambio de GDP en GTP [106,107]. A su vez, el receptor AT1 puede ser fosforilado en

condiciones basales tras la unión de su ligando Ang II. Entre ellas destacan varias tirosinas quinasas como Janus quinasas (JAK), Src o quinasas de adhesiones focales (FAK) [108].

Como hemos citado anteriormente, AT1 interacciona con varias proteínas G heterotriméricas produciendo distintas cascadas de señalización, como la activación de la fosfolipasa C (PLC) o formación de cGMP (**Figura I-6**). La activación de PLC induce la hidrólisis de PIP2 en IP3 y DAG y por tanto la salida de Ca^{2+} del retículo rugoso y la activación de PKC, propagando la cascada de señalización [109]. La salida de calcio induce vasoconstricción mientras que PKC regula el pH intracelular a través de la proteína intercambiadora Na^+/H^+ . Además, el receptor AT1 se ha relacionado con fosfolipasa D (PLD) que induce hipertrofia cardíaca, proliferación celular y contracción vascular [105]. También, se ha relacionado la fosfolipasa A₂ (PLA₂) en esta cascada induciendo la activación de la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) [110]. Esta familia está formada por ERK1/2, JNK y p38 y su expresión se ha asociado con crecimiento celular, apoptosis, diferenciación celular o contracción vascular [110]. No se sabe muy bien cómo se activa la vía de las MAPK en la vía de señalización de Ang II, pero se cree que PLA₂ y PLD a través tirosinas quinasas y Src (no tirosina quinasas) respectivamente, pueden inducir y activar NADPH oxidasas (Nox) generando ROS y por tanto activando las vías de MAPK.

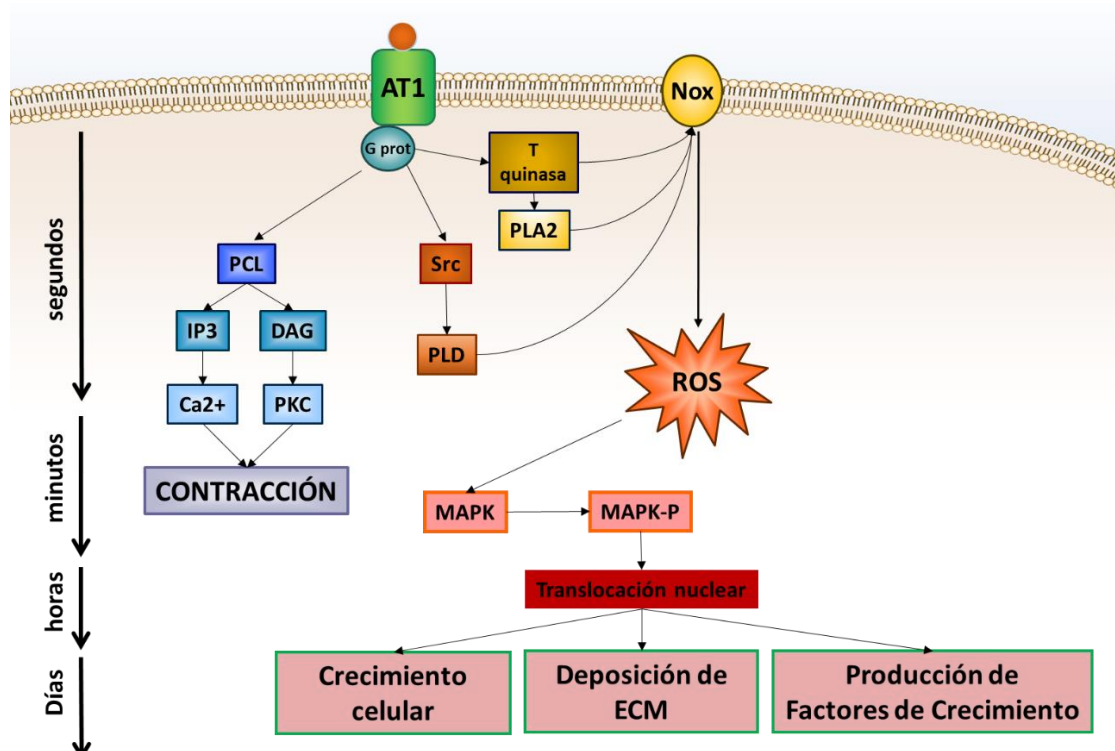


Figura I-6. Descripción esquemática y temporal de la activación de la vía de señalización de Angiotensina II (Ang II) y sus consecuencias funcionales. La unión de Angiotensina II a su receptor desencadena efectos funcionales, entre los que destacan la contracción, proliferación, aumento de la ECM y producción de factores de crecimiento.

- *Ruta mediada por el receptor AT2:*

AT2 es la segunda isoforma que mayor poder fisiológico presenta y se expresa en altos niveles en páncreas, corazón, riñón, ovario, cerebro y tejido vascular. Este receptor se expresa en adultos tras un daño vascular, cardíaco, cicatrización u obstrucción renal [111]. Los efectos funcionales se desconocen, pero algunos autores describen los efectos como contrarios a los que produce AT1, ya que induce apoptosis y vasodilatación [112].

3.4.2.2. Función de la Angiotensina II en HSC

Desde hace décadas se conoce que la fibrosis hepática al igual que la cirrosis va acompañada de una vasodilatación sistémica que desencadena la hipertensión portal [113]. Sin embargo, la bibliografía indica que en la fibrosis hepática muchos de los componentes del sistema renina-angiotensina están sobreexpresados, como la enzima ACE o el receptor AT1 [114,115]. Además, la expresión de estos componentes sólo se da en HSC activadas y no en quiescentes, lo que sugiere que son importantes para el desarrollo de la enfermedad hepática [116].

La secreción de Ang II por células adyacentes va también acompañada de la capacidad de las HSC activadas de sintetizar y secretar Ang II, generando una retroalimentación positiva [117]. Respecto al mecanismo, como hemos dicho anteriormente, la Ang II genera contracción de las HSC [118] vía IP3 o DAG, pero otra ruta de señalización crucial es la de las MAPK [119]. Esta última ocurre debido a que la unión de Ang II con AT1 activa a las NADPH oxidasas generando ROS e inhibiendo de esta forma a las tirosina fosfatasas [89,120,121]. Consecuentemente hay una activación de MAPK que provocan aumento en la proliferación celular o secreción de factores de crecimiento [119,122]. De hecho, la activación de esta vía hace que las HSC activadas sean capaces de secretar colágeno tipo I [119] y la citoquina TGF- β 1 [123–126]. La secreción de esta citoquina pro-fibrogénica agrava aún más la enfermedad produciendo un aumento mayor de colágeno tipo I. Por el contrario, experimentos *in vivo* han demostrado que ratas y ratones deficientes en el receptor AT1, al igual que el bloqueo de este receptor, protege a estos roedores de la generación y producción de fibrosis [127].

4. NADPH OXIDASAS (NOX)

4.1. Estrés oxidativo

En el organismo constantemente hay una generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que generalmente son inestables, de vida-media corta y, como indica su nombre, pueden reaccionar con otros compuestos desencadenando cascadas de señalización o directamente la muerte celular. En los sistema biológicos podemos diferenciar dos grupos de especies: las especies reactivas de oxígeno (ROS) o de nitrógeno (RNS). Dentro de las ROS tenemos el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical

hidroxilo ($\cdot\text{OH}$); mientras que en las RNS destacan el radical óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), peroxinitrito (ONOO^-) y el radical dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$) [128]. Las ROS y RNS pueden reaccionar con otras moléculas celulares iniciando la peroxidación lipídica, la rotura del DNA y la oxidación indiscriminada de moléculas de membrana causando daño celular y por tanto patologías o enfermedades [129].

Como hemos dicho anteriormente hay una constante generación y eliminación de estas especies reactivas dentro de la célula. Todo comienza con la generación del superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) que se produce cuando se transfiere un electrón al oxígeno (O_2) [130], como ocurre en la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Este radical puede reaccionar con otra molécula igual y captar dos protones generando otra especie no-radical como es el H_2O_2 además del O_2 (**Figura I-7**). La molécula de peróxido de hidrógeno es menos inestable y su vida media es más larga por lo que muchas veces suele convertirse en un mensajero secundario de la señalización celular [128]. Sin embargo, el H_2O_2 puede reaccionar (reacción de Fenton) con hierro libre o con enzimas que posean grupos hemo donde el hierro también esté en un estado reducido (Fe^{2+}) pudiendo así generar el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el anión hidroxilo (^-OH) y el hierro o grupo hemo en estado oxidado (Fe^{3+}). El $\cdot\text{OH}$ generado es mucho más reactivo y tiene mayor poder de oxidación que el radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, por lo que puede producir peroxidación lipídica, oxidación de proteínas o daño en el DNA, RNA y otras moléculas [131].

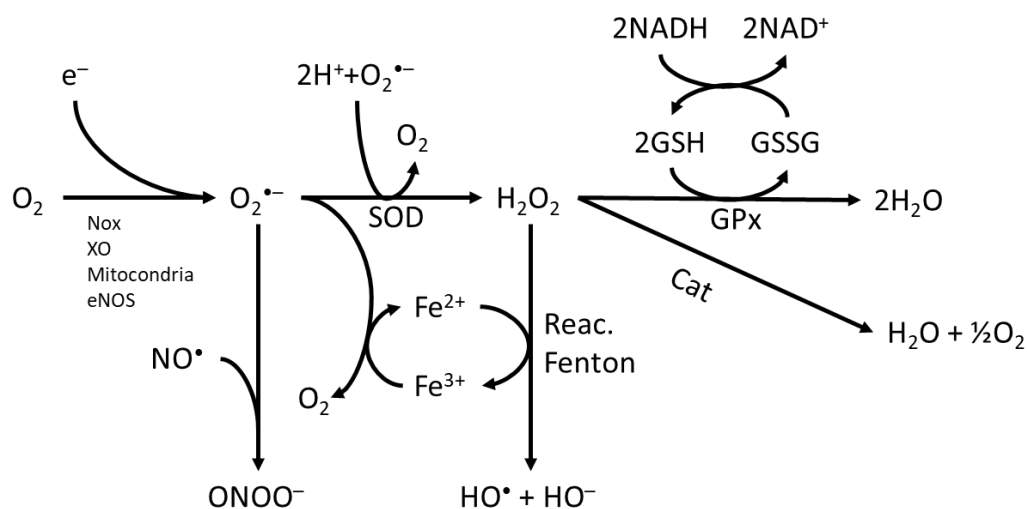


Figura I-7. Esquema resumen de la reducción del oxígeno (O_2) hasta llegar a su estado más reducido que es el H_2O . Además, se anotan las enzimas y vías alternativas que pueden surgir dentro de la célula. Nox, NADPH oxidasa; XO, xantina oxidasa; eNOS, óxido nítrico sintasa de endotelio; SOD, superóxido dismutasa; Cat, catalasa; GPx, glutatión peroxidasa.

Para hacer frente a estos radicales y a sus posibles consecuencias, las células expresan enzimas a concentraciones altas encargadas de eliminar las ROS de la célula. La primera enzima para destacar es la superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la transformación de 2 moléculas de $\text{O}_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 y O_2 . Existen 3 isoformas de esta enzima dependiendo de la localización celular y composición de los metales que presenta en su estructura. El H_2O_2 generado es descompuesto por otro grupo de enzimas antioxidantes donde cabe destacar el

papel de la catalasa (Cat). Esta enzima capta dos moléculas de H_2O_2 y genera 2 moléculas de H_2O y una de O_2 . Además de esta enzima está la glutatión peroxidasa (GPx) capaz de reducir una molécula de H_2O_2 con dos de GSH generando en esta reacción 2 moléculas de H_2O y una de glutatión en forma oxidada (GSSG). A su vez, existe otra proteína llamada glutarredoxina que es conocida por su capacidad antioxidante, ya que se encarga de reducir los grupos tiol de las proteínas que han sido, previamente, oxidados por las ROS. Mediante estas enzimas la célula intenta reducir al máximo las posibilidades de generar el radical $\cdot OH$, ya que una vez producido es un radical muy reactivo y provoca oxidación lipídica, oxidación de proteínas o daños en el DNA [131].

4.2. Fuentes principales de ROS

Dentro de la célula existe una gran variedad de fuentes enzimáticas y no-enzimáticas de ROS (**Figura I-8**), como la mitocondria, xantina oxidasa, NADPH oxidasas, óxido nítrico sintasa, ciclooxigenasa o la mieloperoxidasa. Sin embargo, no todas se expresan del mismo modo ni tienen la misma relevancia en todos los tejidos.

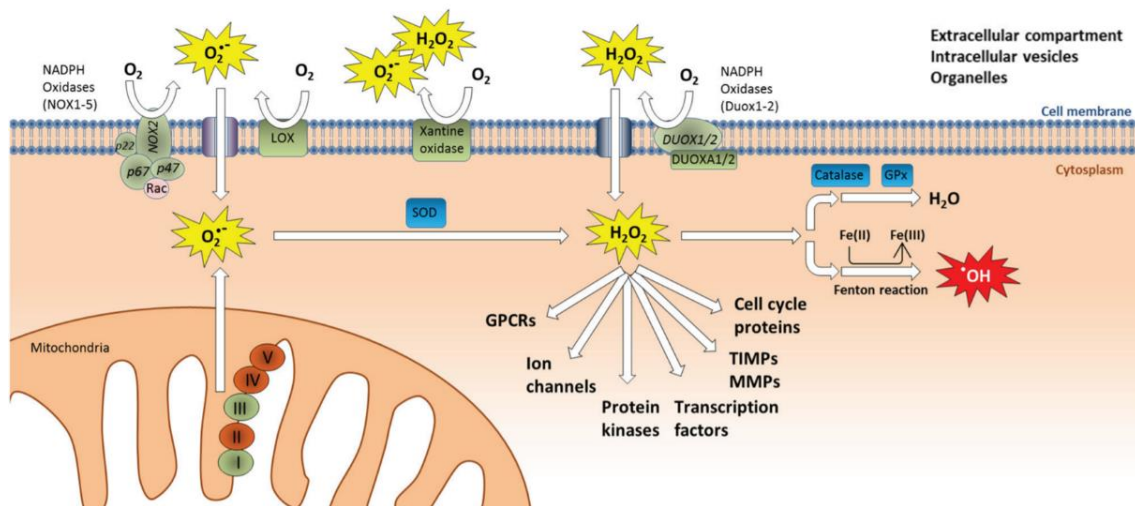


Figura I-8. Fuentes endógenas de formación intracelular de ROS. Imagen tomada de Øvrevik et al. [132]. Nox, NADPH oxidasa; Duox, dual oxidasa; LOX, lipoxigenasa; SOD, superóxido dismutasa; GPx, glutatión peroxidasa; TIMP1, inhibidor de metaloproteasas de tejido; GPCR, Receptor acoplado a proteínas G.

La cadena de transportadora de electrones mitocondrial es uno de los principales generadores celulares de ROS. A través de la cadena transportadora el oxígeno molecular (O_2) puede reducirse para formar $O_2^{\cdot-}$ que dismuta rápidamente por la superóxido dismutasa mitocondrial (Mn-SOD) a H_2O_2 . Esta molécula puede difundir fácilmente de la mitocondria y desencadena una cascada de señalización dentro de la célula, incluso apoptosis por vía mitocondrial [133–135]. De todas formas, el $O_2^{\cdot-}$ es un subproducto de la respiración mitocondrial, al contrario que ocurre con la xantina oxidasa y las NADPH oxidasas. Estas proteínas son enzimas especializadas en la producción de ROS. La xantina oxidorreductasa (XOR), participa en la degradación de las purinas, convirtiendo la hipoxantina a ácido úrico

en dos reacciones [136]. Durante ciertas condiciones, como la inflamación, la enzima se oxida y se proteoliza convirtiéndose en xantina oxidasa (XO) generando de esta forma $O_2^{\bullet-}$ como producto final.

Respecto a las NADPH oxidasas, son proteínas cuya función intrínseca es la producción regulada de $O_2^{\bullet-}$ o H_2O_2 . Además, se ha demostrado que están implicadas en distintas patologías, como enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, cáncer, aterosclerosis o fibrosis hepática [137].

4.3. Tipos, estructura y actividad enzimática de las Nox

En mamíferos existen 7 variantes de las Nox divididos en dos grupos: fagocíticas y no fagocíticas. La fagocítica es la Nox2 o también llamado $gp91^{phox}$, mientras que en la no fagocítica encontramos a Nox1, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 y Duox2 (**Figura I-9**). Las primeras investigaciones acerca de las NADPH oxidasas (Nox) se realizaron en los años 50, pero no fue hasta 30 años más tarde cuando por primera vez se clonó la subunidad catalítica de la Nox fagocítica, también llamada, $gp91^{phox}$ o Nox2 [137]. Pronto se supo que esta subunidad no era la única ya que rápidamente se descubrieron la proteína transmembrana $p22^{phox}$ y las subunidades citosólicas $p40^{phox}$, $p47^{phox}$ y $p67^{phox}$. En paralelo a estos descubrimientos en células no fagocíticas fueron apareciendo otras Nox de gran similitud hasta llegar a las que conocemos hoy en día [137].

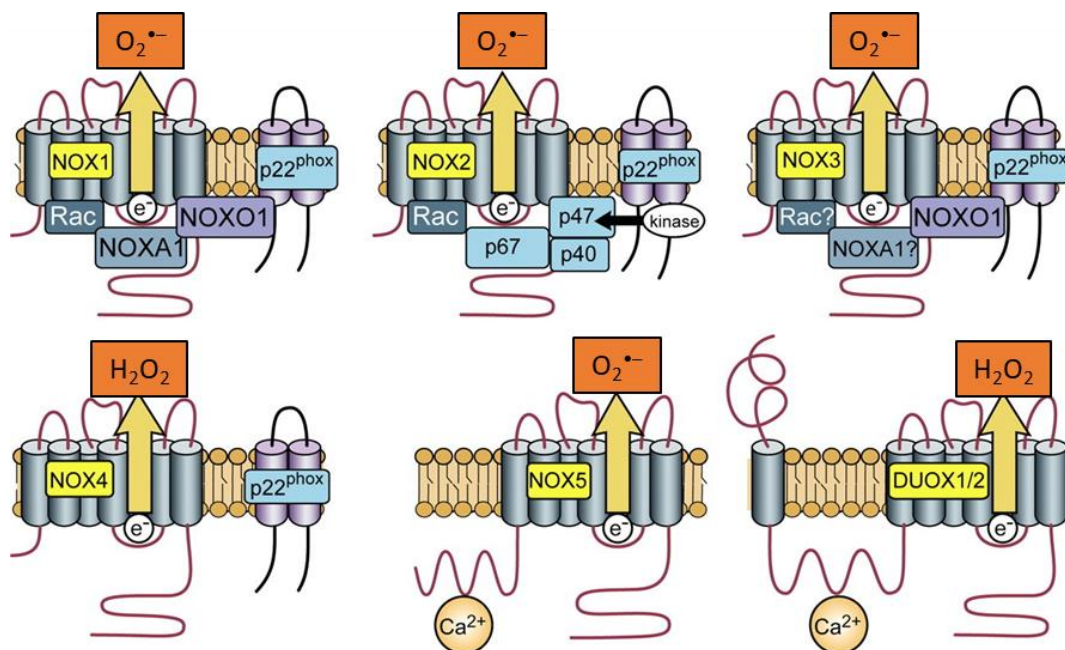


Figura I-9. Imagen de las variantes de Nox y el producto producido por cada una de ellas. Esta imagen ha sido tomada y modificada de Bedard y Krause [137].

Empezando del extremo carboxi-terminal, la Nox presenta el dominio de unión de NADPH; el dominio de unión FAD; seis dominios transmembrana con cuatro histidinas muy bien conservadas capaces de unir grupos-hemo, dos en el tercer dominio transmembrana y

otros dos en el quinto dominio transmembrana (**Figura I-10**). El extremo amino-terminal, en cambio, está menos conservado y varía de una variante a otra. A su vez, existe controversia respecto al dominio de unión de NADPH, ya que algunos autores creen que éste puede unir también NADH [137,138].

Respecto a la actividad de las NADPH oxidasas, la información más abundante está basada en los estudios de la Nox2, por ser la primera descrita y relativamente sencilla de estudiar. Se expresa en fagocitos (granulocitos neutrófilos y eosinófilos, monocitos y macrófagos) y se caracteriza por generar y liberar ROS con el objetivo de matar los patógenos [139,140]. La Nox2, al igual que las demás Nox, cataliza la reducción de un electrón del oxígeno usando NADPH como donador de electrones.

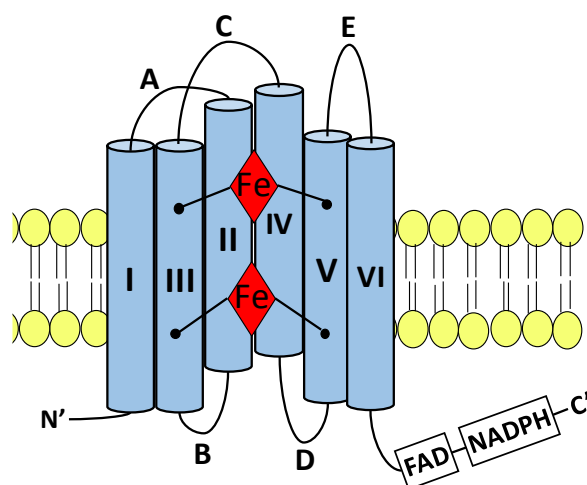


Figura I-10. Dominios y estructura de las variantes de la Nox. Formado por el dominio de unión de NADPH; el dominio de unión FAD; seis dominios transmembrana con cuatro histidinas muy bien conservadas capaces de unir grupos-hemo y con seis dominios α -helicoidales transmembrana generando dos bucles en el espacio intracelular (B- y D- *loops*) y otros tres bucles en el espacio extracelular (A-, C- y E- *loops*) [141].

Con más detalle, NADPH se une a Nox2 y dona dos electrones al dominio FAD que se reduce. A continuación, el FADH_2 se convierte en FADH^\bullet tras donar uno de los electrones al grupo hemo situado en el interior reduciéndolo, aunque éste, seguidamente, dona el electrón recibido al grupo hemo situado al exterior. Consecuentemente, este último reducirá el O_2 generando así el producto final que es el $\text{O}_2^{\bullet-}$. A continuación, FADH^\bullet puede repetir el proceso, esta vez de forma más efectiva y rápida, generando otra molécula de $\text{O}_2^{\bullet-}$ [142,143]. Por tanto, estequiométricamente hablando, de 1 mol de NADPH, se generan 2 moles de $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Esta reacción es común en todas las variantes de las Nox. Sin embargo, cabe destacar, que no todas las Nox generan $\text{O}_2^{\bullet-}$ como producto final, las variantes Nox4, Duox1 y Duox2 producen H_2O_2 y no $\text{O}_2^{\bullet-}$. En el caso de Nox4, lo consigue gracias al *E-loop* que posee y que se sitúa en la zona externa. Este *loop* está formado por histidinas altamente conservadas que hacen la dismutación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 mucho más rápida [141]. En Duox1 y 2, en cambio, la dismutación ocurre en la cola amino-terminal situada extracelularmente [144,145].

Además de la necesidad de NADPH para que comience la reacción, la actividad de Nox1, Nox2, Nox3 y Nox4 depende de la asociación de al menos una proteína, bien para dar estabilidad o bien para regular la generación de ROS (**Tabla I-2**). Entre estas proteínas está p22^{phox} , que se encarga de estabilizar y unir otras proteínas; la subunidad moduladora

p40^{phox}; subunidad organizadora 47^{phox} y la activadora p67^{phox}. A su vez, la proteína de unión a GTP, Rac, es también necesaria para la activación de diversas Nox. De En el caso de la Nox1 requiere a Noxo1 (homólogo de p47^{phox}), Noxa1 (homólogo de p67^{phox}), p22^{phox} y a una GTPasa llamada Rac1. Nox2, en cambio, necesita a p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, y a Rac1 o Rac2. Nox3 se asocia con las mismas proteínas que Nox2, menos a p40^{phox} y a Rac2 [146]. Nox4 sólo requiere p22^{phox} para dar estabilidad a la proteína. Con respecto a Nox5, Duox1 y Duox2, no requieren ninguna proteína adicional para ser activas, aunque recientemente se ha descubierto que la actividad de Nox5 puede ser modulada por la asociación de proteínas como Hsp90 o calcio-calmodulina quinasa entre otras [147].

Tabla I-2. Características específicas de cada variante de la Nox. Información obtenida de Paik [146].

Variante	Componentes	Tejido/célula	Localización subcelular	Agonistas
Nox1	p22 ^{phox} , Noxo1/p47 ^{phox} , Noxa1/p67 ^{phox} , Rac1	Colon, vascular, útero, próstata, hígado...	Membrana plasmática, caveolas y endosomas perinucleares.	Ang II, TNF- α , LPS, IFN- γ , ET-1, PDGF...
Nox2	p22 ^{phox} , p40 ^{phox} , p47 ^{phox} , p67 ^{phox} , Rac1/2	Neutrófilos, fagocitos, vasos, corazón e hígado.	Membrana plasmática, núcleo y endosomas perinucleares.	PDGF, Ang II, prostaglandina F _{2α} , IFN- γ , LPS...
Nox3	p22 ^{phox} , p47 ^{phox} , p67 ^{phox} , Rac1	Tejido fetal y oído interno.	Membrana plasmática.	
Nox4	p22 ^{phox} .	Riñón, vasos, corazón, pulmón e hígado.	Retículo, endoplásmico y adhesiones focales.	TGF- β , Ang II, TNF- α , IFN- γ ...
Nox5	Ninguna descrita.	Testículos, bazo, corazón, vasos y nódulos linfáticos.	Retículo endoplásmico y membrana plasmática.	Ang II, TNF- α , LPS, IFN- γ , ET-1, PDGF...
Duox1 y Duox2	Ninguna descrita.	Tiroides, glándulas salivales, útero e islas pancreáticas.	Se desconoce	Se desconoce

4.4. Expresión y localización celular de la Nox

La expresión de las distintas Nox varía de un tejido a otro, y también cambia en situaciones patológicas (**Tabla I-2**). La Nox1 se expresa principalmente en colon y en células de la pared vascular, pero también en el útero, próstata e hígado. La Nox2 o NADPH oxidasa fagocítica, como indica su nombre se expresa, sobre todo, en los fagocitos, pero también se

puede encontrar en células de la pared vascular, el corazón e hígado. La Nox3 se expresa en el oído interno y en el tejido fetal. La variante Nox4 se expresa mucho en el riñón y también se encuentra en el vaso, el corazón, el hígado y los pulmones. Se ha descrito que Nox5 se expresa principalmente en tejido fetal, en ovarios, en espermatozoides, en testículos y en bazo, aunque también se encuentra en el vaso, en corazón y en ganglios linfáticos. Finalmente, Duox1 y 2 se expresan mayoritariamente en las glándulas salivales, útero e islotes pancreáticas [137,146,148].

Respecto a la localización subcelular de las Nox, existen diferencias significativas de una variante a otra (**Tabla I-2**). La Nox1, por ejemplo, suele localizarse en la membrana celular, caveolas o endosomas perinucleares; la Nox2 en membrana plasmática, núcleo o endosomas perinucleares; Nox3 en la membrana plasmática; Nox4 en retículo endoplásmico o adhesiones focales y Nox5 en retículo endoplásmico y membrana plasmática. Por el contrario, no está clara la localización de Duox1 y 2 [146].

4.5. Regulación

La regulación de las variantes de las Nox es muy compleja, ya que es modulada tanto a nivel transcripcional, induciendo o suprimiendo la expresión del mRNA, como a nivel enzimático por asociación de proteínas activadoras o inhibidoras, por fosforilaciones y por otras moléculas reguladoras [137,149].

La regulación de Nox2 es la que mejor se conoce, ya que fue la primera en ser descrita. La expresión de Nox2 se ha visto que se induce con IFN- γ [137], lipopolisacárido (LPS) [150], pero también con Angiotensina II (Ang II) gracias a un aumento de Nox2 o de otras proteínas asociadas como Rac1 [151,152]. A su vez, como hemos explicado anteriormente, esta enzima presenta una regulación a través de interacciones proteína-proteína. De hecho, la Nox2 es una proteína inestable en ausencia de la proteína p22^{phox}, por lo que Nox2 siempre está asociada a esta proteína. Sin embargo, este complejo necesita la translocación a membrana de otras subunidades como p47^{phox} que se une tras una previa fosforilación [153]. La unión p47^{phox} trae consigo la unión de la subunidad activadora p67^{phox} con Nox2 [154] y la unión de p40^{phox} [145]. Finalmente, se produce la unión de Rac que interacciona primero con Nox2 y después con p67^{phox} [145].

Aunque este proceso parece que es sencillo y secuencial, se trata de un mecanismo sujeto a un proceso de activación post-traducciona l muy específico. Por ejemplo, la unión de Nox2/p22^{phox} con p47^{phox} está regulada por quinasas que fosforilan a esta última. Este proceso es un paso esencial para el anclaje de las proteínas citosólicas y se ha demostrado que la enzima más importante en la fosforilación es la proteína quinasa C (PKC) [155], aunque hay otras que también lo hacen como la proteína quinasa B/Akt [156]. Otro proceso sometido a una regulación compleja es la actividad GTPasa de Rac [149] es esencial para que Nox2 sea

activada. La regulación de esta enzima es gracias a otra serie de proteínas que la activan o la inactivan dependiendo de la finalidad [157].

La regulación de Nox1 presenta grandes similitudes, pero también diferencias con respecto a Nox2. Se ha descrito que Nox1 es inducible en muchas circunstancias, siempre en presencia de factores como PDGF [158], Ang II [159], prostaglandina $F_{2\alpha}$ [160], IFN- γ [161] o LPS [150,162]. Además, esta regulación se produce a través de factores de transcripción, como STAT, IRF, NF- κ B [137]... pudiendo modular la expresión de Nox1. A su vez, al igual que la Nox2, es necesaria la participación de proteínas citosólicas para la activación de esta enzima. Entre ellas destacan, Noxo1 (homólogo de p47^{phox}), Noxa1 (homólogo de p67^{phox}), p22^{phox} y la GTPasa Rac1.

La variante Nox3 está menos descrita y se sabe poco acerca de su regulación. Sin embargo, se conoce la participación de las proteínas citosólicas p47phox, p67phox, p22phox y la GTPasa Rac1 en su activación. Todavía no se sabe si es constitutivamente activa o es activable [161].

Nox4, es una proteína constitutivamente activa [161] que se expresa en muchos tejidos y es inducible por diversos estímulos como TGF- β [163], TFN- α [164], Ang II [165] o IFN- γ [166]. Al igual que las tres variantes descritas, Nox4 también requiere de p22^{phox} y se ha demostrado que es indispensable para generar ROS por medio de Nox4 [167].

Nox5, junto a Duox1 y 2, no requiere de subunidades adicionales para su activación, pero sí es inducible por la entrada de calcio a la célula [168]. Este homólogo se descubrió en el año 2001, por lo que su regulación actualmente se encuentra en estudio. Se han descrito citoquinas que son capaces de inducir a Nox5 desencadenando distintas respuestas según el estímulo y el tejido que se trate. Entre las más importantes están Ang II, TNF- α , LPS, IFN- γ , ET-1, PDGF [169–171]. Duox1 y 2 no necesitan p22^{phox} ni otras proteínas para ser activas. Se desconoce su localización subcelular y si hay estímulos que puedan inducir la expresión de estas proteínas transmembrana.

5. NOX5

5.1. Origen, isoformas de Nox5 y distribución tisular

Nox5 es la variante menos conocida de la familia de las Nox, aunque su actividad ya fue descrita en 1943 por MacLeod en espermatozoides [172]. El gen fue identificado y clonado en 2001 por dos grupos independientes gracias a la gran homología que vieron con la proteína Nox1 y Nox2 en testículos, bazo y riñón [173,174]. Nox5 es la variante más diferente de la familia, presentando una homología de sólo el 27% con respecto a Nox2 pudiendo ser uno de los genes más cercanos al Nox primordial (**Figura I-11**) [174]. A pesar de esta pequeña homología del gen de Nox5, su estructura proteica con respecto a las demás variantes se han conservado y presentan gran homología [175].

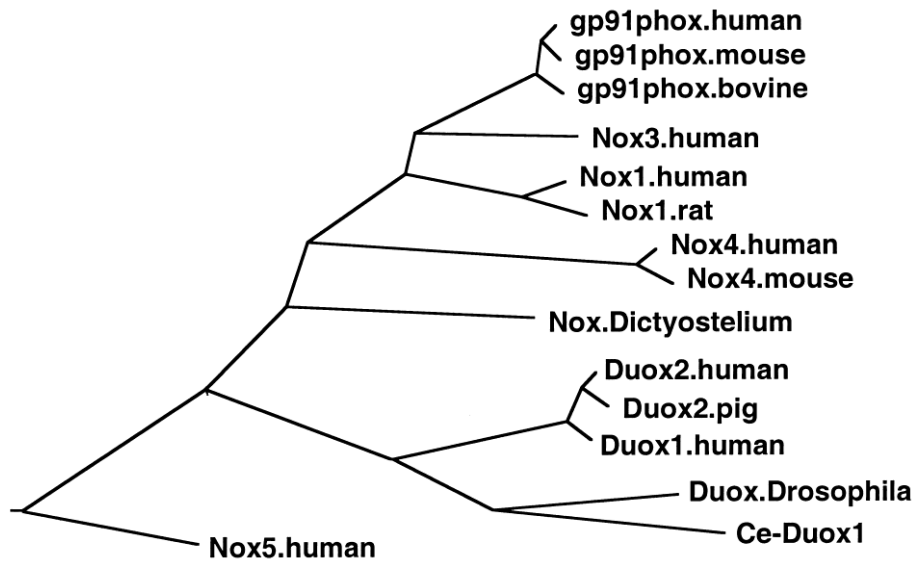


Figura I-11. Dendrograma de las distintas secuencias de la familia de las Nox. Nox5, a diferencia de las demás Nox, es altamente divergente de otros miembros de la familia. Según su posición en el árbol genealógico, Nox5 puede representar el gen más cercano al Nox primordial. Imagen tomada de Cheng et al. [174].

El gen de Nox5 tiene origen en estadios tempranos de la evolución, ya que existen proteínas con actividad parecida a esta proteína en protozoos, plantas y animales [176,177]. Esto sugiere que tuvo que haber un precursor de Nox5 antes de que se separasen evolutivamente. Durante este largo periodo de tiempo el gen de Nox5 se ha delecionado y duplicado. En plantas se han encontrado 10 genes con una actividad parecida a Nox5, pero en otros casos, como ocurre con los hongos y en roedores, en cambio, el gen se ha perdido [177]. Donde mayores diferencias existen con respecto a las demás Nox, es el extremo amino-terminal, lugar en el que se sitúan las regiones de unión a Ca^{2+} . Estos motivos también denominados como *EF-hand*, originalmente estaba constituido por una sola pareja como ocurre con las variantes Duox1 y 2. Sin embargo, tras la evolución, en mamíferos, esta pareja se ha duplicado, por lo que actualmente, Nox5 presenta 4 dominios de unión a Ca^{2+} [178].

El gen humano de Nox5 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 15 en posición q23. Abarca una región de 126 kb relativamente larga en comparación con otras enzimas Nox [178]. La **Figura I-12** representa esquemáticamente el gen de Nox5 gen y sus seis isoformas de mRNA. El gen consta de 18 exones de los cuales los dos primeros son no codificantes y están ubicados a una distancia considerable respecto a los exones codificantes. Se han descrito dos sitios alternativos para el inicio de la transcripción: un primer sitio para dos variantes de Nox5 (Nox5 β y Nox5 δ), y un segundo sitio aproximadamente a 85 kb que codifica para las isoformas Nox5 α y Nox5 γ . El codón de inicio de Nox5 β y $-\delta$ está situado en el exón 4, en el caso de las isoformas Nox5 α y Nox5 γ en el exón 3, para Nox5 ϵ en el exón 6 y para Nox5 ζ en el exón 1. Esto sugiere que hay dos promotores, uno antes del primer sitio de iniciación de la transcripción y el otro entre el primer y segundo sitio de iniciación de la transcripción (**Figura I-12**) [178]. Además, la transcripción de Nox5 sufre un proceso de corte

y empalme alternativo intraexon en el exón 6 que da como resultado 3 secuencias diferentes, una común para Nox5 α y β , otra para Nox5 γ y δ ; y el último para Nox5 ϵ . Los 12 últimos exones son comunes para las 6 isoformas [178].

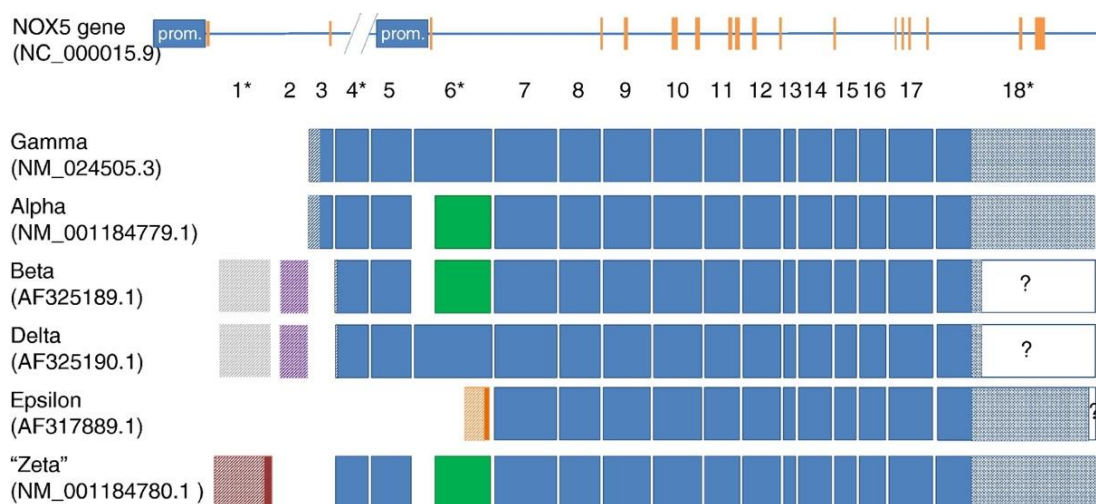


Figura I-12. Representación de las isoformas codificadas por el gen de Nox5 señalando la posición de los promotores y exones. Se detallan los exones presentes en cada isoforma de Nox5 causados por el *splicing* alternativo. Imagen tomada de Bedard K., Jaquetb V. y Krauseb K-H. [178].

Nox5 es un gen polimórfico, ya que presenta 442 SNPs (polimorfismo de nucleótido único) [178]. Estos cambios principalmente son debidos a la gran longitud de este gen, aunque esto no refleja la heterogeneidad funcional. Nox5 tiene 10 polimorfismos con una frecuencia mayor del 1% en la población y 5 de ellos incluso con una frecuencia mayor del 10%, pero sus efectos funcionales actualmente están en estudio.

Nox5 como hemos descrito anteriormente se expresa en humanos y en otras especies, pero cabe destacar la ausencia de este gen en el genoma de los roedores [175]. Esto ha dificultado el estudio de su relevancia funcional.

El gen de Nox5 fue descubierto en 2001 por Cheng G. et al. con una altísima expresión en tejido fetal, en estadios tempranos del desarrollo. Esto no significa que en tejido adulto no se exprese, de hecho, la expresión de este gen también fue detectada en bazo y útero [174]. Paralelamente, ese mismo año, Banfi et al. [173] confirmaron la expresión de Nox5, también, en nódulos linfáticos, linfocitos o espermatozoides. Con el transcurso de los años Nox5 ha sido detectado en células de otros tejidos como podocitos renales [179], endotelio [169], células musculares del endotelio [169] y monocitos [180]. Respecto a las isoformas de Nox5, podemos afirmar que la expresión depende mucho del tejido o células en estudio. En vasos sanguíneos las isoformas mayoritarias son Nox5 α y Nox5 β [169], en músculo liso de pulmón Nox5 β y Nox5 δ [169], mientras que en músculo liso de aorta son Nox5 α y Nox5 γ [181]. El endotelio umbilical, además de Nox5 β y Nox5 δ , también expresa Nox5 ϵ [169]. Otros estudios realizados en podocitos de riñón confirman que la isoforma mayoritaria es Nox5 β

[179], por el contrario, en células de carcinoma de Barret, Nox5ε es la única isoforma que se expresa [182].

5.2. Estructura y actividad de Nox5

La proteína humana de Nox5 todavía no se ha cristalizado, aunque sí se ha realizado la cristalización de los dominios centrales de un homólogo de Nox5 de cianobacteria, *Cylindrospermum stagnale* [143]. En ese trabajo se ha realizado el estudio *in silico* de los dominios FAD y grupos hemo con el fin de detallar cómo es la transferencia de electrones empezando del NADH hasta terminar donándolo al oxígeno [143].

Como hemos explicado anteriormente, Nox5 presenta pocas similitudes con respecto a Nox2 (27%) y al resto de variantes, aunque los elementos estructurales de transporte de electrones se mantienen. Éstos son los seis dominios transmembrana, dos grupos hemos con dos conjuntos de histidinas que enlazan con los dominios transmembrana 3 y 5, un dominio de unión a FAD y un motivo de unión a NADPH situado en la parte distal región del citoplasma carboxi-terminal (**Figura I-13**). Además de estos elementos, la secuencia Nox5 presenta varias características únicas que dan cuenta de algunas de sus propiedades bioquímicas. A diferencia de otras isoformas de Nox, Nox5 tiene un extremo amino-terminal que contiene cuatro motivos *EF-hand* [168] y un dominio polibásico (PBR-N), mientras que el carboxi-terminal contiene otro dominio polibásico (PBR-C) con una región rica en serinas que pueden ser fosforilables en Thr494 y Ser498 (con referencia a Nox5β), y una señal de consenso para un dominio de unión a calmodulina [175].

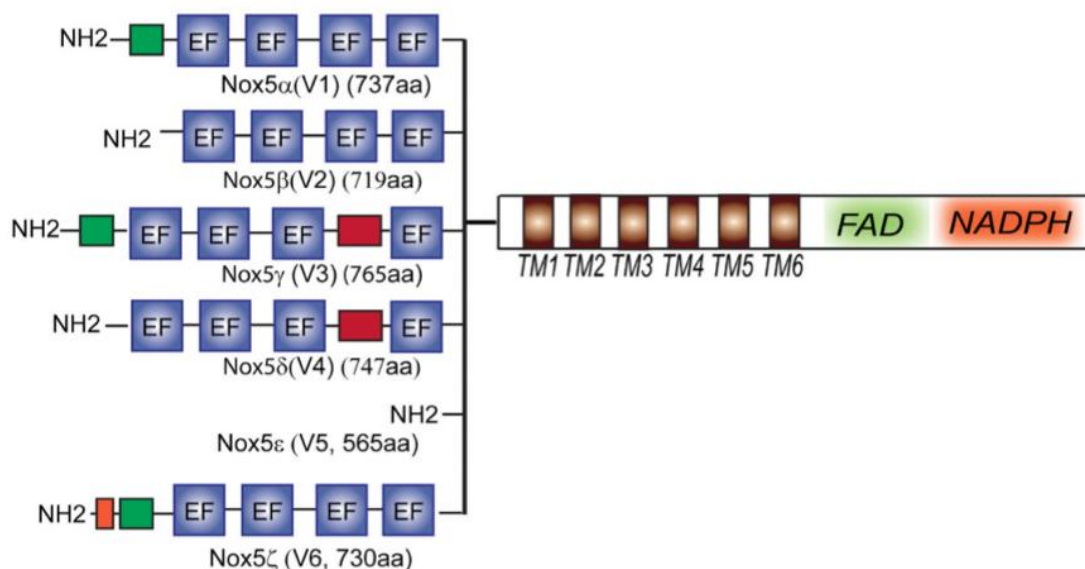


Figura I-13. Esquema que ilustra las diferencias en la región N-terminal de las 6 isoformas conocidas de Nox5. Imagen tomada de Chen F. et al. [183].

Las distintas isoformas de Nox5 presentan una similitud estructural muy grande a pesar del proceso de *splicing* alternativo distinto que sufren. Se ha visto que la mayoría de

las diferencias afectan a los dominios de unión a Ca^{2+} situados en el extremo amino-terminal (**Figura I 13**). Sin embargo, la isoforma Nox5 ϵ carece completamente de los cuatro motivos *EF-hands*, siendo la más corta de las isoformas Nox5 con 565 aminoácidos [183]. Por ese motivo, algunos autores denominan a Nox5 ϵ , como Nox5-S. Por el contrario, las demás isoformas al presentar la cola amino-terminal son conocidas como Nox5-L (**Figura I-14**).

Respecto a la actividad, Nox5, al igual que Nox1, Nox2 y Nox3, genera como producto final el $\text{O}_2^{\bullet-}$ [183]. Sin embargo, no todas las isoformas de Nox5 se regulan de la misma forma. Como hemos explicado anteriormente las isoformas Nox5-L, a diferencia de la Nox5-S, presentan los dominios de unión a calcio, por lo que en presencia de calcio van a activarse y generar $\text{O}_2^{\bullet-}$ que de forma espontánea va a dismutar y generar H_2O_2 . Muchos autores asumen que Nox5-S o Nox5 ϵ , al carecer de estos dominios sensibles a calcio, es una proteína inactiva [169], a pesar de que existen estudios donde se muestra su actividad y efectos funcionales [181,182].

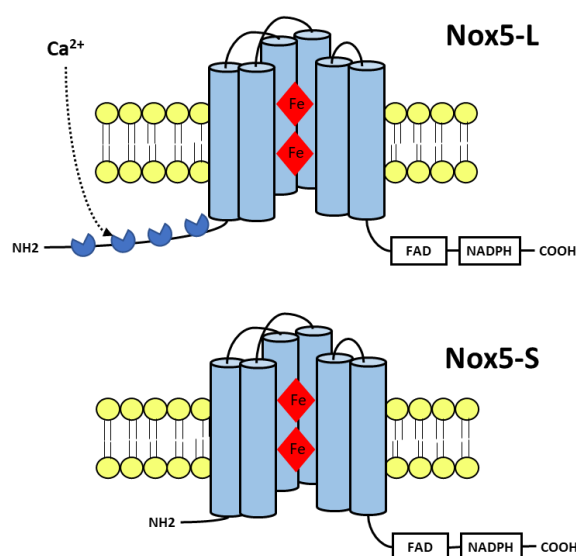


Figura I-14. Estructura de la isoforma larga (Nox5-L) y corta (Nox5-S) de Nox5. Las isoformas largas a diferencia de la corta o Nox5 ϵ , presentan 4 dominios de unión a Ca^{2+} .

5.3. Localización subcelular

La localización celular de las Nox varía de una variante a otra. En el caso de Nox5, al principio, la mayoría de los autores lo localizaban en membranas plasmáticas celulares, aunque BelAiba et al. [181] demostraron que el endotelio humano, en condiciones basales o tras sobreexpresar Nox5, esta variante se encontraba en retículo endoplasmático. De igual forma, en células de carcinoma de próstata sin transfectar y en fibroblastos de riñón transfectados con Nox5 fusionado a GFP, Nox5 fue localizado alrededor del núcleo confirmando que la localización de esta proteína es mayoritariamente perinuclear [184,185].

5.4. Inducción de Nox5

A pesar de que, como hemos dicho antes, la expresión en tejido adulto quizás no es tan alta como en tejido fetal, Nox5 es un gen que puede ser inducido por distintos agonistas.

Por ejemplo, la Ang II, al igual que induce la expresión de Nox1, 2 y 4, parece que también participa en la inducción de Nox5. En células musculares lisas de aorta humana Ang II es capaz de inducir de forma dosis dependiente la cantidad de mRNA y proteína de Nox5 [169]. Del mismo modo, Montezano et al. [170] en endotelio humano o Holterman et al. [179] en podocitos de riñón han demostrado que la Ang II induce un incremento en la expresión proteínica de Nox5 tras 24 h de tratamiento. Este aumento en la expresión de Nox5 genera un aumento en el estrés oxidativo celular que activa MAPK induciendo cambios en la proliferación [169].

Junto a Ang II, endotelina-1 (ET-1) es una citoquina que tiene gran importancia en el tejido vascular. Es capaz de inducir muchos cambios celulares entre los que destaca el aumento de ROS intracelular. Montezano et al. [170] han demostrado que ET-1 induce Nox5 en células endoteliales. Del mismo modo Pandey et al. [169] han descubierto el mismo fenómeno en células musculares lisas.

El interferón- γ (IFN- γ) también es un inductor de la Nox5. Algunos autores describen que esta citoquina induce Nox5-L en células musculares lisas. Este efecto parece estar mediado por factores de transcripción, como C/EBP, STAT1/3, NF- κ B o AP-1, que son capaces de unirse al promotor induciendo la expresión de este gen [166,186].

En adenocarcinoma de Barret el pH ácido induce la expresión de la isoforma corta de esta familia (Nox5 ϵ) y se cree que ese aumento es debido a que el ácido induce factores de transcripción como STAT5 [187] o CREB [182], que hacen que aumente la expresión de Nox5 en ese tipo celular.

5.5. Regulación de la actividad de Nox5

5.5.1. Regulación dependiente de calcio

El calcio es esencial para la actividad de Nox5 ya que en un tampón libre de calcio la cantidad de ROS generada es casi inapreciable [168,173]. Esto es debido a que esta proteína presenta 2 parejas de *EF-hands* en su extremo amino-terminal. La ocupación de los *EF-hands* por calcio desencadena un cambio conformacional en el extremo amino-terminal que promueve la interacción con una región carboxi-terminal facilitando así el flujo de electrones desde el NADPH al oxígeno por grupos hemo para la producción final de superóxido. A su vez, se cree que la región carboxi-terminal de Nox5 contiene un dominio autoinhibidor que restringe la actividad enzimática, y ha sido designado como el dominio regulador de unión a *EF-hands* (REFBD, aa 656-679 de la isoforma β). El extremo amino-terminal unido a calcio de Nox5 se une al REFBD y lo desplaza, eliminando la autoinhibición y facilitando la activación de la enzima [168,188]. Sin embargo, hay varios aspectos que no están claros en este modelo relativamente simple de activación enzimática. En primer lugar, la cantidad de calcio necesaria para activar completamente el Nox5 es bastante alta y, en segundo lugar, la

capacidad del Nox5 para producir ROS en condiciones en donde los niveles de calcio intracelular no cambian. Estas observaciones sugieren que mecanismos adicionales pueden influenciar la actividad de Nox5.

5.5.2. Fosforilación

Dado el rango de concentraciones de calcio intracelular que suele estar presente en la mayoría de las células, la activación de Nox5 es probable que sea ineficiente. Esto ha ayudado a la búsqueda de otras vías de regulación postraduccionales hasta que se demostró que PMA también activa a Nox5, de forma independiente a los cambios en el calcio intracelular. Además, el PMA potencia el efecto que el calcio presenta a la hora de activar esta proteína [184,189]. El mecanismo que subyace a esta activación es la fosforilación directa de Nox5 dentro de una región carboxi-terminal que contiene un grupo de serina y residuos de treonina (T512 y S516, para Nox5 α). La sustitución de estos residuos por alanina, que no puede ser fosforilada, atenúa la capacidad de la proteína quinasa C (PKC) para activar Nox5. Por el contrario, la mutación de estos residuos a aminoácidos cargados negativamente, que imitan la fosforilación, dio como resultado una enzima con mayor capacidad para generar ROS [184]. Dentro de la familia de PKC existen varias isoformas, pero entre ellas la que se cree que actúa es PKC α , ya que el silenciamiento genético de PKC α redujo la capacidad del PMA para activar Nox5 [190]. A su vez, PKC también puede activar quinasas secundarias, como la quinasa ERK9 [191].

Las vías dependientes de PKC no son las únicas vías de señalización que pueden inducir la fosforilación y aumentar la actividad de Nox5. De hecho, la capacidad de los ionóforos de calcio, como ionomicina, que estimulan la actividad de Nox5 puede reducirse mediante inhibidores de quinasas dependientes de calcio-calmodulina [192]. La calcio-calmodulina quinasa II (CAMKII) es capaz de activar directamente a Nox5 a través de la fosforilación de S493 (correspondientes a Nox5 α) [192]. Según predicciones realizadas al estudiar la proteína Nox5 existen otros sitios posibles de ser fosforilados y es probable que haya una multitud de quinasas más allá de lo descrito anteriormente, que puede afectar la activación de Nox5.

5.5.3. Interacción con otras proteínas

Desde que se descubrió la variante Nox5 se ha pensado que es una proteína que no necesita la presencia de otras proteínas para ser activada. Esto es debido principalmente a que se ha visto que Nox5 es independiente a la subunidad reguladora por excelencia de las Nox, p22^{phox} [193]. Aunque esta hipótesis sigue siendo cierta hoy día, desde entonces se han identificado varias proteínas que pueden modular la actividad o expresión de Nox5.

La primera proteína citosólica descrita que puede influir en la actividad de Nox5 fue calcio/calmodulina quinasa II [194]. La siguiente proteína en ser descrita fue la caveolina. La

caveolina-1 (Cav-1) es una proteína de membrana integral y es la proteína estructural principal de la caveola. Cav-1 se asocia y regula la actividad y la ubicación subcelular de numerosas moléculas de señalización. La importancia de Cav-1 se ha documentado en una serie de estados de enfermedad que incluyen aterosclerosis, inflamación, fibrosis e hipertensión pulmonar [195]. Estudios previos han demostrado que Cav-1 es necesaria para apoyar el acoplamiento de Nox2 [196]. Respecto a Nox5, Cav-1 se une directamente a esta proteína suprimiendo su actividad. Los datos experimentales indican que Cav-1 es necesaria para la activación óptima de las enzimas Nox, pero también que es un represor de la producción de ROS a través de la unión enzimática directa. De acuerdo con esto, en estados de enfermedad en los que hay una pérdida de expresión de Cav-1 pueden dar como resultado una mayor expresión y actividad de las enzimas Nox y una mayor producción de ROS, como se ha demostrado [197].

5.5.4. Chaperonas

Además de las proteínas anteriores, Nox5, y también Nox1-3, se unen a las chaperonas Hsp90 y Hsp70. Los inhibidores de Hsp90 reducen de manera significativa la actividad de Nox5 mientras que la inhibición crónica induce la degradación de la proteína Nox5 [198]. Los mecanismos por los cuales Hsp90 regula la actividad de Nox5 son desconocidos. Basándonos en otras proteínas reguladas por Hsp90, los posibles mecanismos son múltiples e incluyen el mantenimiento de la estructura terciaria, la inserción del grupo hemo, la localización subcelular o la regulación de la actividad de la quinasa. Así, Hsp90 puede tener un papel estructural coordinando la estabilidad de las regiones bucle extracelulares de Nox5 [147]. Respecto a Hsp70, se trata de una proteína que bloquea la actividad de Nox5, disminuyendo la producción de ROS por parte de Nox5 [183]. De hecho, Cheng et al. [147] han demostrado que la sobreexpresión de Hsp70 reduce la actividad de Nox5, mientras que su mutación lo incrementa.

Además, se ha demostrado que enfermedades como la inflamación, el cáncer y aterosclerosis, incrementan los niveles de Hsp90 o reducen los de Hsp70, aumentan la producción de ROS [199].

5.6. Relevancia fisiopatológica

Las Nox5, al igual que muchas variantes de la familia, parece tener gran importancia fisiopatológica. De hecho, se ha demostrado que Nox5 aumenta su expresión en la nefropatía diabética [179], en la aterosclerosis [200], en la hipertensión [170] y en el cáncer [201,202].

Holterman et. al. [179] han demostrado que Nox5 β está incrementado en biopsias de riñón de pacientes diabéticos. Por ello, obtuvieron un ratón transgénico que expresaba Nox5 en podocitos. Tras los experimentos observaron que los ratones que expresaban Nox5 generaban un aumento de ROS que indujo daño glomerular, fibrosis tubulointersticial y un

aumento de albuminuria. Los efectos, incluso, eran mayores en presencia de diabetes. Recientemente, Jha et al. [203] han confirmado en biopsias renales, que hay una expresión de Nox5 en glomerulos y que su expresión aumenta en la diabetes. Además, experimentos *in vivo* han demostrado que la sobreexpresión de Nox5 en células de músculo liso vascular y células mesangiales produce un aumento en la producción glomerular de ROS, glomeruloesclerosis, expansión mesangial y acumulación de proteínas de la ECM, así como una mayor infiltración de macrófagos [203]. Por tanto, este estudio y el anterior proporcionan evidencias de que Nox5 promueve la progresión de la nefropatía diabética.

Nox5 también parece estar relacionada con la enfermedad cardiovascular, ya que se ha demostrado su participación en la proliferación y angiogénesis del endotelio [181]. Además, en células del músculo liso vascular, Jay et al [171] han demostrado que la citoquina PDGF induce la expresión de Nox5 y un aumento de la generación de ROS, activación de las vías como JAK/STAT y, finalmente, un aumento de la proliferación celular.

Nox5 también se expresa en células musculares lisas vasculares provenientes de arterias coronarias y aorta humanas [171,204], y en células endoteliales [170]. Recientemente, Guzik et al. [200] han demostrado que, en arterias coronarias de pacientes con enfermedad de la arteria coronaria, los niveles de mRNA y proteína de Nox5 están aumentados, al igual que los niveles de ROS dependientes de calcio. En ese estudio, también se ha encontrado que en estadios iniciales de la aterosclerosis, el marcaje por inmunofluorescencia de Nox5 se localiza en el endotelio, mientras que en estadios avanzados en células de músculo liso vascular [200]. Asimismo, Nox5 parece estar implicada en la hipertensión. Yu. et al. [205] han confirmado que la expresión proteica de Nox5 en células de pacientes hipertensos es 5 veces mayor que en células de pacientes normotensos, y que la expresión génica para Nox5 es 3-4 veces mayor. Todos estos trabajos confirman la participación y la relevancia de Nox5 en las enfermedades cardiovasculares.

Además, se ha demostrado que las ROS dependientes de Nox5 también contribuyen a la iniciación de numerosos tipos de cáncer, como adenocarcinoma esofágico [182], cáncer de próstata [185,206], cáncer de mama [207], leucemia [208] o melanoma [206]. Estudios en adenocarcinoma esofágico de Barret sugirieron que el ácido regula la expresión de Nox5 a través del factor de transcripción CREB induciendo finalmente la proliferación celular [182]. Además, el mismo grupo han demostrado que uno de los genes implicados en la proliferación inducida por Nox5-S es la ciclooxigenasa-2 [209]. Por el contrario, el silenciamiento de Nox5-S en células de adenocarcinoma disminuye la producción de ROS, inhibe drásticamente la proliferación celular y promueve la apoptosis [182].

En cáncer de próstata uno de los inductores de la proliferación exacerbada son las ROS, aunque la fuente que las genera está poco estudiada. Estudios recientes han demostrado que existe un aumento en la expresión de Nox5 en cáncer de próstata humana y en las líneas celulares como LNCaP y DU145 [185]. En las células DU145, el silenciamiento

de Nox5 bloquea tanto la producción de ROS dependiente de calcio como la proliferación celular.

Otro tipo de cáncer que expresa Nox5 es la tricoluicemia o leucemia de células pilosas (HCL). Este cáncer se caracteriza por la sobreproducción crónica de linfocitos B malignos que contienen proyecciones membranosas delgadas (peludas). Kamiguti et al. [210] han visto que la producción de ROS en clones de células peludas (HCL) se correlaciona linealmente con el nivel de expresión de la proteína Nox5. Además, han demostrado que Nox5 está estrechamente asociado en la membrana celular con la fosfatasa, SHP-1, bloqueándola por las ROS generados, produciendo aumento de la fosforilación de tirosinas de las proteínas y finalmente induciendo un aumento de la proliferación celular. A partir de estos hallazgos, cada vez está más claro que Nox5 se expresa en muchos tipos de cáncer contribuyendo al aumento de la proliferación.

6. PAPEL DE LAS NOX EN LA FIBROSIS HEPÁTICA

Las Nox son una fuente de ROS predominante en células endoteliales, en células de Kupffer, en hepatocitos y en células estelares hepáticas (HSC) (**Figura I-15**). De hecho, las células endoteliales expresan principalmente Nox1, Nox2, Nox4 y Nox5 [211]; las células de Kupffer expresan Nox2 [212], mientras que los hepatocitos y HSC expresan Nox1, Nox2 y Nox4 [212]. Esta expresión basalmente es muy baja, pero las lesiones hepáticas crónicas inducen la expresión de estas proteínas amplificando señales intracelulares, remodelando los tejidos e induciendo, finalmente, la fibrosis posterior [24]. De hecho, el promotor del colágeno tipo I tiene sitios de unión a factores de transcripción que son sensibles a los productos de las Nox, principalmente al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [213]. Esto hace que el aumento de la expresión de Nox provoque un desequilibrio entre la generación de ROS y su eliminación y desencadene un aumento en la síntesis de colágeno de tipo I [24].

En el proceso patológico, existe una variedad de condiciones y citoquinas que contribuyen al aumento de la expresión de las Nox y por tanto, a la acumulación de ROS en el hígado [212]. Siendo más concretos, hay una liberación paracrina de citoquinas inflamatorias y profibrogénicas por parte de los hepatocitos, células de Kupffer o células del endotelio que activan las HSC quiescentes [212]. Del mismo modo, en el proceso de perpetuación (explicado en el apartado anterior), también, existe liberación de citoquinas, pero esta vez de forma paracrina y autocrina por parte las HSC [53]. En los dos procesos las citoquinas más importantes son el TGF- β y la Ang II y ambas tienen una estrecha relación con las Nox.

En HSC, TGF- β es la citoquina profibrogénica por excelencia y es el principal activador de las HSC [146]. Está demostrado que su señalización transcurre a través de la vía canónica y no canónica provocando un aumento en la síntesis de colágeno tipo I [146]. Durante este proceso de señalización, se ha demostrado que existe un aumento significativo del ROS

generado principalmente por las Nox. Sancho et al. [102] han confirmado que el TGF- β induce un aumento significativo de Nox4 a partir de las 24 horas en HSC. Además, el silenciamiento de Nox4 reduce los niveles de colágeno inducidos por la misma citoquina. Del mismo modo, Choi et al. [214] han confirmado que TGF- β induce la expresión de Nox1, Nox2 y Nox4 pudiendo ésta ser bloqueada por decusina, un compuesto natural. Los mecanismos por los cuales las Nox se inducen tras el tratamiento con TGF- β , no están claros. Algunos autores afirman que ocurre a través de Smad3 [215], a través de PI3K [216] o a través de la propia generación de ROS [100]. Sin embargo, todos estos trabajos muestran que el TGF- β induce las Nox, que aumenta, a su vez, los niveles de ROS y, finalmente, la síntesis de colágeno tipo I.

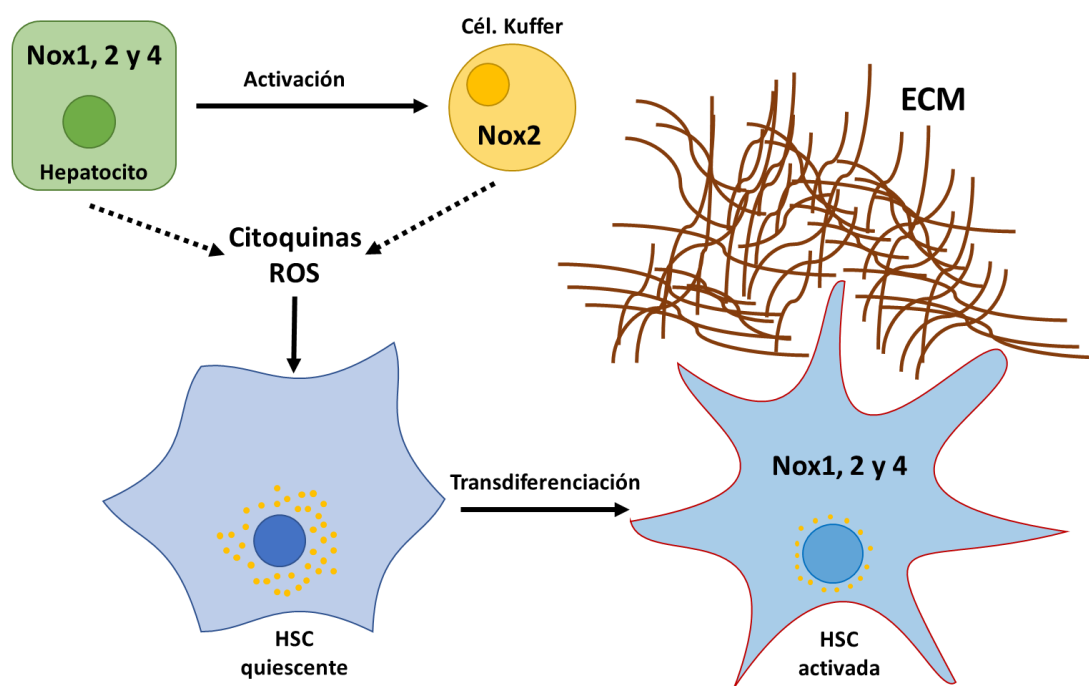


Figura I-15. Células y factores de crecimiento que inducen el proceso de activación de las HSC. Hepatocitos y células de Kupffer participan en la activación en el proceso de activación de las HSC secretando citoquinas o ROS generados por las Nox. En el caso de los hepatocitos expresan Nox1, -2 y -4, mientras que las células de Kupffer Nox2. Imagen modificada de Liang et al. [103].

La Ang II, del mismo modo que TGF- β , produce cambios significativos en las HSC, como aumento de la síntesis de colágeno tipo I, proliferación, secreción de TGF- β y aumento de ROS. Al igual que TGF- β , la Ang II induce un aumento de ROS por medio de Nox1, Nox2 y Nox4 [217,218]. De hecho, la deficiencia de Nox1 en HSC produce un menor aumento de la fibrosis y de inhibidores de las proteasas, como TIMP-1 [217]. Además, se ha demostrado que las subunidades reguladoras son claves para el aumento de ROS tras estimulación con Ang II. Por ejemplo, la deficiencia p47phox reduce las ROS producidas, al mismo tiempo que disminuye la proliferación, migración y activación de la vía MAPK [120]. Por tanto, estos trabajos confirman la función esencial que cumplen las Nox en la señalización y en los efectos provocados por la Angiotensina II.

Respecto a los ensayos realizados *in vivo*, los modelos más empleados para el estudio de la fibrosis hepática son dos: roedores tratados con tetracloruro de carbono o la ligadura del conducto biliar. El primero de ellos es el modelo por excelencia para el estudio de la fibrosis hepática, mientras que el segundo se parece más a la colestasis humana. Ambos modelos inducen la fibrosis en el hígado produciendo un aumento de los niveles de colágeno tipo I [120,219].

Con el fin de determinar la relevancia que presentan las Nox en esta enfermedad, algunos autores han realizado deleciones de los genes de Nox1 y Nox4 observando que esta deficiencia atenuaba el daño hepático, la inflamación y la fibrosis después de haber sido inducidos por CCl₄ [220]. Por si fuera poco, la deleción de estos genes produce una menor expresión de genes inflamatorios y proliferativos en HSC activadas [220,221]. A su vez, Paik et al. [218] han creado ratones *Knock-out* (KO) para Nox1 y Nox2 que han sido tratados con CCl₄ o han realizado la ligadura del conducto biliar a los ratones para simular la enfermedad. La deleción de estos genes reduce los niveles de ROS, de colágeno tipo I, de α -SMA y de TIMP-1 [218]. Además, HSC extraídos de ratones deficientes para Nox1 y Nox2, muestran menor capacidad de secreción de TGF- β y TIMP-1 y menores niveles de colágeno tipo I, todo ellos tras ser estimulados con Ang II. De Minicis et al. [222] han descubierto que el KO para p47^{phox} en ratones tratados con CCl₄ o con ligadura del conducto biliar, reduce los niveles de colágeno tipo I y α -SMA en ambos casos. Corroborando, de nuevo, el papel de las Nox en la fibrosis hepática.

En resumen, parece claro que en la fibrosis hepática las Nox producen ROS induciendo la apoptosis de los hepatocitos y la activación de células de Kupffer, consecuentemente secretando factores de crecimiento y radicales que provocan la transdiferenciación de las HSC quiescentes en miofibroblastos, y por tanto el aumento de la síntesis de colágeno tipo I.

En lo que respecta a Nox5 en la fibrosis hepática la información es escasa. Esto se debe, en gran medida, a la ausencia de este gen en el genoma de roedores, y por ello hasta hace poco no han existido modelos que reproduzcan la función de Nox5 en la fisiología humana. A pesar de ello, en 2012 Muffak-Granero et al. [223] publicaron un estudio donde demostraban que entre el gran número de genes alterados, la expresión de Nox5 en sangre periférica de pacientes cirróticos se duplicaba. Además, recientemente, Eun et al. [224] han observado que además de Nox1, Nox4, Duox1 y Duox2, la expresión de mRNA de Nox5 también se ve aumentada en muestras de pacientes con hepatocarcinoma.

La escasa información existente acerca de Nox5 y la necesidad de conocer en profundidad los mecanismos que subyacen a la fibrosis hepática incitan a estudiar la relación existente entre la enzima Nox5 y enfermedad de la fibrosis hepática para facilitar el diagnóstico temprano y el tratamiento.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta que la expresión de Nox5 está aumentada en sangre periférica de pacientes cirróticos [223] y en muestras de pacientes con hepatocarcinoma [224], que las NADPH oxidasas están alteradas en la fibrosis hepática y el papel clave de las HSC en esta enfermedad, la hipótesis que nos planteamos fue la siguiente: Nox5 participa en la generación de ROS y en el desarrollo de la fibrosis en células estelares hepáticas humanas activadas.

2. OBJETIVOS

A partir de la hipótesis el objetivo general fue la caracterización y el estudio funcional de la Nox5 en células estelares hepáticas. Para ello, los objetivos específicos planteados fueron:

1. Determinar qué variantes las NADPH oxidasas (Nox) se expresan en la línea humana de células estelares hepáticas (HSC), LX-2.
2. Caracterizar qué isoformas de Nox5 se expresan en LX-2 y validarlos por silenciamiento a nivel de mRNA y proteico.
3. Medir la producción de ROS y proliferación tras sobreexpresar Nox5 en HSC humanas.
4. Determinar si las citoquinas profibrogénicas afectan a la expresión de Nox5 en LX-2.
5. Estudiar la posible participación de Nox5 en la síntesis de colágeno de tipo I en HSC humanas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. Líneas celulares empleadas

Se emplearon 3 líneas celulares: CFSC-2G, LX-2 y HEK 293T. Las características de cada una de ellas se detallan en la **Tabla M-1**. La línea CFSC-2G es un clon derivado de una rata Wistar macho tratado con CCl_4 para inducir cirrosis, obtenido en el laboratorio del Dr. Rodkjing [225]. Las células LX-2, en cambio, son células hepáticas estelares humanas inmortalizadas con el antígeno T del virus SV40 (Ref. SCC064, Merck Millipore). La tercera, HEK 293T, es un tipo de línea celular transformada que deriva de preparaciones de riñón humano embrionario.

Tabla M-1. Características de las líneas celulares empleadas.

Línea celular	Organismo	Tipo celular	Tejido	Propiedades de cultivo	Referencia
CFSC-2G	Rata	Célula estrellar	Hígado	Adherente	Donado por Dr. Rodkjing
LX-2	Humano	Célula estrellar	Hígado	Adherente	SCC064, Millipore
HEK 293T	Humano	Célula embrionaria	Riñón	Adherente	CRL-3216, ATCC

1.2. Mantenimiento del cultivo celular

Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C, 5% CO_2 y 95% de humedad relativa hasta preconfluencia en frascos de cultivo de 75 cm^2 (Nunc Internacional) con 12 ml de medio de cultivo en un Sterile-Cycle CO_2 Incubator (Thermo, Rockfort, IL, USA).

Para el cultivo celular se empleó suero fetal bovino (FBS, ref. 31095-029, Gibco, Thermo, Rockfort, IL, USA) que fue previamente descomplementado por calor (56 °C) durante 30 min en agitación. A su vez, los medios fueron complementados con dos antibióticos, penicilina y estreptomycin (P/S, ref. 15140, Gibco, Thermo, Rockfort, IL, USA). Todos los suplementos se esterilizaron por filtración a través de filtros de celulosa de 0,22 μm de diámetro de poro (Sartorius Stedim Biotech).

Las CFSC-2G se cultivaron en MEM (Minimum Essential Medium 1x, ref. 31095-029, Gibco, Thermo, Rockfort, IL, USA) complementado con FBS 10% (v/v), P/S (P/S 100x: 10.000 U/ml penicilina y 10 mg/ml de estreptomycin) 1% (v/v) y aminoácidos no esenciales (NEAA 100x, ref. BE13-114E, BioWhittaker, Lonza) 1% (v/v). Al llegar al 85% de confluencia, las células adherentes se despegaron con 1,5 ml de tripsina de páncreas porcino (13,000-20,000

U/mg, ref. T0303G, Sigma, St. Louis, MO, USA), añadiéndolo, extendiéndolo sobre todo el frasco y eliminándolo rápidamente. Después, el frasco, tratado con tripsina, se introdujo durante 3-4 min en el incubador para terminar de despegar las células del fondo del frasco. Una vez pasado el tiempo, los frascos se visualizaron a contraluz, hasta ver que las células estaban sueltas. En caso contrario, la incubación se alargó 1-2 min más. Finalmente, la tripsina se neutralizó empleando medio completo. El volumen del medio completo varió según tipo celular y la dilución a realizar. En el caso de las células CFSC-2G se sembraron a una dilución 1:20.

Las células LX-2 se mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ref. 41965-039, Gibco, Thermo, Rockfort, IL, USA) complementado con FBS 2% (v/v) y P/S 1% (v/v) a 37 °C y 5% de CO₂. Este medio lo denominaremos medio completo a partir de ahora. El medio se cambió cada 3-4 días y, al alcanzar 85% de confluencia las células se tripsinizaron siguiendo los mismos pasos que con las células CSFC-2G, pero esta vez con una tripsina que contiene EDTA (Ref. 25200-056, Gibco, Thermo, Rockfort, IL, USA). La dilución empleada al pasar fue de 1:3.

Las células HEK 293T se mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ref. 41966-029, Gibco, Thermo, Rockfort, IL, USA), complementado con FBS 10% (v/v) y P/S 1% (v/v). El medio se cambió cada 3-4 días y al alcanzar la confluencia las células se tripsinizaron siguiendo los pasos explicado anteriormente (Ref. 25300054, Gibco, Thermo, Rockfort, IL, USA). Las células fueron sembradas empleando una dilución 1:3 al pasar.

1.3. Subcultivo y congelado de las células

Tras analizar la confluencia, las células se tripsinizaron siguiendo las indicaciones explicadas en el apartado anterior. Una vez despegadas, se añadieron 9 ml de medio completo al frasco de cultivo arrastrando todas las células para luego centrifugar a 450 x g (1400 r.p.m.) durante 4 min en una centrífuga Allegra™ X-12R (Beckman Coulter). A continuación, las células se contaron empleando una cámara de Neubauer en un microscopio de contraste de fases (Olympus CK2). La cantidad de células sembradas varió según la finalidad de experimento y el tipo celular. La **Tabla M-2** muestra la cantidad de células sembradas para experimentos de extracción de proteína o mRNA y para cada tipo de placa de cultivo.

Los primeros pases celulares se aprovecharon para crecer, congelar y hacer un gran stock de células (2x10⁶ cel/tubo). Para ello, las células HEK 293T fueron congeladas en 5% (v/v) DMSO en medio completo en criotubos. Las LX-2, en cambio, fueron congeladas en DMEM con FBS 20% (v/v) y DMSO 10% (v/v). Respecto la línea CFSC-2G, la congelación se realizó en MEM con 8% (v/v) FBS y 8% (v/v) glicerol. Todos los criotubos se mantuvieron en el Mr. Frosty Freezing Container en el congelador de -80 °C durante 24 h y a continuación se guardaron en el congelador de -140 °C.

La descongelación celular se llevó a cabo manteniendo el vial durante 5 min a 37 °C. El contenido del vial se vertió en tubo de 15 ml donde se añadieron, suavemente, 10 ml de medio completo. A continuación, se centrifugó a 450 x *g* (1400 r.p.m) y se eliminó el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspendió en 8 ml de medio completo (para las LX-2 se utilizó DMEM FBS 10% (v/v) y P/S 1% (v/v)) el cual se vertió íntegramente en un frasco de 25 cm² hasta el siguiente pase.

Tabla M-2. Cantidad de células LX-2 sembradas por placa o pocillo.

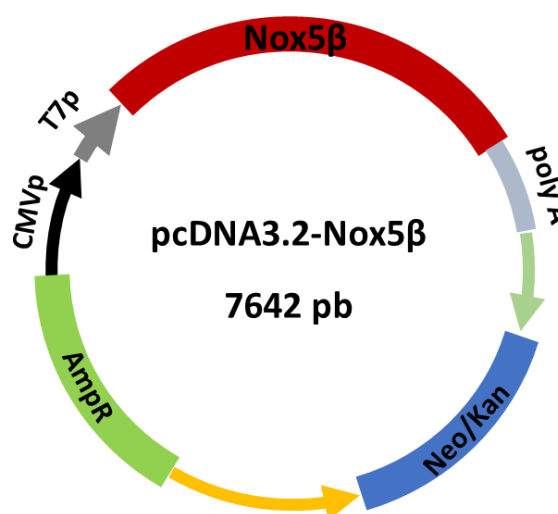
Tipo celular: LX-2	Área de superficie (mm ²)	nº cel./mm ² al sembrar	nº cel./poc.	nº de cel./placa en confluencia	ml de medio
Placa					
60 mm	2820	195	550.000	1.5 x 10 ⁶	5
Placa de cultivo					
6 poc	1000	200	200.000	650 x 10 ³	2
12 poc	400	200	80.000	270 x 10 ³	2
24 poc	200	200	40.000	133 x 10 ³	1
96 poc	33,5	300	10.000	35 x 10 ³	0,2

2. GENERACIÓN Y TRANSFECCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS

2.1. Estructura del plásmido pcDNA3.2-NOX5β

El plásmido pcDNA3.2-NOX5β (AF325189) que expresa la isoforma β de Nox5, fue proporcionado por el Dr. Guillermo Zalba. El origen de este plásmido era un vector lanzadera (ORFEXPRESS-Shuttle clone, GC-E1558, GeneCopeia) el cual se subclonó en otro vector de expresión pcDNA3.2 (Thermo, Rockfort, IL, USA) generando así el nuevo vector pcDNA3.2-Nox5β.

Figura M-1. Descripción gráfica del plásmido pcDNA3.2-Nox5β. En esta figura se exponen los principales elementos que posee el plásmido: CMVp, Promotor de CMV; T7p, Promotor del bacteriófago T7; Nox5β, gen de Nox5β; polyA, señal de poliadenilación; Neo/Kan, gen de resistencia a Neomicina y Kanamicina; AmpR, gen de resistencia a Ampicilina.



Este plásmido de 7642 pb está compuesto por el vector de expresión pcDNA3.2-GW y la isoforma Nox5 β del gen Nox5. Los elementos principales de este vector se muestran en la **Figura M-1**. La secuencia de este vector se muestra en el **Anexo 1**.

2.2. Generación del plásmido pcDNA3.2-Nox5 ϵ

El plásmido pcDNA3.2-Nox5 ϵ se generó a partir del vector pcDNA3.2-Nox5 β mediante enzimas de restricción y subclonado convencional como se muestra en Resultados. La secuencia nucleotídica fue validada por enzimas de restricción y por secuenciación bidireccional realizado por la Unidad de Secuenciación del servicio de genómica de la Universidad de Navarra. La secuencia de este vector se muestra en el **Anexo 2**.

2.2.1. Transformación bacteriana de XL1-BLUE con pcDNA-Nox5 β

Para la obtención de pcDNA3.2-Nox5 β a gran escala, se procedió a la transformación de la cepa XL1-BLUE supercompetente E.coli (ref. 200236, Agilent Technologies), siguiendo el protocolo del fabricante. En un tubo Corning se añadieron 100 μ l de bacterias, 1,7 μ l de β -mercaptoetanol 1,42 M y 5 ng de nuestro plásmido. Esta mezcla se incubó durante 30 min en hielo y posteriormente se calentó a 45 °C durante 42 s para someter las bacterias a un choque térmico. Se incubó otra vez en hielo durante 2 min, se añadió 1 ml de medio LB (Luria-Bertani, bacto triptona 1% (p/v), extracto de levadura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v), pH 7) y se mantuvo en agitación vigorosa a 37 °C durante 1 h. Posteriormente, se sembraron 150 μ l de la transformación en una placa de LB agar con ampicilina (50 μ g/ml) que se incubó toda la noche a 37 °C.

2.2.2. Realización de cultivo líquido y Maxiprep

Tras el crecimiento de las colonias bacterianas en las placas LB agar, se inoculó una en un tubo de 50 ml con 5 ml de medio LB y ampicilina (50 μ g/ml), y se dejó en agitación durante 8 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se preparó una dilución 1:500 del cultivo anterior en 250 ml de medio LB con ampicilina y se volvió a dejar en agitación vigorosa a 37 °C durante 12-16 h. A continuación, se realizó la extracción del plásmido siguiendo el protocolo de Endofree Plasmid Maxi Kit (ref. 12362, QIAGEN). Tras la Maxiprep, se obtuvieron 150 μ l del plásmido pcDNA3.2-Nox5 β a una concentración de 4,5 μ g/ μ l. El plásmido obtenido se envió a secuenciar a la Unidad de Secuenciación del servicio de genómica de la Universidad de Navarra para comprobar que se trataba de la secuencia esperada.

2.2.3. Digestión enzimática con endonucleasas de restricción y ligación

A partir del plásmido pcDNA3.2-Nox5 β se aislaron por un lado el vector de expresión (pcDNA3.2) y por otro el inserto (Nox5 ϵ), siguiendo dos estrategias con enzimas de restricción distintas como se muestra en Resultados. Todo ello, con el objetivo de construir el plásmido de interés a partir de la ligación de ambas partes.

Las enzimas empleadas para el aislamiento del vector de expresión fueron BsrGI (ref. R0575S, New England Biolabs), el fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I (ref. M0210L, New England Biolabs), XhoI (ref. R0146S, New England Biolabs) y CIP (ref. M0290S, NE New England Biolabs). En cambio, para el aislamiento de Nox5 ϵ se utilizaron EcoICRI (ref. R6951, ProMega), XhoI y SacII (ref. R0157, New England Biolabs).

La primera digestión de cada estrategia (BsrGI y EcoICRI) se realizó en un volumen total de 200 μ l que incluía 20 μ l de NEBuffer 10 \times (el correspondiente a cada enzima), 20 μ l BSA 10 \times (en caso de requerirlo), 15 μ g del plásmido Nox5 β y 2 U/ μ g de enzima, completado con agua destilada estéril. Las digestiones se incubaron durante 4 h a 37 $^{\circ}$ C. Para la purificación y concentración de los fragmentos obtenidos tras las digestiones, se empleó QIAquick PCR Purification Kit (Ref. 28104, QIAGEN), eluyendo un volumen total de 40 μ l. Las digestiones sucesivas de cada estrategia se realizaron bajo las mismas condiciones, pero utilizando los 40 μ l eluidos en el paso de purificación anterior.

Para la reacción de polimerización con el fragmento Klenow, aparte de lo mencionado anteriormente, se añadieron dNTPs a una concentración de 50 μ M, 1 U/ μ g de enzima y la incubación se realizó a 25 $^{\circ}$ C durante 1 h. En el caso de CIP, se empleó 1 U/ μ g y la incubación fue de 30 min a 37 $^{\circ}$ C. Tras el aislamiento del vector de expresión y el inserto Nox5 ϵ por separado, se procedió a la ligación de ambos para obtener el plásmido pcDNA3.2-Nox5 ϵ . La ligación se realizó mediante la DNA Ligasa T4 (Ref. 15224017, Invitrogen), añadiendo 1 μ l de enzima (stock 1 U/ μ l). Se realizaron ligaciones 1:1 y 1:3 (proporción vector:inserto). En la ligación 1:1, se añadieron 50 ng de ambos en un volumen total de 10 μ l que incluía 2 μ l de búfer ligasa 5x y 1 μ l de ligasa T4 DNA. En la ligación 1:3, se añadieron 50 ng del vector y 150 ng del inserto en un volumen total de 15 μ l que incluía 3 μ l de búfer ligasa 5x y 1,5 μ l de ligasa T4. Como control negativo se utilizó el inserto solo (Nox5 ϵ) y como control positivo el plásmido pcDNA3.2-Nox5 β . Las ligaciones se dejaron a 16 $^{\circ}$ C durante toda la noche.

Tras la ligación, se midió espectrofotométricamente la concentración de plásmido obtenido con NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, y con éste se realizó la transformación bacteriana de XL1-BLUE. Se seleccionaron ciertas colonias y se realizó la extracción de DNA de las mismas mediante QIAprep Miniprep (Ref. 27104, QIAGEN) siguiendo el protocolo correspondiente.

2.2.4. Secuenciación de los plásmidos obtenidos

Como se ha citado anteriormente, el plásmido de partida y el obtenido a partir del subclonado se secuenciaron para validar y conocer en detalle los métodos de sobreexpresión. Para la secuenciación del plásmido pcDNA3.2-Nox5 β se emplearon 7 cebadores distintos (secuencias en la Tabla M-3) con una distancia media entre ellos de 500 pb (Figura M-2). Sin embargo, en la secuenciación del plásmido pcDNA3.2-Nox5 ϵ se utilizaron los mismos cebadores excepto el hNox5 Sec P3 FW, ya que el plásmido de esta isoforma carece de ese fragmento.

La secuenciación bidireccional fue realizada por la Unidad de Secuenciación del servicio de genómica de la Universidad de Navarra.

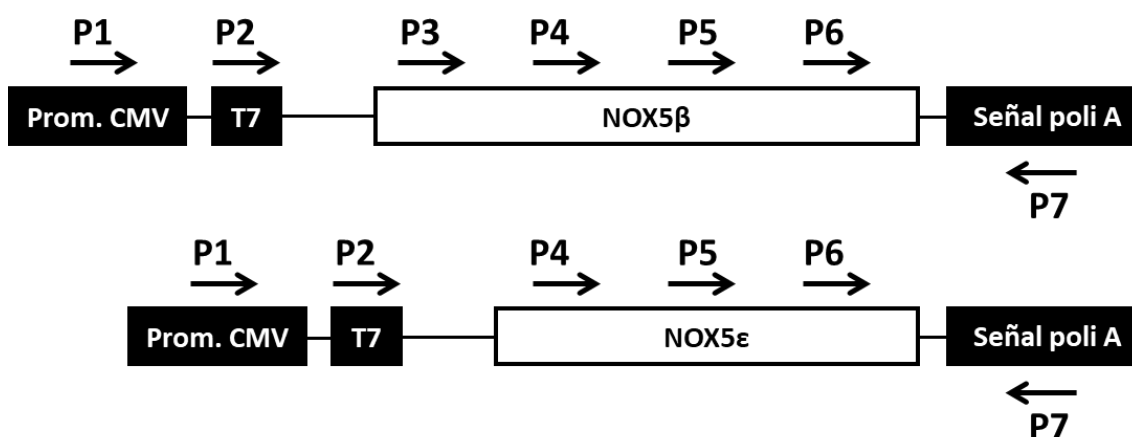


Figura M-2. Localización de los cebadores utilizados para la secuenciación de Nox5 β y Nox5 ϵ .

Tabla M-3. Cebadores utilizados durante la secuenciación. La posición de referencia corresponde a la isoforma Nox5 β .

Nombre de los cebadores	Secuencia (5' – 3')	Orientación	Posición desde el ATG
hNox5 Sec P1 FW	CCAGTATCTGCTCCCTGCTT	Forward	-849 pb
hNox5 Sec P2 FW	TGACGTCAATGGGAGTTTGT	Forward	-532 pb
hNox5 Sec P3 FW	TCCTTCTTGCAGAGCGATT	Forward	+120 pb
hNox5 Sec P4 FW	CAGTGCCTCAACTTCGACTG	Forward	+684 pb
hNox5 Sec P5 FW	TATGAGTGGCACCCCTTCAC	Forward	+1320 pb
hNox5 Sec P6 FW	CGGTCTTTCGAGTGGTTTGT	Forward	+1791 pb
hNox5 Sec P7 RV	TCCTCCGTGTTTCAGTTAGC	Reverse	+2330 pb

2.3. Transfección de las células con los plásmidos

Los plásmidos empleados en este trabajo fueron el pcDNA3-EGFP, pcDNA3.2-Nox5 β y pcDNA3.2-Nox5 ϵ . pcDNA3-EGFP fue generosamente proporcionado por el Dr. Golenbock a través de Addgen (ref.13031), mientras que pcDNA3.2-Nox5 β por el Dr. Guillermo Zalba. Para la sobreexpresión de estos plásmidos, se siguieron las recomendaciones obtenidas a partir del protocolo de lipofectamina 2000 (Ref. 11668019, Invitrogen).

Las transfecciones se realizaron en distintas placas de cultivo celular dependiendo del ensayo funcional que se iba a realizar a continuación. Por ello, las condiciones para cada situación varían un poco. En la **Tabla M-4** se detallan las condiciones que se emplearon para cada tipo de placa.

Tabla M-4. Detalles de las transfecciones según el tipo de placa empleada.

DETALLES DE LAS TRANSFECCIONES SEGÚN TIPO DE PLACA EMPLEADA					
Componentes		96 poc	24 poc	6 poc	p60
Células sembr.		10.000	40.000	150.000	300.000
Preparar Mix A y B por separado y por los pocillos necesarios. Relación plásmido:lipofectamina 1:3					
Mix A	OptiMEM	5 μ l	25 μ l	125 μ l	250 μ l
	Lipo2000 (1 μ g/ μ l)	300 ng	1,5 μ g	7,5 μ g	15 μ g
Mix B	OptiMEM	5 μ l	25 μ l	125 μ l	250 μ l
	Plásmido	100ng	500 μ g	2,5 μ g	5 μ g
Mezclar Mix A y B e incubar durante 5 min a temperatura ambiente. Paralelamente añadir la siguiente cantidad de medio a cada pocillo.					
Medio 0% FBS y 0% P/S		100 μ l	500 μ l	2 ml	5 ml
Añadir la siguiente cantidad de mezcla Mix A-B a las células					
Mix A-B		10 μ l	50 μ l	250 μ l	500 μ l

Una vez elegida la placa, se sembraron las células con medio completo y dejamos que se adhiriesen durante 24 h a 37 °C. El día siguiente, después de descongelar los reactivos, se prepararon dos mezclas (A y B) por separado. La mezcla A contiene OptiMEM y lipofectamina 2000, mientras que la mezcla B, OptiMEM y el plásmido de interés. Una vez preparadas las dos mezclas, se juntaron las dos preparaciones con vortex y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Paralelamente, se eliminó el medio completo y se sustituyó por medio sin FBS y P/S. A continuación, se añadió la mezcla gota a gota a las células y se agitó la placa una vez terminada la operación. Por último, las células se incubaron durante 3 h a 37 °C en el incubador y pasado el tiempo se sustituyó ese medio por medio completo. Las células transfectadas se dejaron otros 21 o 45 h más en el incubador hasta su posterior experimento funcional.

3. PRODUCCIÓN DEL ADENOVIRUS NOX5 β

Los adenovirus son virus de doble cadena de DNA (30-40 kb) con una cápside no recubierta de 70-90 nm. Los adenovirus recombinantes son una herramienta muy útil para la inserción y expresión de DNA hasta de 7,5 kb con gran estabilidad genética y poca patogenicidad. Además, no alteran el material genético de huésped ya que no se inserta en su DNA manteniéndose en el citosol.

La generación y producción del adenovirus Nox5 β (AdNox5 β) fue realizada por el Dr. Álvaro Pejenaute durante su etapa como estudiante de máster y doctorado. El Adenovirus Nox5 β (AdNox5 β) fue generado siguiendo el protocolo de AdEasy XL Adenoviral Vector System Kit (Agilent Technologies catalogue number 240010). El virus resultante es un adenovirus de primera generación con serotipo 5. Brevemente, primero, el gen Nox5 β se extrajo del plásmido pcDNA3.2-Nox5 β que fue introducido en una vector *shuttle*. Más tarde, dentro de las bacterias se dio una recombinación homóloga entre el vector lanzadera o *shuttle* que contiene el gen de Nox5 β y el vector AdEasy XL (**Figura M-3**). A continuación, el plásmido resultante se amplificó, linearizó obteniendo el DNA viral y finalmente se transfectó en células empaquetadoras para obtener AdNox5 β .

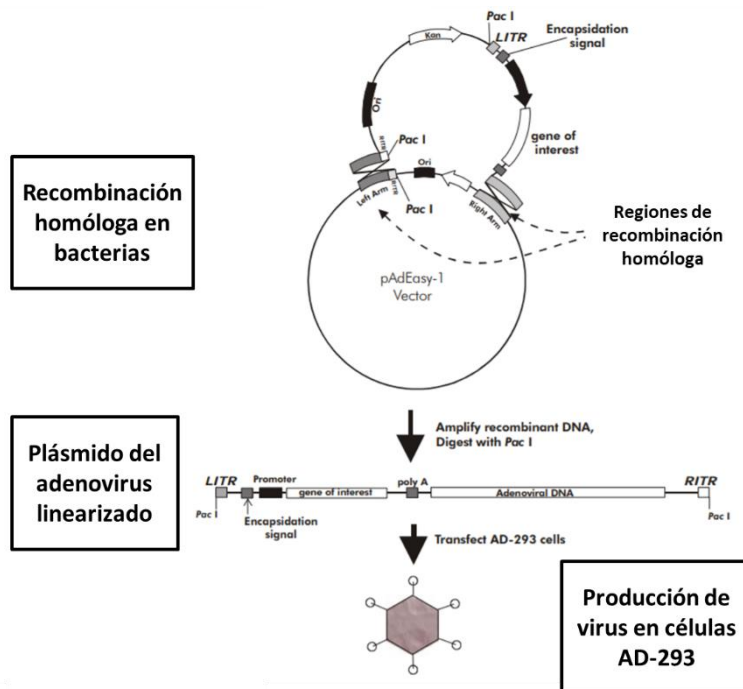


Figura M-3. Producción de adenovirus recombinante utilizando el sistema de vector adenoviral AdEasy XL. Esquema con las fases más importantes de la producción del AdNox5 β : Recombinación homóloga realizada en bacterias, linearización del plásmido y producción de los adenovirus en células AD293. Imagen tomada de Aligent Technologies.

4. SILENCIAMIENTO MEDIANTE RNA DE INTERFERENCIA

Los siRNA empleados en este trabajo fueron seleccionados mediante dos softwares: i-Score Designer y siRNA Scales con la ayuda del Dr. Fernando de Miguel. Score Designer (https://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/i_Score/i_score.html), requiere introducir

la secuencia de nucleótidos del gen de interés. A continuación, el programa devuelve un listado de posibles siRNAs con distintos valores o parámetros. Entre todos ellos, debemos elegir los siRNAs que contengan un valor Reynolds mayor o igual a 7, además de un valor de DSIR mayor que 90.

Paralelamente, realizamos lo mismo con el otro software, siRNA Scales (http://gesteland.genetics.utah.edu/siRNA_scales/), es decir, introducir la secuencia nucleotídica de interés y analizar el listado de siRNAs que la aplicación proporciona. En ese análisis, debemos fijarnos en la eficiencia predicha por el programa y elegir las que tengan un valor menor de 10.

A continuación, para decidir cuál es el mejor siRNAs, tenemos que comparar los dos listados y elegir los que coincidan y tengan mayor valor Reynolds, valor DSIR y mejor de eficiencia obtenida por siRNA scales. Finalmente, con los siRNAs elegidos fueron sintetizados por Sigma Aldrich para su posterior análisis. Es conveniente sintetizar por lo menos 2-3 siRNAs diferentes y luego probar su eficacia.

Para el estudio funcional de Nox5, se utilizaron siRNAs como método de silenciamiento de este gen. A su vez, como control de la técnica se utilizó un siRNA o *scramble* (SCR) el cual no tenía efecto funcional en nuestras células. Los siRNAs utilizados fueron los siguientes:

- siNOX5₁: 5'-GGAGUGUGACAAUGAGAAAUC-3'
- siNox5₂: 5'-GACCUGGUGACUACUUGUAUA-3'
- SCR: 5'-ACGACACGCAGGUCGUCAU-3'

El protocolo para las transfecciones se basó en las recomendaciones dadas por el fabricante de la Lipofectamina 2000 (Ref. 11668019, Invitrogen). Las condiciones concretas varían según la placa en la cual hemos sembrado nuestras células.

En este trabajo las placas empleadas en las transfecciones fueron la placa de 6 pocillos y las placas de 60 mm (P60). En las placas de 6 pocillos se sembraron 150.000 cel/poc con 2 ml de medio completo. Al día siguiente, después de descongelar los reactivos necesarios se procedió con la transfección. Se prepararon dos mezclas, Mix A y B, por separado. La mezcla A contenía 125 µl de OptiMEM y 2,5 µg de Lipofectamina 2000 (1 mg/ml), mientras que la mezcla B 125 µl OptiMEM y 150 pmol siRNA de interés (20 µM). Una vez preparadas las dos mezclas, se mezclaron las dos preparaciones con vortex y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Paralelamente, se eliminó el medio completo y se sustituyó por 2 ml de medio sin FBS y antibiótico. A continuación, se añadieron los 250 µl de la mezcla gota a gota a las células y se agitó la placa una vez terminada la operación. La concentración final de siRNA fue de 30 nM. Por último, las células se incubaron durante 3 h a 37 °C en el incubador y pasado el tiempo se sustituyó ese medio por medio completo. Las células transfectadas se dejaron en el incubador por lo menos otras 21 h más. Para las

transfecciones realizadas en placa de 60 mm los volúmenes y cantidades empleadas se multiplicaron por dos.

5. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD NOX

5.1. Producción extracelular de peróxido de hidrógeno

Para medir la cantidad de H₂O₂ extracelular producido tras las transfecciones realizadas en placas p96 con 15.000 cel/poc, se utilizó el kit de Amplex Red (Ref. A22188, Thermo, Rockfort, IL, USA). Con el fin de rebajar costes se empleó la misma sonda, pero proporcionada por otra casa comercial (Ampliflu, ref. 90101, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). En presencia de H₂O₂ la peroxidasa de rábano (HRP) oxida el Amplex red produciendo un compuesto fluorescente rojo, la resorufina, el cual presenta un máximo de excitación a 571 nm y un máximo de emisión a 585 nm.

Antes de comenzar debemos prepara Amplex red 10 mM, PMA 20 µM y ionomicina 1 mM. Para ello, los 5 mg del vial de Amplex red se disolvieron en 2 ml de DMSO para dejarlo a una concentración de 10 mM. Esta solución se alicuotó en alícuotas de 60 µl en tubos opacos y éstos se guardaron a -20 °C hasta su uso. A continuación, se disolvió 1 mg PMA en 65 µl de DMSO dejándolo a 25 mM. Además, realizamos una dilución intermedia del PMA (25 mM) en HBSS-Hepes 10 mM para dejarlo a 20 µM. La preparación de 25 mM se alicuotó y se guardó a -20 °C, mientras que la dilución intermedia se prepara fresca cada vez. Con respecto a la ionomicina 1 mM, se preparó disolviendo 1 mg en 1,340 ml de DMSO, se alicuotó en alícuotas de 20 µl y se guardó a -20 °C hasta su uso.

Este ensayo se llevó a cabo 24 h tras las transfecciones. Antes de comenzar el ensayo se preparó una Solución A 2x preparado en HBSS (ref.14025092, Thermo, Rockfort, IL, USA) con Hepes 10 mM (para mantener el pH, ref. 15630080, Thermo, Rockfort, IL, USA) y que contenía Amplex red 50 µM, HRP 0,1 U/ml y en algunos casos PMA 400 nM (ref. P8139, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). A su vez, paralelamente, se preparó otra la Solución B 2x disuelto también en HBSS-Hepes 10 mM que contenía o no ionomicina 2 µM (ref. I0634, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Después de lavar cada pocillo, primero, se añadieron 50 µl de la Solución A 2x a cada pocillo que contenía Amplex red, HRP y en algunos casos PMA, y otros 50 µl de la otra Solución B 2x que podía contener o no el ionóforo de calcio, ionomicina. A continuación, se agitó con cuidado la placa y se midió la fluorescencia cada 2 min durante 1 h a 37 °C en un lector de placas Polarstar Galaxy, utilizando un filtro de excitación a 544 nm y otro de emisión a 590 nm. Se realizaron triplicados con y sin PMA y/o ionomicina de cada una de las transfecciones. Finalmente, los datos obtenidos se trataron y se representó la media con su desviación estándar del incremento de fluorescencia de cada muestra.

5.2. Determinación de anión superóxido mediante reducción de citocromo c

El citocromo c es un transportador de electrones que se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria y su función es translocar electrones del complejo III de la cadena transportadora a la IV. Además, el citocromo c, también ha sido utilizado para medir ROS, ya que en estado oxidado es sensible al superóxido pudiendo captar el electrón del superóxido generando oxígeno y reduciéndose. Al reducirse el citocromo c oxidado genera un pico a 550 nm convirtiéndose en una técnica muy sencilla para medir superóxido.

Para este ensayo, se sembraron 60.000 células por pocillo en placas p24 con 1 ml de medio completo. Al día siguiente se transfectaron las células mediante el procedimiento explicado en el apartado 2.3 de Material y Métodos. Antes de comenzar con el ensayo, se preparó una disolución de citocromo c 80 μ M pesando 5 mg en 5 ml HBSS-Hepes 10 mM y otra solución de superóxido dismutasa 15.000 U/ml (SOD, ref. S5395, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) pesando 5 mg en 1 ml H₂O. El citocromo c se usa en el momento, no se almacena, mientras que la SOD se prepara y se guarda a -20 °C hasta su uso.

A continuación, se preparó una Solución A que contenía citocromo c 20 μ M con o sin superóxido dismutasa 400 U/ml (SOD, ref. S5395, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) preparado en HBSS-Hepes. Paralelamente, se preparó una Solución B que contenía o no ionomicina 2 μ M y PMA 400 nM. Una vez preparadas las soluciones, las células se lavaron, se les añadieron 250 μ l de la Solución A y 250 μ l de la Solución B, se agitó la placa e incubó la placa durante 2 h a 37 °C. Las concentraciones finales fueron citocromo c 10 μ M, ionomicina 1 μ M y/o PMA 200 nM, con o sin SOD 200 U/ml. Finalmente, se cogieron 300 μ l del sobrenadante de cada pocillo y se vertieron en una placa p96 de Elisa para cuantificar la cantidad de citocromo c reducido. Para ello, se midió la placa a 550 nm mediante el lector de placas Multiskan EX (Thermo, Rockfort, IL, USA).

Para el cálculo de la cantidad de citocromo c reducido, a uno de los pocillos que contenía 10 μ M citocromo c se le añadió ditionito sódico, en exceso, reduciéndolo completamente y obteniendo el valor de absorbancia correspondiente. Con el valor de absorbancia para de citocromo c reducido 10 μ M de referencia, se pudo calcular la cantidad de citocromo c reducida en cada muestra.

5.3. Otros métodos para medir ROS

5.3.1. Quimioluminiscencia mediante L-012

Para la detección de O₂^{•-} se suele emplear la sonda L-012 (Ref. 120-04891, Wako Chemicals), un derivado del luminol. Esta sonda se debe preparar el mismo día en el que se va a realizar este ensayo. Para ello, se pesaron 5 mg de L-012 y se disolvieron en 800 μ l de H₂O previamente filtrada dejando el stock a 20 mM.

Pasadas 24 h tras la transfección realizada en placa p96, se retiró el medio de la placa p96 y se añadieron 160 µl de L-012 diluida en HBSS-Hepes con o sin PMA. Durante 15 min se midió la luminiscencia emitida por las células pretratadas con o sin PMA en un Luminoscant Ascent Microplate Luminometer. Transcurrido este tiempo, se añadieron 40 µl de ionomicina a una concentración de 5 µM y se continuó midiendo la luminiscencia. La concentración final de los reactivos fue de L-012 500 µM, PMA 200 nM y ionomicina 1 µM. Para cada tipo de transfección se realizaron triplicados de células tratadas con ionomicina y triplicados de células tratadas con ionomicina y PMA.

5.3.2. Oxidación del dihidroetidio (DHE)

Con el fin de medir la cantidad de superóxido intracelular generado por Nox5β y Nox5ε, se puso a punto la técnica fluorescente basada en dihidroetilidio (DHE, ref. D11347, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). El DHE es una sonda permeable y que emite fluorescencia azul dentro de la célula si no ha sido oxidado. Se sabe que el radical superóxido puede reaccionar con esta sonda generando 2-hidroxi-etidio que está cargado positivamente pudiendo unirse al DNA emitiendo una fluorescencia roja. Recientemente, se ha descrito que el DHE también puede ser oxidado de forma inespecífica por otros radicales generando la molécula etidio que presenta también carga positiva y la misma fluorescencia que el 2-hidroxi-etidio [226].

Antes de comenzar con el ensayo, hay que preparar el DHE a 10 mM. Para ello, diluimos 1 mg de DHE en 320 µl de DMSO, se alícuota con nitrógeno para eliminar el oxígeno y se guarda en a -20 °C hasta su uso.

Para este ensayo se sembraron células en una placa p96 con las paredes negras (15.000 cel/poc) y fondo transparente (ref. 3603, 96 Well Black Polystyrene Microplate, Corning, NY, USA), al día siguiente se procedió con la transfección de los plásmidos que se querían sobreexpresar (ver apartado 2.3 de Material y Métodos). A continuación, se eliminó el medio antiguo y se sustituyó por 100 µl de HBSS-Hepes el cual contenía DHE 10 µM (10 mM) con o sin PMA 200 nM (20 µM). Después de una incubación de 5 min a 37 °C, se añadió 100 µl de HBSS-Hepes con o sin ionomicina 1 µM (1mM). Sucesivamente, la placa se incubó otros 15 min antes de visualizarlo y sacar fotografías en un ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad). Se obtuvieron 6 imágenes por cada condición. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa ImageJ.

6. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD

Con el objetivo de medir la capacidad de proliferación de las células tratadas, se utilizó el ensayo de incorporación del colorante vital rojo neutro (N-4638, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Se trata de un colorante catiónico débil que se concentra activamente en los liposomas y endosomas de células viables. Su pKa es 7,3 y es un indicador de pH, que vira

de rojo a amarillo en el intervalo de pH 6,8-8,0. La forma más básica resulta menos soluble pudiendo dar problemas al formar cristales que precipitan en ausencia de agentes tamponadores de pH, como el Hepes.

Primero, se sembraron 5.000 cel/poc con medio completo en una placa p96, de esta forma las células tenían espacio suficiente para proliferar. En paralelo, se sembró una segunda placa p96 con las mismas células. Al día siguiente, se trataron o transfectaron las células con el tratamiento o plásmido de interés y se reveló la segunda placa de células con el ensayo de rojo neutro para saber la cantidad de células de partida (procedimiento explicado a continuación).

Tras pasar 24, 48 o 72 h desde que las células fueron tratadas, se comenzó con el ensayo para medir la proliferación. Para ello, se preparó un stock rojo neutro 1 mg/ml en agua desionizada y otra solución NaCl 1,8%, las cuales se esterilizaron por filtración (0,2 μ m). A continuación, se diluyó a partes iguales el colorante vital y la solución de 1,8% NaCl. El stock de rojo neutro 1 mg/ml puede formar cristales, por ello se recomienda rehacerlo cada mes (el protocolo original indica 3 meses). Una vez preparado todo, se eliminó el medio viejo de la placa de interés, se añadió 50 μ l/poc de la solución diluida y se incubó la placa durante 1 h y 30 min a 37 °C (se recomienda a largarlo hasta 2 h) permitiendo la incorporación del colorante dentro de las células.

Pasado el tiempo se eliminó el exceso de colorante libre con una pipeta multicanal con mucho cuidado para no dañar a las células. Para asegurarnos de que se eliminó todo el exceso, se dejó la placa boca abajo sobre un papel de filtro durante 1 min. Después, se lavó la placa con mucho cuidado con 200 μ l de PBS 1 \times y se dejó de nuevo la placa boca abajo sobre un papel de filtro durante 1 min. Finalmente, se lisaron las células con 100 μ l/poc del tampón NaH₂PO₄ 50 mM en etanol 50% para liberar el colorante incorporado. Se agitó la placa y se leyó en un espectrofotómetro de placas (Multiskan Ex, Thermo, Rockfort, IL, USA) a 550 nm.

El ensayo de viabilidad está basado en el mismo mecanismo de cuantificación que el ensayo proliferación con rojo neutro. Sin embargo, este ensayo presenta ciertas diferencias a la hora de sembrar las células, ya que el objetivo de este ensayo es ver cómo afecta el tratamiento, infección o transfección a la viabilidad celular.

Para ello, se sembraron 15.000 cel/poc con medio completo en una placa p96, de esta forma se generaba una monocapa celular que no podía proliferar mucho más. Tras 24 h a 37 °C, se trataron, infectaron o transfectaron las células el tiempo necesario antes de revelar la viabilidad celular con el agente de rojo neutro. Para el revelado de la viabilidad celular se utilizó el mismo colorante vital empleado en el apartado anterior. El procedimiento fue idéntico, aunque en este caso, no se reveló una placa a tiempo cero, ya que la referencia fueron las células sin tratar y por tanto totalmente viables.

7. EXTRACCIÓN Y PROCESAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

7.1. Extracción del RNA total

Para la extracción de RNA las HSC se cultivaron en placas de 60 mm a una densidad de 500.000 células por placa. Todos los reactivos utilizados durante la extracción fueron preparados con agua tratada con dietilpírocarbonato 0,1% (v/v) (DEPC, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y el material empleado en las extracciones fue previamente esterilizado mediante autoclave, etanol o incluso por luz UV. La extracción del RNA se realizó mediante TRIzol® (15596018, Thermo, Rockfort, IL, USA) siguiendo el protocolo aportado por el mismo fabricante. Este reactivo presenta fenol, isocianato de guanidina y un inhibidor de RNasas, permitiendo así mantener la integridad del RNA extraído durante su purificación.

Una vez realizadas las transfecciones o los tratamientos, se retiró el medio de las placas, se hizo un lavado con PBS 1× estéril frío y se añadió 1 ml de TRIzol® por placa. A continuación, las células se rascaron sobre el hielo y se dejaron 5 min a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. Los extractos se recogieron en un tubo de 1,5 ml, se añadieron 200 µl de cloroformo por tubo, se agitaron durante 15 s dejando posteriormente 3 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12.000 x g 15 min a 4 °C. Tras la centrifugación se obtuvieron tres fases, una fase inferior de color rojo que corresponde a las proteínas, una fase intermedia donde está el DNA y una fase superior incolora que contiene el RNA. Se obtuvo la fase superior cuidadosamente de cada extracto y se trasvasó a un nuevo tubo donde se añadieron 500 µl de isopropanol de alta calidad (I9516, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en frío. Las muestras se agitaron para mezclar las dos fases y se guardaron las muestras *overnight* a -20 °C para un mayor rendimiento. Al día siguiente, se mezcló el contenido de nuevo, se dejó 1 min en hielo y se centrifugó a 12.000 x g durante 15 min 4 °C. Terminado este paso el sedimento obtenido se lavó con 1 ml de etanol a 75%, se mezcló por vortex y se centrifugó a 7.500 x g durante 5 min a 4 °C. Finalmente, se eliminó el etanol, se dejó secar el sedimento y se resuspendió 15 µl de H₂O DEPC. Las muestras se guardaron a -80 °C hasta su uso.

7.2. Determinación de la concentración de RNA

La concentración de RNA se analizó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA), midiendo la absorbancia a 260 nm en 1,5 µl de la muestra sin diluir. El software incorporado calcula la concentración exacta de la muestra aplicando la Ley de Lambert-Beer.

Este software también proporciona el cociente entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm que se utiliza para estimar el grado de pureza de la preparación, ya que a 280 nm también absorben proteínas y otras trazas. Un DNA puro debe tener un cociente igual o superior a 1,8 mientras que en el caso del RNA ese cociente es de 2.

7.3. Tratamiento con DNasa I

Con el fin de eliminar toda traza de DNA, las muestras fueron tratadas con DNasa I (Thermo, Rockfort, IL, USA). Se incubaron 2 µg de RNA total con la enzima DNasa I en su tampón de reacción (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl₂ 2,5 mM y CaCl₂ 100 µM) y se completó hasta 10 µl de agua DECP. Se utilizó 1 U de enzima por cada µg de RNA. Se incubaron las muestras en el termociclador a 37 °C durante 30 min. Para inactivar la DNasa se añadió 1 µl de solución de parada (EDTA 50 mM) y se incubó a 65 °C durante 10 min. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

7.4. Transcripción inversa

La reacción de transcripción inversa implica la generación de moléculas de ácido desoxirribonucleico de doble cadena (cDNA) a partir de un ácido ribonucleico de cadena simple por acción de una enzima transcriptasa inversa. Para la reacción se utilizó como molde 2 µg de RNA tratado con DNasa y se emplearon como cebadores *random primers* a una concentración final de 20 µg/ml (Invitrogene, Carlsbad, CA, USA). Fueron necesarias 200 U de la enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogene, Carlsbad, CA, USA) para cada reacción en su tampón correspondiente (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, MgCl₂ 3 mM y KCl 75 mM) junto con deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) a una concentración final de 0,7 mM. El volumen final fue de 21 µl.

En primer lugar, se añadieron los *random primers* y dNTPs sobre el RNA molde y se incubaron en un termociclador durante 5 min a 65 °C. A continuación, las muestras se enfriaron en el hielo y se centrifugaron brevemente en una picofuga. Se añadió el tampón necesario para el funcionamiento de la enzima y el DTT y se incubaron en el termociclador durante dos min a 37 °C. Finalmente, se incorporó la transcriptasa inversa a la reacción y se incubaron los tubos a 25 °C 10 min, a 37 °C durante 50 min y a 70 °C durante 15 min, sucesivamente. Las muestras se enfriaron en hielo y se guardaron a -20 °C hasta su uso.

8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CONVENCIONAL

Para la detección de la presencia o no de un transcrito concreto en una muestra se empleó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR convencional). Esta técnica nos permite la amplificación específica de un transcrito a partir de segmentos de DNA bicatenario obtenidos en la retrotranscripción. Para ello, se diseñaron dos cebadores oligonucleotídicos específicos (**Tabla M-5**) situados en ambos extremos de la región a amplificar.

La PCR se realizó con la HotStart polimerasa (HotStarTaq DNA Polymerase, ref. 203205, QIAGEN), una enzima que no permite la amplificación hasta que es activada a 95 °C. Las reacciones de PCRs se realizaron en tubos de 0,2 ml en un volumen final de 20 µl que

contenían: PCR buffer 1×, 0,5 μM de cada primer, 0,5 U de la enzima HotStart y hasta 18 μl de agua estéril. Finalmente, se añadió 2 μl de cDNA diluido previamente a cada tubo de PCR, se agitó, centrifugó y se metió en el termociclador para el comienzo de la reacción. El cDNA siempre se diluyó por lo menos 10 veces, aunque hubo en casos que esta dilución fue mayor.

Tabla M-5. Secuencias y temperaturas de hibridación de los cebadores utilizados.

Cebadores utilizados en la PCR convencional		
Nombre	Secuencia (5' a 3')	Tm (°C)
hNox5 5'RACE P2	CAGTGCTGATGGTCAGGTTC	58
hNox5 5'RACE P3	TGGTCAGGTTCTCCATGACTC	58
hNox1 PCR FW	GCAGGGAGACAGGTGCCTTTTCC	62
hNox1 PCR RV	CTACAGACTTGGGGTGGGAGGT	
hNox2 PCR FW	TTCCAGTGCGTGCTGCTCAACA	62
hNox2 PCR RV	CTGCGGTCTGCCACGTACAA	
hNox3 PCR FW	CCATCCATGGGACGGGTCCGGA	62
hNox3 PCR RV	AGGGGTGCCACTCCAGCGAA	
hNox4 PCR FW	CTGGCTCGCCAACGAAGGGG	62
hNox4 PCR RV	GCTTGGAACCTTCTGTGATCCTCGG	
hNox5 PCR FW	ATGAGTGGCACCCCTTCACCATCAG	62
hNox5 PCR RV	GTCAGCAGGCTCACAAACCACTCGAA	
hNox5α PCR FW	CTGGAGACCCAGCCCAGAC	64
hNox5α PCR RV	ATGGAGCCACTGCCATCGAT	
hNox5β PCR FW	ATGAGTGCCGAGGAGGATG	64
hNox5β PCR RV	ATGGAGCCACTGCCATCGAT	
hNox5δ PCR FW	ATGAGTGCCGAGGAGGATG	64
hNox5δ PCR RV	GAGTGGGGATGAAGCCCAG	
hNox5γ PCR FW	CTGGAGACCCAGCCCAGAC	64
hNox5γ PCR RV	GAGTGGGGATGAAGCCCAG	

El perfil de reacción utilizado en el termociclador fue el siguiente:

Pasos iniciales		PCR (40 ciclos)		Pasos Finales
Activación de DNA Polimerasa	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Extensión final
HOLD (en espera)	CICLADO			HOLD (en espera)
15 min a 95 °C	30 s a 94 °C	30 s a *Tm °C	1 min a 72 °C	10 min a 72 °C

Los productos resultantes de cada digestión se analizaron en geles de agarosa al 0,8-2% (dependiendo del tamaño del producto esperado) durante 50 min a 90 V. Como marcador de peso molecular se empleó 1 kb DNA Ladder (Ref. 10787018, Thermo, Rockfort, IL, USA).

9. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa a tiempo real o más conocido como PCR en tiempo real se empleó para cuantificar la presencia de un transcrito concreto a partir del producto de la retrotranscripción, ya que esta técnica te permite por una parte amplificar secuencias de DNA bicatenarias y además cuantificar la cantidad que hay. En este trabajo se han empleado dos variantes de la técnica de PCR a tiempo real: los realizados mediante la sonda Taqman y los realizados por SYBR Green.

9.1. Por sonda Taqman

Las sondas moleculares Taqman son oligonucleótidos de hibridación específica unidos a dos moléculas, uno en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado, y un extintor de fluorescencia o *quencher* en el extremo 3' que extingue la fluorescencia emitida por el donador cuando ambos fluoróforos se encuentran próximos. Durante la amplificación del cDNA, la sonda se hibrida con su cadena complementaria del gen diana y la enzima Taq polimerasa, que tiene la actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo 5' de la sonda, liberando así el fluoróforo donador. Esto permite que la fluorescencia sea captada por un detector, ya que no es absorbida por el *quencher* al encontrarse ambos separados.

Se utilizaron las siguientes sondas Taqman Nox5 (Hs00225846_m1), Nox4 (Hs00418356_m1), COL1A1 (Hs00164004_m1) y 18S (Hs99999901_s1).

Para realizar esta técnica lo primero que se realizó fue el diseño de la placa de PCR que contiene 96 pocillos. A continuación, se preparó la solución de trabajo para la cantidad de pocillos necesarios que debía contener 1 µl de la sonda Taqman correspondiente y 10 µl de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) por muestra. Esta solución de trabajo una vez preparada y debidamente mezclada, debía guardarse tapado con papel de aluminio.

Paralelamente, se prepararon los cDNAs a analizar diluyendo las muestras con agua estéril previamente filtrada. Para los genes Nox5 y Nox4 las muestras se diluyeron 1:5, mientras que para COL1A1 y 18S se diluyeron 1:10.000.

Una vez preparada la solución de trabajo y diluidas las muestras, se mezclaron los 11 µl de solución de trabajo y 9 µl de la muestra en cada pocillo. A continuación, la placa (PCR-96M2-HS-C, Axygen Scientific, CA, USA) rellena se cubrió con un papel film o adaptado (Optical Adhesive Film, Applied Biosystems, Foster, CA, USA) y se centrifugó a 1.000 x g durante 1 min a 4 °C para eliminar las burbujas que pudieran haberse generado. Finalmente, la placa se colocó en el aparato de PCR en tiempo real iQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System (Bio-Rad) y se llevó a cabo la siguiente reacción:

Pasos iniciales		PCR (40 ciclos)	
Activación UNG*	Activación de DNA Polimerasa	Desnaturalización	Hibridación/Extensión
HOLD (en espera)	HOLD (en espera)	CICLADO	
2 min a 50 °C	10 min a 95 °C	15 s a 95 °C	1 min a 60 °C

9.2. Por sonda de SYBR Green

El fluoróforo SYBR Green es un agente intercalante del DNA que se une de manera inespecífica al DNA bicatenario y emite 1.000 veces más fluorescencia cuando se encuentra unido al DNA que cuando está libre en solución. El incremento de DNA en cada ciclo de la PCR se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida.

Tabla M-6. Secuencias y temperaturas de hibridación de los cebadores utilizados.

Cebadores para PCR a tiempo real		
Nombre	Secuencia (5' a 3')	Tm (°C)
hNox5 qPCR Fw	GCTGTCGAGGAGTGTGACA	63
hNox5 qPCR Rv	GCTCAGAGGCAAAGATCCTG	
hCOL1A1qPCR Fw	TCTAGACATGTTTCAGCTTTGTGGAC	60
hCOL1A1 qPCR Rv	TCTGTACGCAGGTGATTGGTG	
hNox4 qPCR FW	CCTCAACTGCAGCCTTATCC	60
hNox4 qPCR RV	CAACAATCTCCTGGTTCTCC	
h18S qPCR Fw	GTAACCCGTTGAACCCATT	60
h18S qPCR RV	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	

Esta reacción emplea, al igual que la PCR convencional, DNA, una pareja de cebadores (**Tabla M-6**), dNTPs, un tampón donde se va a dar la reacción y una polimerasa termoestable. A esta mezcla se añade un fluoróforo, en nuestro caso SYBR Green permitiendo así la cuantificación de la expresión de un gen o varios genes.

Las PCRs se realizaron en placas de 96 pocillos (PCR-96M2-HS-C, Axygen Scientific, CA, USA) en un volumen final de 20 µl por pocillo donde se añadieron 18 µl de solución de trabajo y 2 µl de cDNA. Los 18 µl de la solución de trabajo contenían 0,5 µl de cada pareja de primers de interés (stock 10 µM), 10 µl SYBR Green 2X y 7 µl de H₂O estéril por pocillo. La concentración final de los cebadores fue de 0,25 µM.

A la hora de realizar el diseño de la placa se intentó minimizar la variabilidad entre los tratamientos, pocillos y los errores de pipeteo (**Figura M-4**). Para ello, primero se preparó una solución de trabajo común para las todas muestras teniendo en cuenta los triplicados. A continuación, se repartieron 54 µl de solución de trabajo por cada muestra a un tubo nuevo donde se añadieron 6 µl del cDNA de cada muestra previamente diluida (2 µl por triplicado

técnico). La dilución realizada varió dependiendo el gen que estaba en estudio. Para Nox4 y Nox5 la dilución empleada fue 1:5, para colágeno, en cambio, de 1:10.000. Una vez mezclado en cDNA con la solución de trabajo, el contenido (60 µl) se dividió de nuevo vertiendo 20 µl por cada pocillo de la placa de PCR. De este modo, por cada tratamiento obtuvimos triplicados técnicos por cada muestra.

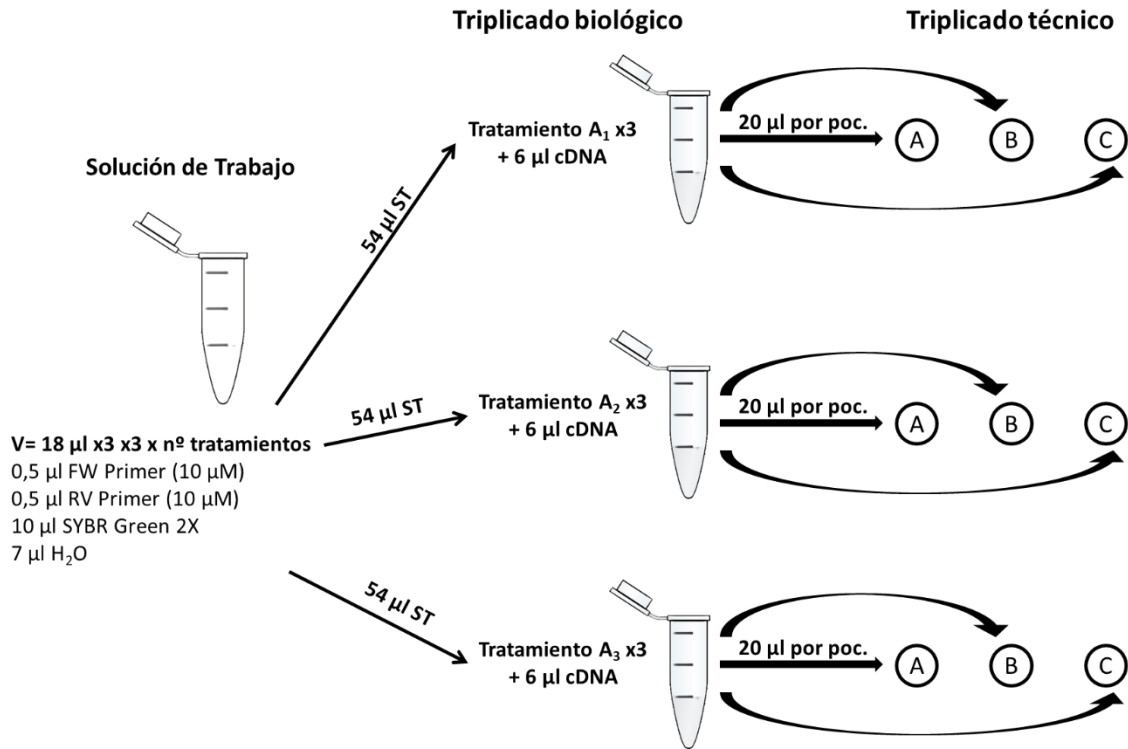


Figura M-4. Diseño para minimizar la variabilidad entre pocillos y los errores de pipeteo.

Tras completar la placa con los tratamientos a investigar, la placa de 96 pocillos se cubrió con un papel adhesivo específico (Optical Adhesive Film, Applied Biosystems, Foster, CA, USA) y se centrifugó a 1.000 x g durante 1 min a 4 °C para eliminar las burbujas que pudieran haberse generado. Finalmente, la placa se colocó en el aparato de PCR en tiempo real iQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System (Bio-Rad) y se llevó a cabo la siguiente reacción:

Etapa inicial	PCR (40 ciclos)		
Activación de DNA Polimerasa	Desnaturalización	Hibridación	Extensión
HOLD (en espera)	CICLADO		
3 min	15 s	15 s	15 s
95 °C	95 °C	*T _m	72 °C

* La T_m se especifica en la **Tabla M-6**.

10. AMPLIFICACIÓN DEL EXTREMO 5' DEL mRNA DE NOX5 (RACE 5')

La técnica de Amplificación Rápida de Extremos de cDNA (Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE, Thermo, Rockfort, IL, USA) es un procedimiento para la amplificación de secuencias de ácidos nucleicos a partir de un molde de RNA mensajero (mRNA) entre un sitio interno definido y secuencias desconocidas en el extremo 3' o 5' del mRNA. Esta metodología de amplificación con especificidad de un solo lado ha sido también descrita como PCR "unilateral" o PCR "anclada".

La PCR 5' RACE o "anclada" es una técnica que facilita el aislamiento y la caracterización de los extremos 5'. La técnica consiste en, la síntesis del cDNA usando un oligonucleótido antisentido específico del gen (Primer hNox5 5'RACE P1). Esto permite la conversión a cDNA del mRNA de interés, o familias relacionadas de mRNAs (**Figura M-5**).

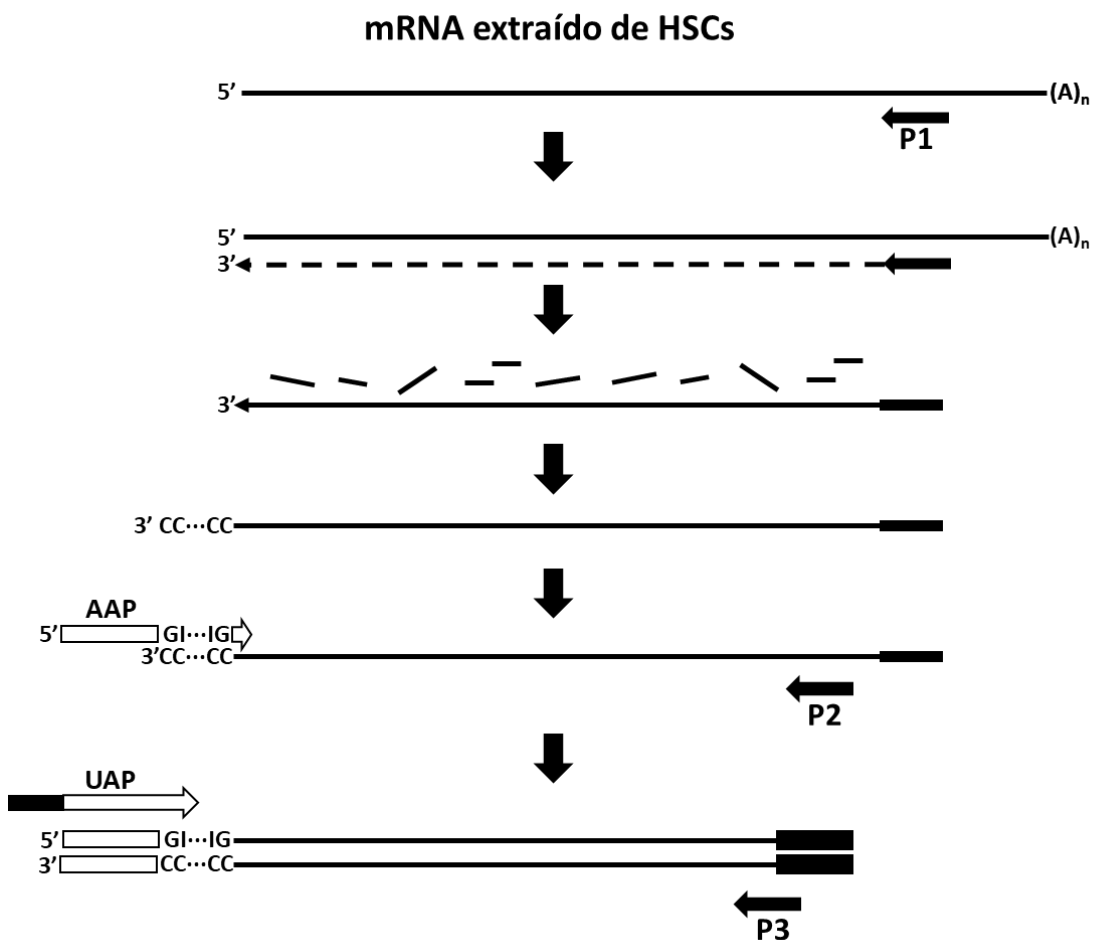


Figura M-5. Esquema resumen de la técnica para la amplificación de extremos 5'UTR.

Después de la síntesis del cDNA, el primer producto de cadena se purifica y mediante la enzima TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) se agregan colas homopoliméricas a los extremos 3' del cDNA. A continuación, el cDNA se amplifica mediante PCR usando dos cebadores (**Tabla M-5**): un cebador específico de gen anidado (hNox5 5'RACE P2) y un

cebador de anclaje complementario que contiene homopolímero (primer AAP). Esto permite la amplificación de secuencias desconocidas entre el hNox5 5'RACE P2 y el extremo 5' del mRNA. Para una mayor seguridad de que lo que hemos amplificado es nuestro producto, se vuelve a realizar otra PCR convencional con un primer que se une a la zona homopolimérica (UAP) y un primer anidado (hNox5 5'RACE P3). En la **Figura M-5** se muestra ver de modo gráfico lo explicado anteriormente.

10.1. Síntesis de cDNA específico del gen de Nox5

Esta fase consiste en la síntesis del cDNA usando un oligonucleótido antisentido específico del gen (Primer hNox5 5'RACE P1, 5'-AGTGGGCAGCGCTGATGGTC-3'). Esto permite la conversión a cDNA del mRNA de interés, o familias relacionadas de mRNAs.

Para ello, se cogieron 2,5 µg de mRNA de alta calidad (cociente entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm superior a 2), 2,5 pmoles de primer hNox5 5'RACE P1 y se llevaron hasta un volumen de 15,5 µl con agua tratada con DEPC. El contenido se incubó durante 10 min a 70 °C antes de introducirlo 1 min en hielo. A continuación, se centrifugó y se añadió lo siguiente: 2,5 µl de buffer de PCR 10x, 2,5 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µl de dNTPs 10 mM y 2,5 µl de DTT 0,1 M. Se mezcló y se incubó todo el contenido (los 24 µl) 1 min a 42 °C. Finalmente, se añadió 1 µl de SuperScrip II RT, se mezcló y se incubó 50 min a 42 °C en un termociclador. A continuación, se incubó el contenido a 15 min a 72 °C y se añadió un mix de RNasa el cual se incubó otros 30 min a 37 °C.

10.2. Purificación e inserción de colas homopoliméricas

El exceso de nucleótidos y hNox5 5'RACE P1 debían de eliminarse del primer producto para evitar tener problemas en los siguientes pasos. Una vez purificado el producto de la retrotranscripción dirigida, al producto generado se le añadió en el extremo 3' una cola homopolimérica con la enzima TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) para luego poder realizar la PCR.

Para ello, se partió de 10 µl del cDNA purificado al cual se le añadieron 6,5 µl de H₂O DEPC, 5 µl de buffer 5x y 2,5 µl de dCTP 2 mM antes de ser incubado 3 min a 94 °C. Finalizada la incubación, el contenido se dejó enfriar 1 min en hielo y se le añadió 1 µl de la enzima TdT. Finalmente, se mezcló el contenido (25 µl), se incubó 10 min a 37 °C y se inactivó la enzima incubando de nuevo 10 min a 65 °C.

10.3. Amplificación del extremo 5'UTR a partir del poliC-cDNA

Una vez añadido la cola homopolimérica, el siguiente paso fue la amplificación por PCR del extremo 5'UTR. Para ello, se diseñó un primer en sentido reverso (hNox5 5'RACE P2, 5'-CAGTGCTGATGGTCAGGTTC-3') que estuviese situado más cerca del extremo 5'UTR, es

decir un cebador anidado. Como cebador sentido se utilizó el Abridged Anchor Primer proporcionado por el mismo kit. Esta PCR se realizó del mismo modo como se ha explicado en el apartado 8 de Material y Métodos.

10.4. Amplificación del cDNA unido a la cola poliC por PCR

A menudo, una única PCR de 25 a 35 ciclos no generará suficiente producto específico para ser detectado mediante un gel con bromuro de etidio. No se recomienda aumentar el número de ciclos realizados durante la PCR más allá de los 35 ciclos, ya que puede generar numerosos productos no específicos. Por eso, se realizó una dilución de la PCR anterior (1:100) para ser re-amplificada mediante otra PCR anidada usando un cebador sentido UAP (proporcionado por el kit) y otro cebador antisentido anidado (hNox5 5'RACE P3, 5'-TGGTCAGGTTCTCCATGACTC-3').

11. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN-BLOT

11.1. Preparación de extractos celulares

Con el fin de extraer y cuantificar la expresión de las proteínas, se sembraron 300.000 células LX-2 por placa de 60 mm (Greiner Bio One) en medio completo. Una vez terminados los tratamientos, transfecciones o infecciones, las células se lavaron con PBS 1x a 4 °C. Tras retirar el PBS, se añadieron 80 µl por placa del tampón de lisis enfriado previamente y se continuó con la rotura celular dejando las placas durante 15 min en hielo en agitación fuerte. El tampón de lisis añadido contenía un tampón ya previamente preparado que contenía Tris-HCl 25 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, SDS 0,01%, Desoxicolato sódico 1% y Igepal 1% (Ca-630, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) al cual se añadía en ese mismo momento inhibidores de proteasas (11873580001, Roche), NaF 5 mM y ortovanadato 1 mM.

Tras los 15 min, las células eran rascadas en hielo con un rascador tipo *lifter* y se transfirieron a tubos de 1,5 ml. A continuación, las muestras se centrifugaron a 12.000 x g durante 30 min y se recogió el sobrenadante, el cual se guardó a -20 °C hasta su uso.

11.2. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas de las muestras se midió mediante el ensayo del ácido bicinonínico (BCA, Pierce, Thermo, Rockfort, IL, USA). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado. Se tomaron 2 µl de muestras y se diluyeron con 8 µl de agua en placa de 96 pocillos de fondo plano (Greiner). Paralelamente se realizó una recta patrón en la misma placa para lo cual se pusieron cantidades creciente y conocidas (0-16 µg/µl) de seroalbúmina bovina (BSA) hasta un volumen de 10 µl. Una vez rellenada la placa con las muestras a determinar, se preparó el reactivo del ensayo mezclando una parte del Reactivo B con 50 partes del reactivo A (BCA Protein Assay Reagent A and B, Pierce, Thermo, Rockfort, IL, USA)

y se añadieron 200 μ l a cada pocillo del reactivo preparado. Finalmente, la placa se incubó a 37 C en una estufa durante 30 min y se midió la absorbancia a 550 nm en un espectrómetro de placas (Multiskan Ex, Thermo, Rockfort, IL, USA).

11.3. Electroforesis SDS-PAGE

La separación de proteínas según su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). Se emplearon geles de acrilamida discontinuos de 1,5 mm de espesor. El gel inferior o gel de separación fue 10% (Tris-HCl 375 mM, acrilamida 10% (v/v), SDS 0,1% (v/v), persulfato de amonio 0,01% (v/v), TEMED 0,001% (v/v)) para la mayoría de las proteínas y del 12% en el caso de P-Smad2. El gel superior o de apilamiento, en cambio, se realizó con 5% de acrilamida (Tris-HCl 125 mM, acrilamida 5% (v/v), SDS 0,1% (v/v), persulfato de amonio 0,01% (v/v), TEMED 0,005% (v/v)).

Para la separación de proteínas por SDS-PAGE las muestras cargadas debían tener 40 μ g de proteína de cada muestra y 1/3 del tampón reductor o carga 4 \times (Tris-HCl 250 mM, glicerol 40% (v/v), SDS 8% (v/v), β -mercaptoetanol 20% (v/v), azul de bromofenol 0,02% (v/v), pH 6,8). Las muestras se hirvieron a 100 °C durante 5 min. De este modo se desnaturalizaron las proteínas y se favoreció su unión al SDS, detergente aniónico que carga negativamente y da forma homogénea a las proteínas. Con las muestras ya preparadas, se procedió a cargar las proteínas en las calles de los geles. En la última calle se cargó 5 μ l de un marcador de peso molecular conocido (Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards, ref. 1610373, Bio-Rad Laboratories) permitiendo así la estimación del peso molecular de las proteínas a estudio. Además, este marcador también sirvió como control de la transfección.

La electroforesis se realizó en el sistema Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories) a Intensidad constante de 70 mA por cada pareja de geles (140 mA por los cuatro geles) alrededor de 1 h. Es conveniente que el tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%) esté previamente enfriado, ya que la electroforesis en estas condiciones puede generar calor y hacer que las muestras corran de forma indebida.

11.4. Western blot

Las proteínas separadas mediante electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (PROTAN pure Nitrocellulose Transfer Membrane, Whatman, Schleicher & Schuell) con un poro de 0,45 μ m mediante el sistema Mini Trans-Blot System (Bio-Rad Laboratories). Este proceso consiste en un sistema de transferencia electroforética húmeda en tanque el cual se realiza a intensidad constante de 350 mA durante 1 h a 4 °C. Sin embargo, para proteínas grandes, como el procolágeno de tipo I, es recomendable realizar la transferencia a intensidad constante de 350 mA durante 1 h 30 min a 4 °C. Al igual que con el buffer de electroforesis, el tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanol 10%) es mejor que esté frío.

11.5. Inmunodetección

Para evitar la adsorción de los anticuerpos sobre la membrana de nitrocelulosa de forma inespecífica, éstas se incubaron 2 h a temperatura ambiente con una solución de bloqueo que contenía 5% de leche desnatada en polvo disuelto en TBS-0,1% Tween (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 0,1%, pH 7,6).

A continuación, se lavaron tres veces con TBS-0,1% Tween antes de añadir el anticuerpo primario correspondiente. Las concentraciones y condiciones de incubación de cada anticuerpo se detallan en la **Tabla M-7**.

Una vez preparados los anticuerpos primarios, las membranas se introdujeron en tubos de 50 ml que contenían el anticuerpo primario para la proteína correspondiente y se incubaron toda la noche a 4 °C en un agitador de rodillo (SRT6D, Stuart, Staffordshire, UK). Al día siguiente, las membranas se lavaron tres veces con TBS-0,1% Tween y se incubaron 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario. Tras la incubación, se eliminó el exceso de anticuerpo con dos lavados de 10 min con TBS-0,1% Tween y otros dos lavados con TBS sin Tween.

El revelado de las membranas se llevó a cabo mediante la técnica de detección de peroxidasa conjugada, visualizándose las bandas inmunoreactivas de proteína mediante quimioluminiscencia. Para ello, la membrana se incubó durante 1 min con una solución comercial, SuperSignal West Femto Maximum Sensibility Substrate (Thermo, Rockfort, IL, USA) que contiene peróxido de hidrógeno y un sustrato, luminol, que emite luz a una longitud de onda de 428 nm. Las actinas, al expresarse con mayor intensidad, se revelaron empleando un líquido revelado más suave, Lumi-Light^{PLUS} (Western Blotting Substrate, REF. 12015196, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Finalmente, sobre las membranas se colocaron películas fotográficas sensibles a la luz azul (Hyperfilm-ECL, Amersham, GE Healthcare) durante 0,5-5 min e inmediatamente se introdujeron en el revelador automático (CURIX, AGFA).

11.6. Cuantificación de las membranas

Las bandas de autorradiografías fueron escaneadas con un densitómetro (GS-800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad Laboratories) y analizadas con el software Quantity One 4.6.3.1-D para la cuantificación de la intensidad de las bandas.

La densidad óptica de cada banda se normalizó dividiendo su valor por el valor de densidad óptica de la banda endógena obtenida en la misma calle del gel y después frente a su correspondiente tratamiento control.

Tabla M-7. Listado y condiciones empleadas de cada anticuerpo

Proteína	% acril	Cant. prot.	Bloqueo	Lavados con TBS-T	Anticuerpo Primario				Lavados con TBS-T	Anticuerpo Secundario		Lavados
					origen	condiciones		referencia		condiciones		
						dilución	t, T			dilución	t, T	
Nox5	10	40 µg	TBS-T leche 5% 1-2 h 25 °C	2 × 5 min	conejo	1:500 en TBS-T leche 5%	24 h, 4 °C	(191010) Abcam	3 × 10 min	1:15.000 en Leche TBS- Tween 0,1%	1 h, 25 °C	2 × 10 min con TBS-T 1 × 10 min con TBS
P-p38	10	40 µg	TBS-T leche 5% 1-2 h 25 °C	2 × 5 min	conejo	1:500 en TBS-T leche 5%	16 h, 4 °C	(9211) Cell Signaling	3 × 10 min	1:2.000 en Leche TBS- Tween 0,1%	1 h, 25 °C	2 × 10 min con TBS-T 1 × 10 min con TBS
p38	10	40 µg	TBS-T leche 5% 1-2 h 25 °C	2 × 5 min	conejo	1:1.000 en TBS-T BSA 5%	16 h, 4 °C	(9212) Cell Signaling	3 × 10 min	1:2.000 en Leche TBS- Tween 0,1%	1 h, 25 °C	2 × 10 min con TBS-T 1 × 10 min con TBS
Colágeno Tipo I	8	40 µg	TBS-T leche 5% 1-2 h 25 °C	2 × 5 min	conejo	1:500 en TBS-T leche 5%	16 h, 4 °C	HPA008405 Sigma	3 × 10 min	1:2.000 en Leche TBS- Tween 0,1%	1 h, 25 °C	2 × 10 min con TBS-T 1 × 10 min con TBS
α-SMA	10	40 µg	TBS-T leche 5% 1-2 h 25 °C	2 × 5 min	conejo	1:4.000 en TBS-T leche 5%	16 h, 4 °C	(NB110- 55432) Novus Biologicals.	3 × 10 min	1:8.000 en Leche TBS- Tween 0,1%	1 h, 25 °C	2 × 10 min con TBS-T 1 × 10 min con TBS
P-Smad2	10	40 µg	TBS-T leche 5% 1-2 h 25 °C	2 × 5 min	conejo	1:1.000 en TBS-T leche 5%	16 h, 4 °C	(3108) Cell signaling	3 × 10 min	1:4.000 en Leche TBS- Tween 0,1%	1 h, 25 °C	2 × 10 min con TBS-T 1 × 10 min con TBS
Smad2	10	40 µg	TBS-T leche 5% 1-2 h 25 °C	2 × 5 min	conejo	1:5.000 en TBS-T leche 5%	16 h, 4 °C	(5339) Cell signaling	3 × 10 min	1:8.000 en Leche TBS- Tween 0,1%	1 h, 25 °C	2 × 10 min con TBS-T 1 × 10 min con TBS
β-actina	10	40 µg	TBS-T leche 5% 1-2 h 25 °C	2 × 5 min	ratón	1:10.000 en TBS-T leche 5%	16 h, 4 °C	(A1978) Sigma	3 × 10 min	1:10.000 en Leche TBS- Tween 0,1%	1 h, 25 °C	2 × 10 min con TBS-T 1 × 10 min con TBS

12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos son el resultado de la media \pm desviación estándar (SD) de al menos 3 experimentos independientes. La significación estadística fue estimada empleando un test paramétrico ANOVA de un factor, en el caso de que los datos obtenidos siguiesen una distribución normal. La significación estadística de los datos que no seguían una distribución normal se estimó mediante un test no paramétrico para más de dos muestras independientes de Kruskal-Wallis. Como test a posteriori se realizaron: el test de Tuckey y Tamhane en caso de análisis paramétrico, y el test U de Mann-Whitney para dos muestras en el caso de que el análisis tuviese que hacerse por la vía no paramétrica. Se consideró significativo (*) un valor de p exacta inferior a 0,05; muy significativo (**) un valor de p exacta inferior a 0,01 y altamente significativo (***) un valor de p exacta inferior a 0,001. Los análisis se realizaron empleando el programa STATA.

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN DE NOX5 Y SUS ISOFORMAS EN LX-2

1.1. Variantes de Nox presentes en HSC

Lo primero que realizamos fue averiguar qué variantes de las NADPH oxidasas (Nox) se expresaban en este tipo celular. Para ello, basándonos en Holterman et al. [179], diseñamos 5 parejas de cebadores (**Tabla M-5**) para cada variante de las Nox. A continuación, se realizó una extracción de mRNA de LX-2 sin tratar y tras la transcripción inversa, se realizó una PCR convencional para cada variante. De esta forma sabríamos de forma cualitativa la presencia o ausencia de cada variante en este tipo celular. Los resultados obtenidos mostraron que la línea celular LX-2 expresaba Nox2, Nox4 y Nox5 en condiciones basales (**Figura R-1A**). Del mismo modo, no se detectaron niveles apreciables para Nox1 y Nox3. Este resultado mostró por primera vez la presencia de Nox5 en células estelares hepáticas (HSC). La expresión de Nox5 en células LX-2 fue confirmada usando sondas TaqMan en un termociclador de PCR a tiempo real. La expresión basal de Nox5 en células LX-2 medido con esta técnica fue mayor (ciclo 29) que la expresión de Nox4 (ciclo 35) en la misma muestra.

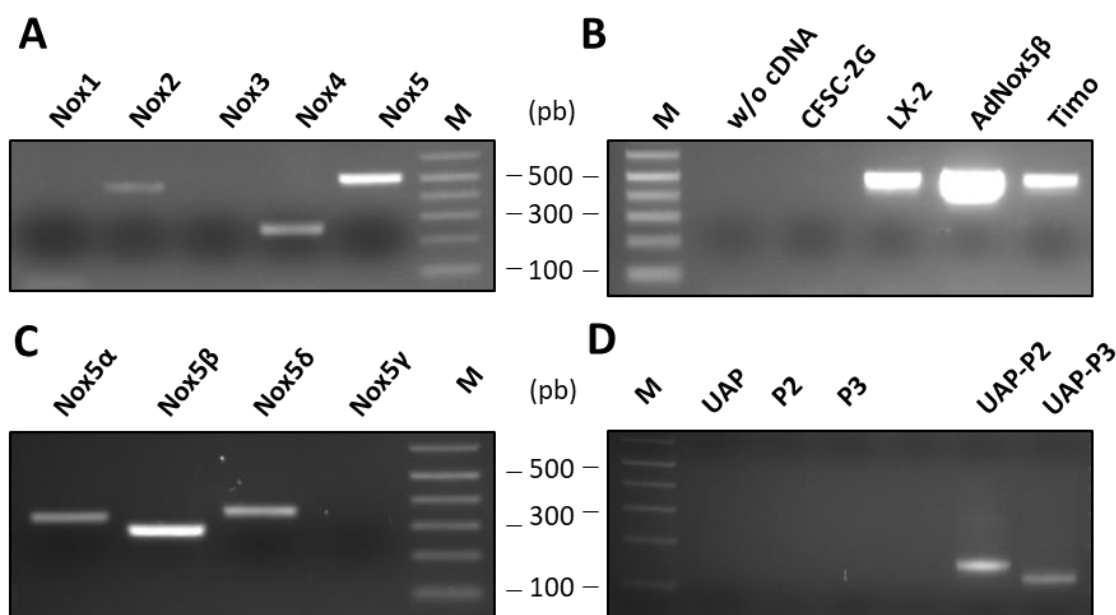


Figura R-1. Expresión de NADPH oxidasa 5 en la línea celular humana LX-2. (A) Expresión de las variantes Nox en LX-2 determinada por RT-PCR. El cDNA de LX-2 se obtuvo mediante transcripción inversa y se amplificó mediante PCR convencional durante 35 ciclos. M: marcador de peso molecular. (B) Expresión del mRNA de Nox5 en diferentes muestras: w/o cDNA (control sin cDNA), CFSC-2G (HSC derivados de ratas cirróticas), LX-2 (HSC humana), AdNox5β (LX-2 infectado con adenovirus Nox5β, MOI 10) y cDNA de timo humano (Clontech). (C) Expresión de las isoformas de Nox5 en células LX-2: Nox5α (327 pb), -β (270 pb) y -δ (354 pb) en LX-2 mediante RT-PCR a lo largo de 35 ciclos. (D) Detección de Nox5ε por amplificación de extremos 5'UTR usando el sistema 5' RACE. Se incluyeron tres controles negativos que contenían cDNA de LX-2 con solo el cebador sentido o dos antisentidos: UAP (Universal Amplification Primer), P2 (primer hNox5 5'RACE P2) y P3 (primer hNox5 5'RACE P3). UAP-P2: PCR realizada con UAP y hNox5 5'RACE P2. UAP-P3: PCR realizada con UAP y un cebador interno, hNox5 5'RACE P3. El tamaño de estos productos de PCR fue consistente con Nox5ε pero no con otras isoformas de Nox5 [227].

1.2. Expresión de Nox5 en LX-2

Con el fin de corroborar la presencia de Nox5 en HSC humanas, realizamos otra RT-PCR convencional con cDNAs de distintos tejidos. Como control negativo, utilizamos el cDNA obtenido de la línea celular de HSC provenientes de rata, CFSC-2G, ya que Nox5 no está presente en el genoma de los roedores. Paralelamente, como controles positivos, obtuvimos el cDNA de LX-2 infectadas con el adenovirus de Nox5 β (AdNox5 β), además de cDNA proveniente de muestras de timo. El timo es un órgano con gran expresión de Nox5 y por ello es empleado por otros autores como control positivo [228]. Como vemos en la **Figura R-1B**, la línea celular de ratón no mostró niveles apreciables de expresión, a diferencia de LX-2. De igual forma, las células LX-2 infectadas con AdNox5 β con MOI 10 y el cDNA obtenido de mRNA de timo, también, mostraron el amplicón correspondiente a Nox5 (**Figura R-1B**).

Una vez comprobado que las células estelares humanas, LX-2, expresan Nox5, el siguiente objetivo fue el estudio de la expresión de las distintas isoformas de Nox5 en este mismo tipo celular. Para ello, basándonos en un trabajo realizado por Holterman et al.[179] pusimos a punto la PCR convencional para cada isoforma. La **Figura R-2** muestra de forma gráfica la localización de cada cebador. Los resultados obtenidos mostraron una clara expresión de Nox5 α , Nox5 β y Nox5 δ , pero no de Nox5 γ (**Figura R-1C**). La expresión de Nox5 ϵ no se pudo estudiar por PCR convencional, ya que la secuencia nucleotídica está presente en todas las isoformas (Ver **Figura I-13** de la Introducción).

Sin embargo, la variante Nox5-S o Nox5 ϵ presenta una secuencia 5'UTR más corta que las demás, por lo que se puede realizar una amplificación específica de los extremos 5'UTR para todas las Nox5 (**Figura R-1D**) [227]. Para ello, primero, realizamos una transcripción inversa para amplificar dirigida para Nox5. A continuación, se le añade una secuencia conocida en los extremos 5'UTR y se realiza una primera PCR que amplifica los extremos 5'UTR, pero también otros productos inespecíficos. Finalmente, para eliminar impurezas se realiza una PCR anidada donde sólo estarán las amplificaciones de los extremos 5'UTR de cada isoforma (Más detalles en Material y Métodos, ver **Figura M-5**).

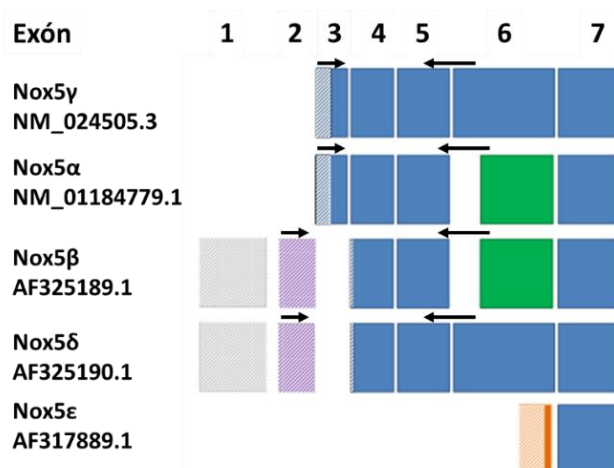


Figura R-2. Localización de los cebadores empleados para la identificación de las isoformas expresadas en la línea celular LX-2 en condiciones basales.

Como muestra la **Figura R-1D**, en el gel de agarosa únicamente pudimos observar una banda de alrededor de 140 pb con el cebador UAP-P2 que correspondía con el tamaño del extremo 5' UTR de la isoforma Nox5ε. Para confirmar este resultado se realizó otra PCR con un cebador anidado (UAP-P3) que generó una banda de 120 pb confirmando de nuevo la presencia de la isoforma Nox5ε. Además, como control negativo de la técnica realizamos la última amplificación de PCR con solo una pareja de los dos cebadores necesarios, ya que algunos cebadores dieron problemas de inespecificidades. Por tanto, el tamaño de estos productos de PCR fue consistente con Nox5ε pero no con otras isoformas de Nox5 [227] demostrando la presencia de esta isoforma en LX-2.

1.3. Silenciamiento de Nox5

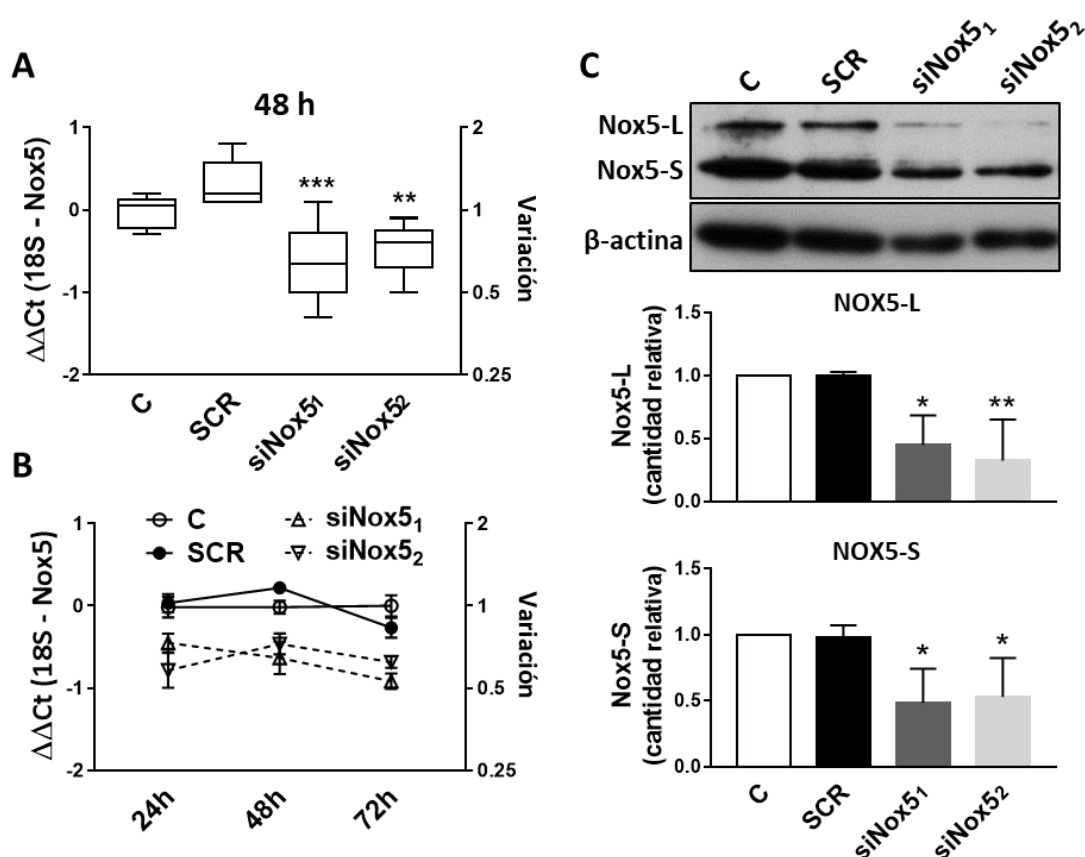


Figura R-3. Silenciamiento del mRNA y proteína de Nox5 por siRNAs específicos en la línea celular humana, LX-2. (A) Las células se sembraron y transfectaron con una solución 30 nM de un siRNA scrambled (SCR) o con dos siRNAs Nox5 específicos (siNox5₁ o siNox5₂), y después de 48 h las células se lisaron con TRIzol para su análisis mediante RT-qPCR. Los datos representan la media ± SD (n = 3). (***) p < 0,001, (**) p < 0,01, vs. SCR (scrambled). (B) Expresión de Nox5 a lo largo del tiempo tras el silenciamiento de éste mediante siRNAs. Los datos representan la media ± SD (n = 3). (C) Reducción de los niveles de proteína de Nox5 mediante siRNAs. Las células fueron sembradas y transfectadas con siRNAs como antes y después de 48 h de incubación a 37 °C, las células fueron lisadas con RIPA buffer para la realización del western-blot con un anticuerpo primario contra Nox5. La banda superior (≈75 kDa) corresponde a la isoforma larga (Nox5-L) mientras que la más baja (≈60 kDa) a la corta (Nox5-S o Nox5ε). La expresión de proteína se normalizó internamente frente a β-actina. Los gráficos muestran el nivel relativo de proteína entre los tratamientos y el control. Los datos representan la media ± SD (n = 3). (*) p < 0,05, (**) p < 0,01, vs. SCR.

Una vez analizada la expresión de Nox5 y sus isoformas de forma cualitativa, nos planteamos silenciar Nox5 mediante RNAs de interferencia (siRNAs) específicos y estudiar su expresión por PCR cuantitativa. Para ello, diseñamos dos siRNA (siNox5₁ y siRNA5₂) específicos para todas las isoformas de Nox5 y otro que no se une a ninguna secuencia nucleotídica (*scrambled*, SCR). A continuación, se midió la cantidad de mRNA de Nox5 en presencia y ausencia de siRNAs de Nox5 a las 48h (**Figura R-3A**). Además, se realizó una curva de tiempos, a las 24, 48 y 72 h (**Figura R-3B**). Todos los resultados mostraron un silenciamiento significativo para el mRNA de Nox5.

Los resultados del apartado anterior se validaron a nivel proteico. Para ello, se extrajeron proteínas de células transfectadas con SCR, siNox5₁ y siNox5₂ a las 48 h para la realización del western-blot (**Figura R-3C**). Las células LX-2 expresan tanto la isoforma larga (Nox5-L), como la isoforma corta (Nox5-S o Nox5ε) de Nox5 siendo esta última que más se expresa, 90% Nox5-S frente 10% Nox5-L. Estos resultados confirman los obtenidos por PCR (**Figura R-1**). Al igual que se observó mediante qPCR, la transfección con siNox5₁ y siNox5₂ redujo significativamente los niveles de Nox5-L y Nox5-S validando la presencia de Nox5 en LX-2.

Por tanto, las células LX-2 además de Nox2 y Nox4, expresan Nox5 en condiciones basales. Además, la línea celular expresa 3 isoformas largas de Nox5, es decir, Nox5α, Nox5β y Nox5δ, aunque la isoforma de Nox5 que más se expresa parece ser la forma corta (Nox5ε o Nox5-S), proteína definida por muchos autores como una enzima inactiva [169]. Para conocer si la forma corta tenía o no actividad, decidimos medir la producción de ROS en células que sobreexpresaban Nox5β o Nox5ε.

2. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE NOX5β Y NOX5ε

2.1. Sobreexpresión de Nox5β mediante infección

Para dar respuesta a esa pregunta decidimos sobreexpresar Nox5 para medir la actividad y demostrar si produce ROS o no. En nuestro caso, primero, decidimos emplear adenovirus, ya que el laboratorio disponía del adenovirus de Nox5β. Lamentablemente, disponíamos únicamente del adenovirus de la isoforma β y no de la ε que era el que nos interesaba estudiar. Aun así, decidimos emplearlo para poner a punto las técnicas de cuantificación de ROS.

Valiéndonos de la ausencia de Nox5 en el genoma de los roedores, la sobreexpresión se realizó primero en una línea celular de rata (CFSC-2G) para evitar, de esta forma, la posible interferencia por parte de la Nox5 endógena. Para optimizar la infección infectamos las CFSC-2G con un adenovirus que sobreexpresa GFP o la proteína verde fluorescente (AdGFP) a MOI (Multiplicity of Infection) crecientes (100-1250). Los resultados fueron los esperados ya que, a mayor cantidad de adenovirus, es decir, a mayor MOI, la fluorescencia emitida fue

mayor (**Figura R-4A**). Una vez puesto a punto, las células se infectaron con el AdNox5 β y se midió la capacidad de generar H₂O₂ extracelular. Los resultados mostraron que la infección por sí sola no era capaz de generar ROS a menos que añadiéramos ionomicina (Iono), un ionóforo de calcio, al medio. La ionomicina es capaz de generar poros en la membrana y permitir la entrada de calcio que activa a esta proteína generando ROS (**Figura R-4B**). La expresión de la proteína de Nox5 β se validó por SDS/PAGE-western-blot (**Figura R-4C**), y se cuantificó la viabilidad celular (**Figura R-4D**). Como era de esperar, a mayor MOI de AdNox5 β se observó mayor cantidad de proteína, aunque esto también produjo una mayor muerte celular.

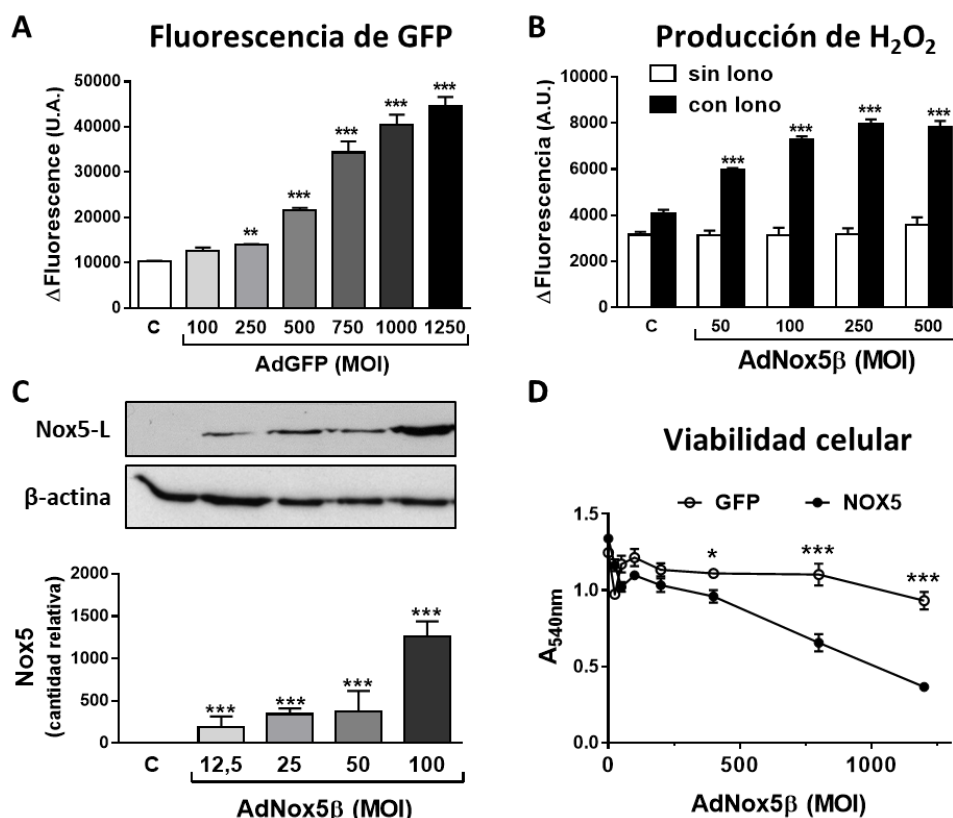


Figura R-4. Actividad, expresión proteica y viabilidad de células estelates hepáticas de rata, CFSC-2G, infectadas con adenovirus Nox5 β . (A) Puesta a punto de la infección en CFSC-2G mediante dosis crecientes del adenovirus GFP (AdGFP). Medida de la fluorescencia emitida por la proteína GFP en un lector de fluorescencia. Los datos representan la media \pm SD (n = 6). (***) p<0,001, frente al control. (B) Producción de peróxido de hidrógeno. Las células CFSC-2G se sembraron en placas de 96 pocillos y se infectaron con AdNox5 β desde 50 a 500 de MOI. Tras 24 h, las células se lavaron con HBSS-Hepes y se incubaron con Amplex red 50 μ M y HRP 0,1 U/ml. A continuación, se añadió ionomicina 1 μ M. La producción de peróxido de hidrógeno se midió después de 30 minutos en un lector de placas de fluorescencia. Los datos representan la media \pm SD (n = 3). (***) p<0,001, frente al control con ionomicina (Iono). (C) Expresión de Nox5 en células CFSC-2G infectadas con diferentes cantidades de AdNox5 β . Las CFSC-2G se infectaron con distintas cantidades (MOI 50-500) de AdNox5 β y al día siguiente se lisaron con el tampón RIPA para el análisis por western-blot. La expresión de la proteína se normalizó con respecto a la β -actina. Los gráficos muestran el nivel relativo de proteína entre las muestras de prueba y control. Los datos representan la media \pm SD (n = 3). (***) p<0,001; (*) vs. control. (D) Efecto de la sobreexpresión de Nox5 sobre la viabilidad celular en CFSC-2G. Las células fueron infectadas con AdNox5 β a diferentes MOI (25 a 800) y la viabilidad celular se midió después de 24 h. Los datos representan la media \pm SD (n = 6). (***) p <0,01, (***) p <0,001 frente a GFP.

Del mismo modo que con la línea de rata, pusimos a punto la infección en la línea humana de HSC, LX-2. Como ya sabíamos el rango de adenovirus para una infección óptima (10-100), medimos directamente la capacidad de las LX-2 infectadas con AdNox5 β de generar H₂O₂ extracelular. Se utilizaron MOI bajas para reducir el efecto sobre la viabilidad celular. De nuevo, la ionomicina indujo un aumento muy significativo de la actividad a MOIs crecientes, aunque en este caso sin ionomicina también hubo un pequeño aumento de actividad (**Figura R-5A**).

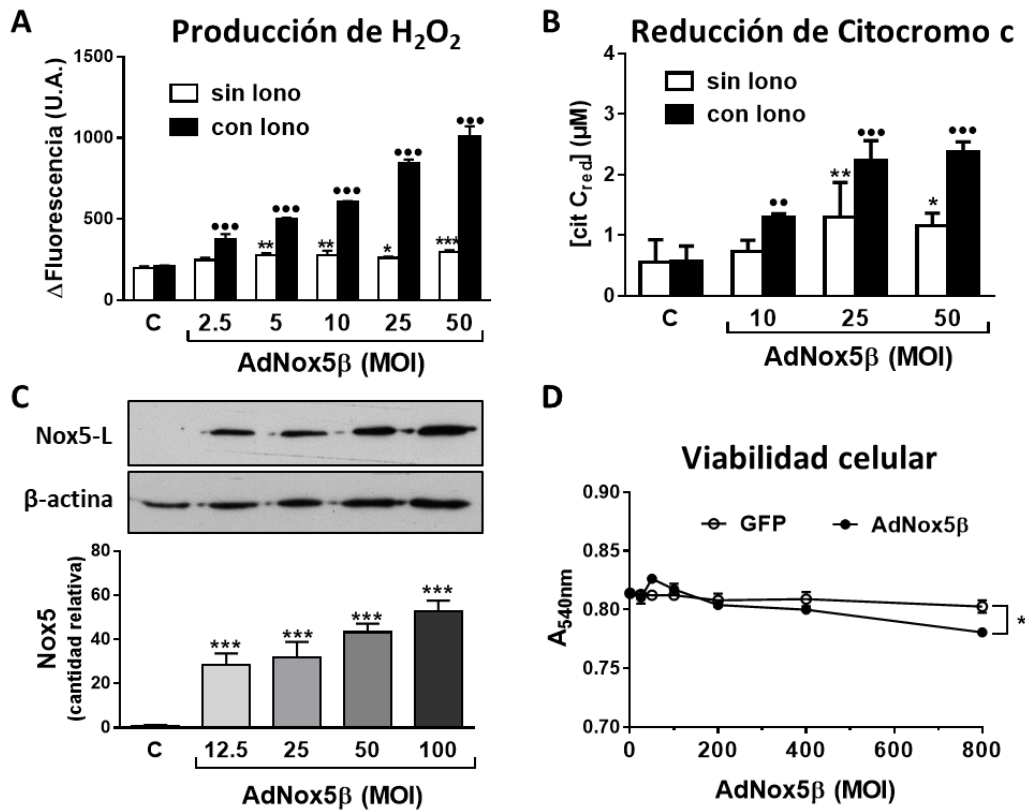


Figura R-5. Actividad, expresión proteica y viabilidad en células LX-2 infectadas con adenovirus Nox5 β (AdNox5 β). (A) Producción de peróxido de hidrógeno a distintas MOIs de adenovirus de Nox β . Las células LX-2 se sembraron en placas de 96 pocillos y se infectaron con AdNox5 β desde 2,5 a 50 de MOI. Después de 24 h, las células se incubaron con Amplex Red 50 μ M y HRP 0,1 U/ml y se añadió ionomicina 1 μ M. La producción de H₂O₂ se midió después de 30 minutos en un lector de fluorescencia. Los datos representan la media \pm SD (n = 3). (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001, frente al control; (•••) p<0,001, frente a control con ionomicina (lono). (B) Cuantificación de la producción de superóxido con el ensayo de reducción de citocromo c. Las células LX-2 se sembraron en una placa de pocillos de p6 y se infectaron con la MOI indicada con AdNox5 β . Después de 24 h, el medio se reemplazó con HBSS-Hepes que contenía 10 μ M de citocromo c de corazón del caballo con o sin ionomicina 1 μ M. Las células se incubaron durante 2 h y a continuación se midió la absorbancia del sobrenadante a 550 nm. Los datos representan la media \pm SD (n = 4). (*) p<0,05, (**) p<0,01, frente al control; (••) p<0,01, (•••) p<0,001, frente a control con ionomicina. (C) Expresión de la proteína Nox5 en células LX-2 infectadas con diferentes cantidades de AdNox5 β . Las células se infectaron con AdNox5 β a las MOI indicadas y se lisaron con el tampón RIPA para el análisis por western-blot. La expresión se normalizó con respecto a la β -actina. Los gráficos muestran el nivel relativo de proteína entre las muestras de prueba y control. Los datos representan la media \pm SD (n = 4). (***) p<0,001, frente al control. (D) Efecto de la sobreexpresión de Nox5 sobre la viabilidad de las células LX-2. LX-2 células fueron infectadas con AdNox5 β a diferentes MOI (25 a 800 de MOI) y la viabilidad celular se midió después de 24 h, como se indica [18]. Los datos representan la media \pm SD (n = 6). (*) p <0,05, frente a GFP.

Además, se midió el producto directo (superóxido) mediante la reducción de citocromo c (**Figura R-5B**) confirmando los resultados obtenidos con la producción de H_2O_2 . Por último, se midió la proteína y la viabilidad celular a dosis crecientes del adenovirus observando un claro aumento proteico y un ligero aumento de la muerte celular (**Figura R-5C y D**).

2.2. Generación del plásmido pcDNA3.2-Nox5 ϵ

Una vez puesto a punto las técnicas para medir ROS empleando la infección de la isoforma Nox5 β , quisimos saber qué ocurría con los niveles de ROS tras sobreexpresar Nox5 ϵ , ya que es la isoforma más expresada en la línea celular LX-2. Muchos autores asumen que Nox5 ϵ es una proteína inactiva, aunque existen otros estudios donde se demuestra que presenta actividad y que su sobreexpresión produce efectos funcionales. En nuestro caso, como no disponíamos del adenovirus para esta isoforma, decidimos sobreexpresar Nox5 ϵ empleando un plásmido de expresión. Para ello, generamos el plásmido de Nox5 ϵ a partir del plásmido pcDNA3.2-Nox5 β .

El plásmido pcDNA3.2-Nox5 β de 7642 pb está formado por el vector de expresión pcDNA3.2-GW y la isoforma β del gen Nox5 (**ver Figura M-1**). La caja de clonado de Nox5 β presenta un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor para bacteriófago T7, el gen de Nox5 β y una señal de poliadenilación. Al comienzo de la secuencia del gen de Nox5 β , existe un ATG que indica el comienzo de la transcripción para ese gen. Sin embargo, 462 pb más tarde aparece otro ATG que corresponde al comienzo de la transcripción para Nox5 ϵ (**Figura R-6**). Teniendo esto en cuenta, el objetivo fue eliminar un fragmento de caja de clonado que fuese desde el ATG de Nox5 β hasta el ATG de Nox5 ϵ y realizar todo ello en una sola etapa. Sin embargo, no había ninguna enzima de restricción que nos permitiese realizar esa estrategia, por lo que por una parte se aisló el plásmido y por otra el inserto para su procesamiento. Finalmente, con el vector pcDNA3.2-GW y con el inserto Nox5 ϵ aislados se procedió a su ligación.

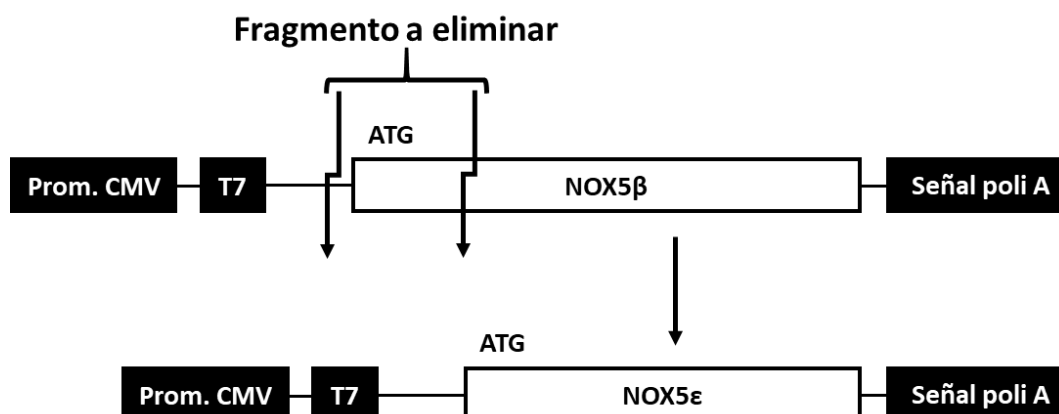


Figura R-6. Imagen ilustrativa de la secuencia a eliminar del plásmido pcDNA3.2-Nox5 β para la obtención de pcDNA3.2-Nox5 ϵ .

Para el aislamiento del vector, primero, se empleó la enzima BsrGI que contiene 3 puntos de corte: uno en la secuencia att1 del vector y dos dentro del inserto Nox5 β , produciéndose 3 fragmentos de 210 pb, 1684 pb y 5748 pb, todos ellos con extremos cohesivos (**Figura R-7**).

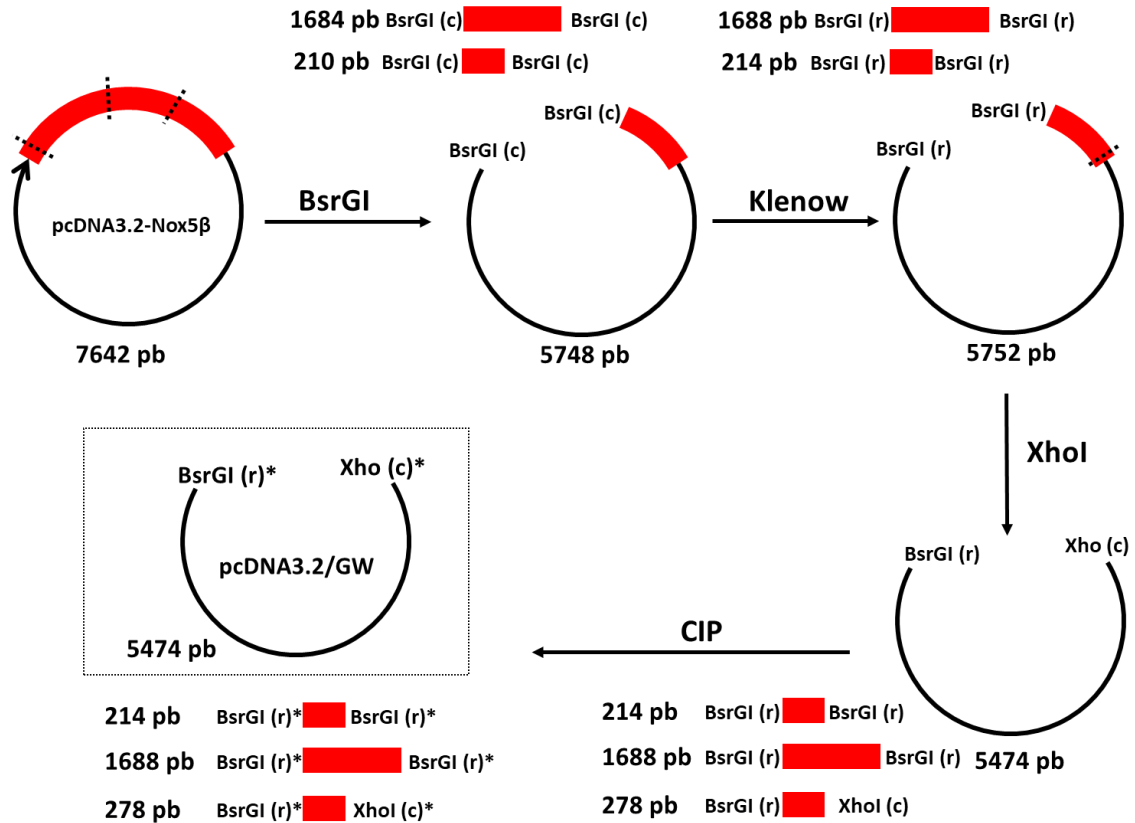


Figura R-7. Esquema de la estrategia empleada para la obtención del vector de expresión a partir del plásmido de partida pcDNA3.2-Nox5 β . Las líneas discontinuas negras representan los puntos donde van a actuar las enzimas. Partiendo de pcDNA3.2-Nox5 β se logró aislar el vector de expresión de 5474 pb tras un proceso mediado por BsrGI, Klenow, XhoI y CIP (desfosforilación representada con*). Los extremos romos y cohesivos producidos después de cada digestión se representan por (r) y (c), respectivamente.

Para facilitar la ligación final del vector e inserto de interés (Nox5 ϵ) de forma orientada, se diseñó una estrategia que generaba un extremo romo y uno cohesivo (5' protuberante) en el vector de expresión. Para ello, el producto de la digestión anterior se trató con el fragmento de Klenow que generó extremos romos (**Figura R-8A**). La última digestión se realizó con la enzima de restricción XhoI, eliminando el contenido de la caja de clonación de este plásmido y produciendo un extremo cohesivo. Se finalizó el proceso con CIP, la cual desfosforiló todos los extremos de los fragmentos obtenidos para que no se produjeran ligaciones indeseadas entre ellos. Después de cada digestión y tratamiento, los productos se purificaron mediante columnas de purificación de DNA para posterior análisis en gel de agarosa (**Figura R-8B**). Como se observa en la **Figura R-7**, al final del proceso se obtuvieron 4 fragmentos de 214 pb, 278 pb, 1688 pb y 5474 pb. Éste último fragmento contiene el vector pcDNA3.2-GW, el cual utilizaremos para la formación del plásmido Nox5 ϵ .

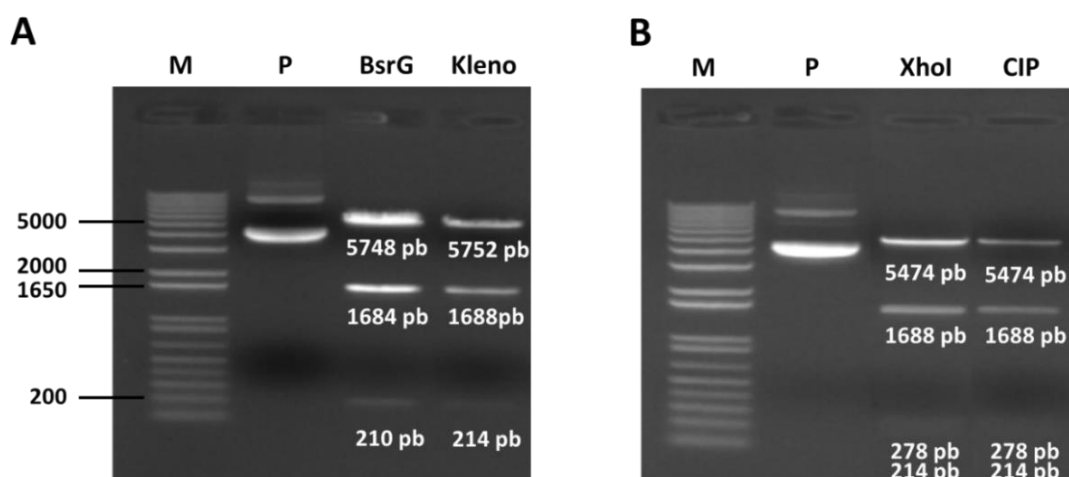


Figura R-8. Geles de agarosa realizados con el fin de validar las digestiones realizadas para el aislamiento del vector de expresión. **(A)** Análisis de la digestión tras el tratamiento del plásmido con las enzimas BsrGI y Klenow en gel de agarosa al 0,8%. **(B)** Análisis de la digestión tras el tratar el plásmido resultante de paso previo con las enzimas XhoI y CIP (fosfatasa alcalina de intestino de ternero) en gel de agarosa al 0,8%. M, marcador 1 kb DNA ladder; P, plásmido Nox5 β sin digerir.

El siguiente objetivo fue la obtención del inserto Nox5 ϵ a partir de Nox5 β (**Figura R-9**). Nox5 ϵ , a diferencia de las demás isoformas Nox5, no contiene los dominios *EF-hand* en el extremo amino-terminal, de manera que es 462 pb más corta que las demás.

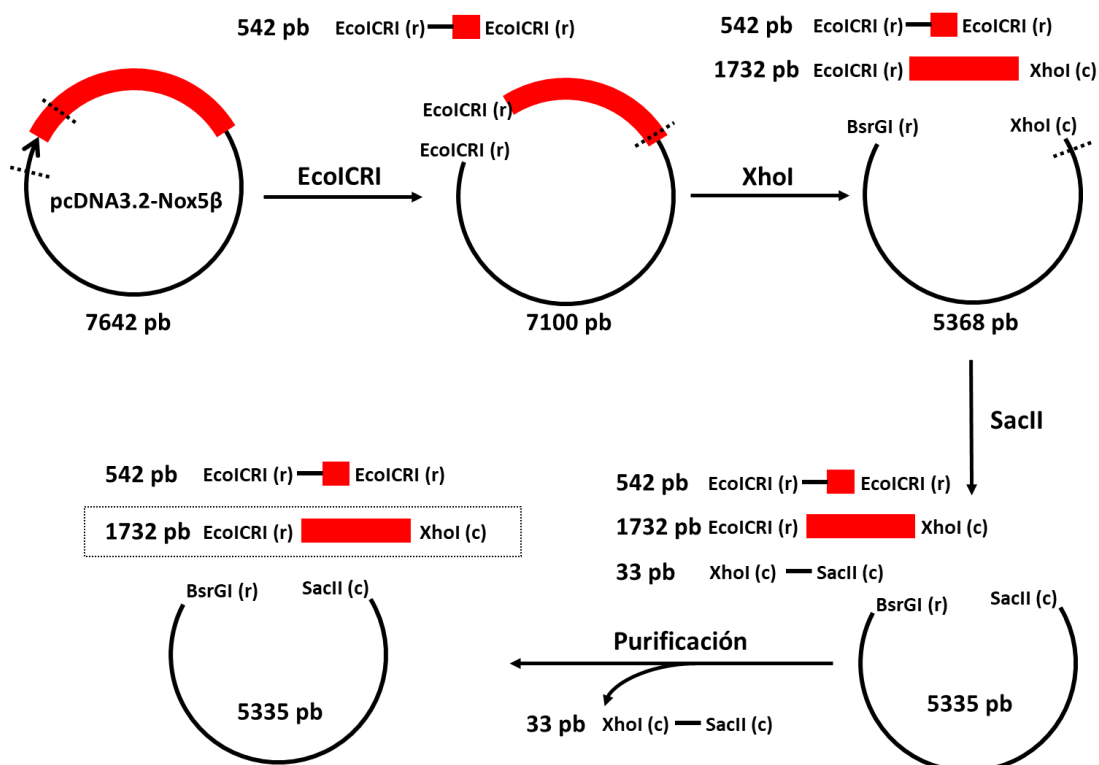


Figura R-9. Estrategia para la obtención del inserto Nox5 ϵ a partir del plásmido de expresión pcDNA3.2-Nox5 β . El vector y Nox5 β están representados en negro y rojo, respectivamente. Las líneas discontinuas negras representan los puntos de corte de las enzimas que van a actuar. Partiendo de pcDNA3.2-Nox5 β se logró aislar el inserto de 1732 pb tras un proceso mediado por las enzimas de restricción EcoICRI, XhoI y SacII y un paso de purificación por columna. Los extremos romos y cohesivos producidos después de cada digestión se representan por (r) y (c) respectivamente.

Para ello, primero, empleamos la enzima de restricción EcoICRI (**Figura R-10A**) que contiene 2 puntos de corte, uno dentro del vector y otro dentro del inserto (cerca del ATG de Nox5 ϵ). De este modo se generaron 2 fragmentos, uno de 542 pb que contenía el promotor T7 del vector y los dominios *EF-hand*, y otro de 7100 pb que incluía a Nox5 ϵ y al vector restante (**Figura R-10A**).

A continuación, para aislar por completo el inserto Nox5 ϵ del vector, se utilizó la enzima XhoI, que tiene un único punto de corte contiguo al codón de stop del inserto, liberando así un fragmento de 1732 pb que corresponde al inserto Nox5 ϵ y que tiene un extremo cohesivo (**Figura R-10B**).

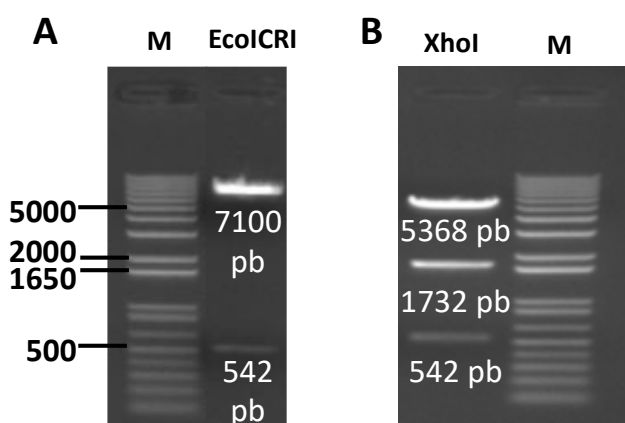


Figura R-10. Digestiones realizadas para el aislamiento del inserto de 1732 pb. Digestión del plásmido pcDNA3.2-Nox5 β con las enzimas EcoICRI (**A**) y XhoI (**B**). La digestión con SacII, ya que genera un fragmento de 33 pb no visualizable. M, marcador 1 kb DNA ladder.

Finalmente, para evitar una ligación indeseada entre los fragmentos de 1732 pb y 5368 pb se realizó un pequeño corte en uno de los extremos. El fragmento resultante debía ser de un tamaño menor a 100 pb para poder eliminarlo en la fase de purificación y así evitar la recircularización (**Figura R-9**). Para ello, se empleó la enzima SacII, la cual tiene un único punto de corte que generó un fragmento de 33 pb, como se observa en el esquema de la **Figura R-9**. Éste se eliminó en la purificación, ya que la columna de purificación de DNA elimina fragmentos menores de 100 pb, y así se impidió la recircularización del plásmido de partida. En un principio, en vez de utilizar la enzima SacII, se empleó XbaI, la cual debía producir un nuevo fragmento de 20 pb. Sin embargo, la Dam metilasa que presentaba la cepa XL1-Blue utilizada en el proceso de transformación de Nox5 β , metiló la diana para XbaI impidiendo así su corte.

Una vez obtenidos los productos deseados mediante las dos estrategias, se procedió a la ligación. Esta ligación se diseñó para obtener solamente el plásmido resultante de la unión del vector de 5474 pb y el inserto de 1732 pb (**Figura R-11**). Esto fue posible gracias a la eliminación del grupo fosfato de los extremos de los productos de la estrategia del vector (CIP), y a la formación de un extremo romo y cohesivo en los fragmentos de interés, posibilitando así la obtención de una ligación orientada (**Figura R-11**).

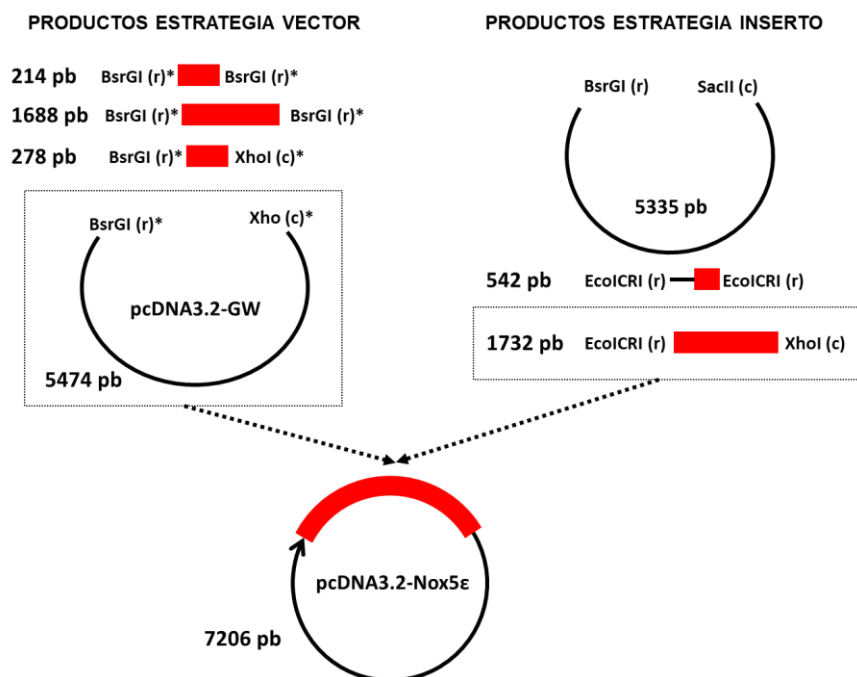


Figura R-11. Esquema de la ligación realizada. La ligación se produjo entre el fragmento de 5474 pb (pcDNA3.2-GW) y el fragmento de 1732 pb (Nox5ε). La desfosforilación y la compatibilidad de los extremos permitió de la ligación orientada.

Tras las ligaciones, se procedió a la transformación y se lograron un total de 17 colonias que podían contener pcDNA3.2-Nox5ε (**Figura R-12**). Se seleccionaron 11 de ellas (C1-11) y para comprobar que esas colonias contenían el plásmido, se diseñó una PCR dirigida a amplificar una región de 333 pb que incluía al promotor T7. El vector resultante del aislamiento de vector, a diferencia del vector resultante del aislamiento del inserto, presenta el promotor T7, por lo que solamente amplificarían las colonias que contienen este promotor en su vector. Como se observa en la **Figura R-12**, sólo una colonia mostró una banda de esa longitud.

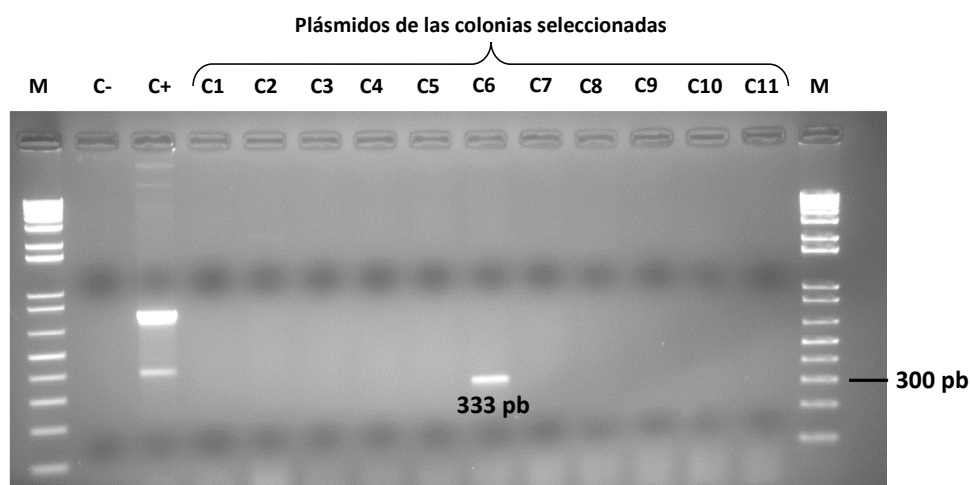


Figura R-12. Comprobación del plásmido por amplificación del promotor T7 por PCR. Únicamente el plásmido de una de las colonias seleccionadas mostró la banda de 333 pb, por lo que solamente este plásmido contenía la secuencia del promotor T7. M, marcador 1 kb DNA ladder; C-, control negativo (H₂O); C+, control positivo (plásmido Nox5β).

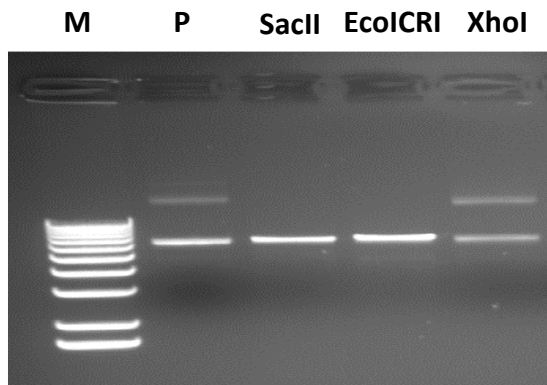


Figura R-13. Confirmación del plásmido de interés mediante enzimas de restricción. Digestión del plásmido obtenido tras la ligación con SaclI, EcoICRI y XhoI. Como se esperaba SaclI y EcoICRI hacen que el plásmido pierda su estructura superenrollada, ya que tienen un solo punto de corte en el plásmido. En el caso de XhoI, a pesar de tener un punto de corte teórico, el patrón obtenido es similar al plásmido sin digerir (P). M, marcador 1 kb DNA ladder; P: plásmido de la colonia sin digerir.

Una vez comprobado que por lo menos una colonia contenía el plásmido con el promotor T7, se realizaron digestiones individuales con SaclI, EcoICRI y XhoI para comprobar si podía tratarse del plásmido pcDNA3.2-Nox5ε (**Figura R-13**). Teóricamente, el plásmido Nox5ε solo incluye una diana para todas ellas. Como se observa en la **Figura R-13**, los resultados mostraron que SaclI y EcoICRI eran capaces de linearizar el plásmido debido al única diana que presentaban. En cambio, XhoI, con otra diana entre el inserto y el vector, no fue capaz de linearizar el plásmido.

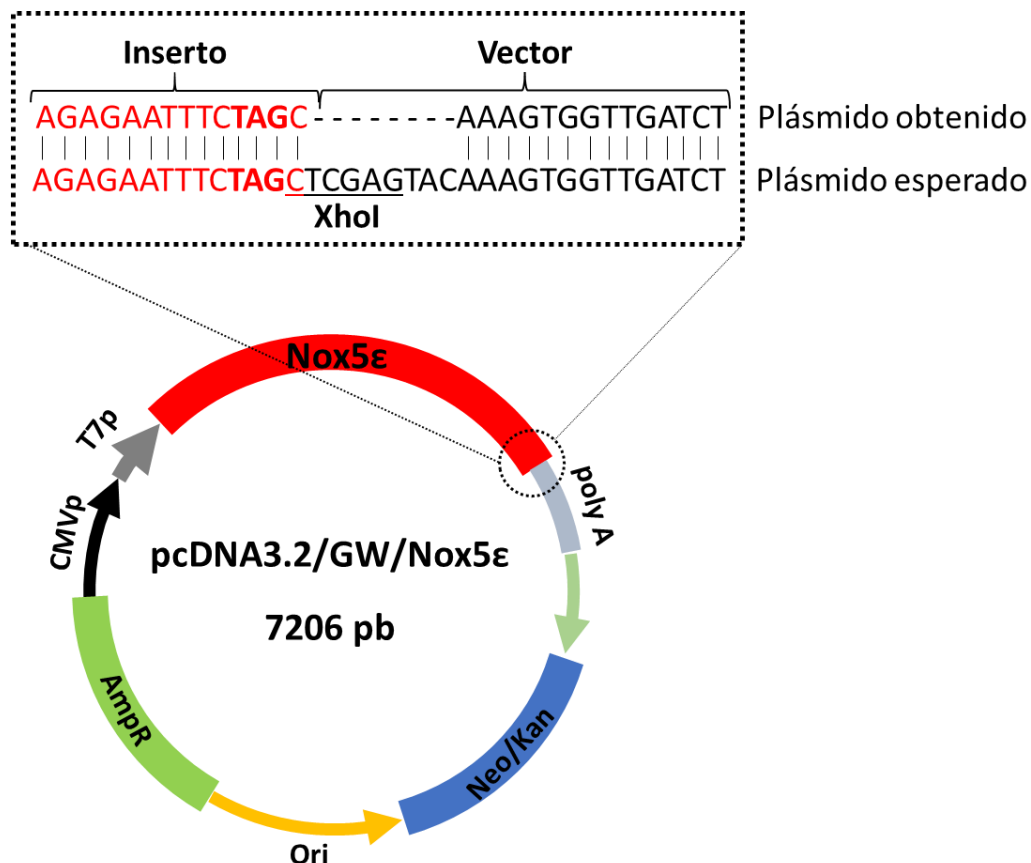


Figura R-14. Comprobación por secuenciación de la pérdida de la diana para XhoI. Comparación de la unión del inserto-vector del plásmido obtenido y esperado. Existe una pérdida de 8 pb donde se pierde la diana para XhoI (secuencia subrayada) sin afectar a ningún otro elemento.

Para averiguar por qué XhoI no cortaba, se realizó una secuenciación del plásmido. Con los resultados comparamos el plásmido secuenciado con el plásmido que esperábamos y se comprobó que toda la secuencia era la esperada menos la región de unión entre el inserto y vector en el extremo 5' de la hebra sentido (**Figura R-14**). Los resultados fueron claros y demostraron que en el proceso de subclonado se produjo una delección de 8 pb donde se perdió la diana para XhoI. Afortunadamente la pérdida de esos nucleótidos no afectó a la proteína, ya que se encontraban situados detrás del codón de terminación de la traducción (DNA: TAG, RNA:UAG). La secuenciación confirmó que el resto de la secuencia era la esperada.

2.3. Producción de ROS tras sobreexpresar Nox5 β y Nox5 ϵ en LX-2

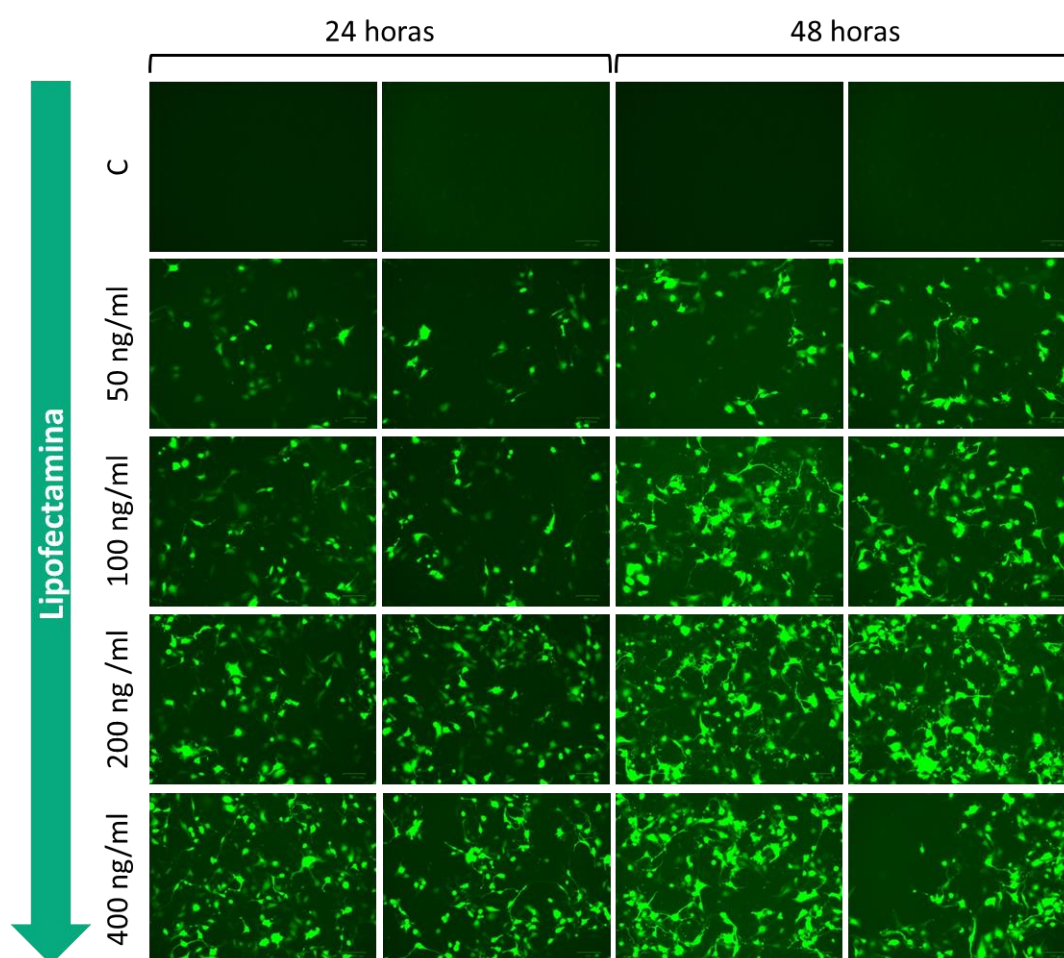


Figura R-15. Puesta a punto de la transfección en LX-2. Efecto de distintas cantidades de lipofectamina sobre la transfección del plásmido GFP en LX-2. Las células fueron transfectadas con 100 ng de GFP y cantidades crecientes de lipofectamina en proporción 1:0,5; 1:1; 1:2, y 1:4. Tras 24 y 48 h las células se visualizaron en el microscopio de fluorescencia (ZOE fluorescent cell imager, Bio-Rad).

Una vez generadas las herramientas para la transfección mediante plásmidos, realizamos la puesta a punto de la transfección en LX-2 mediante un plásmido que sobreexpresaba GFP. Para ello, las células se transfectaron con una cantidad fija de plásmido,

pero con distinta cantidad de lipofectamina (de 1:0,5 a 1:4). Además, la fluorescencia se midió a 24 y 48 h. Los resultados mostraron que a mayor dosis de lipofectamina mayor fluorescencia dando como resultado óptimo la relación entre 1:2 y 1:4 (**Figura R-15**).

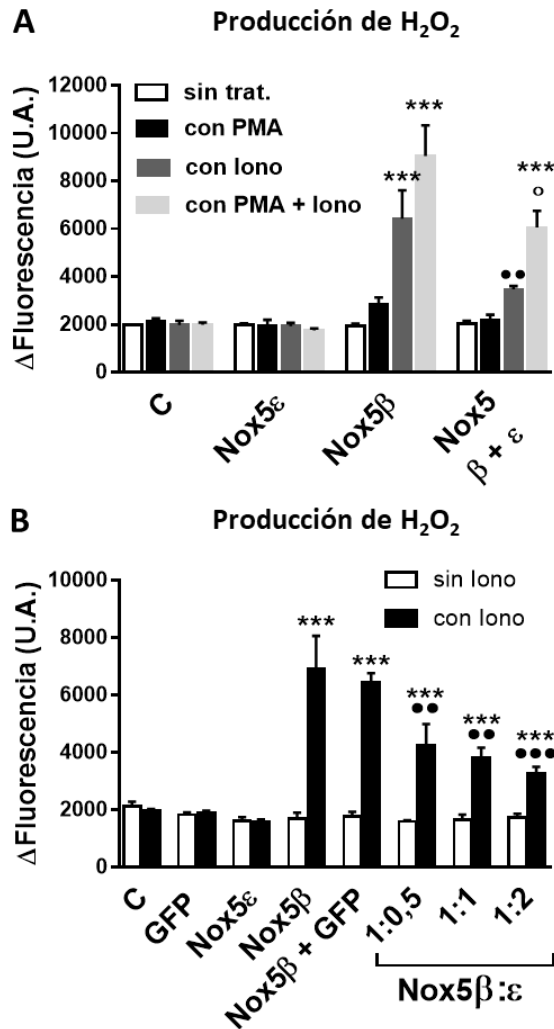


Figura R-16. Medida de la producción de peróxido de hidrógeno en células LX-2 transfectadas con plásmidos que codifican Nox5β, Nox5ε o con una combinación de ambos. (A) Se sembraron células LX-2 en placas de 96 pocillos y se transfectaron con plásmidos que codificaban Nox5β, Nox5ε o una mezcla de ambos (1:1). Después de 24 h, se pretrataron algunas células con PMA 200 nM, se lavaron e incubaron con Amplex red 50 μM y HRP 0,1 U/ml. Cuando se indica, al medio se le añadió 1 μM de ionomicina o no. La producción de peróxido de hidrógeno se midió después de 30 min en un lector de placas de fluorescencia. Los datos representan la media ± SD (n = 4). (***) p<0,001, frente a control; (••) p<0,01, frente a Nox5β con Iono; (○) p<0,05, frente a Nox5β con Ionomycin y PMA. **(B)** Efecto de Nox5ε en la producción de ROS por Nox5β. Las células se cultivaron y se transfectaron con plásmidos que codifican GFP (control negativo), Nox5β, Nox5ε o se cotransfectaron con Nox5β y diferentes cantidades de Nox5ε. Los plásmidos Nox5β y GFP se cotransfectaron en una relación 1:1. Después de 24 h, las células se lavaron y la producción de peróxido de hidrógeno se midió mediante el ensayo de Amplex red como antes en presencia y ausencia de 1 μM de ionomicina (Iono). Los datos representan la media ± SD (n = 3). (***) p<0,001, frente a GFP; (••) p<0,01, (•••) p<0,001, vs. Nox5β con Ionomycin.

Nox5 es una enzima que puede ser activada por Ca²⁺ y por fosforilación. La activación por calcio se consigue con la ionomicina ya que genera un poro en la membrana permitiendo la entrada y unión de Ca²⁺ a Nox5. En cambio, la fosforilación, se produce gracias al PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) que es capaz de activar rápidamente a la quinasa PKC fosforilando así en el extremo carboxi-terminal de Nox5. Por tanto, ambos por separado van a inducir la activación, pero en combinación el efecto está descrito que es aún mayor. Teniendo esto en cuenta, se realizó la infección de las LX-2 con los plásmidos Nox5β y Nox5ε solos y combinándolos. Nox5β, a diferencia de Nox5ε, indujo un aumento ligero de actividad con PMA, mayor con ionomicina y aun mayor combinado ambos tratamientos (**Figura R-16A**). Sin embargo, la isoforma corta de la Nox5 fue incapaz de generar ROS al carecer de los dominios *EF-hands*. Además, la cotransfección de Nox5ε con Nox5β bloqueó la fluorescencia emitida por ésta última (**Figura R-16A**). Con el fin de detallar mejor éste último fenómeno,

cotransfectamos Nox5 ϵ con distintas cantidades de Nox5 β , en proporciones de 1:0,5 hasta 1:2. Los resultados mostraron una disminución dependiente de la cantidad de Nox5 ϵ de la actividad de Nox5 β que de nuevo indujo un aumento significativo de ROS (**Figura R-16B**).

Viendo los resultados obtenidos, decidimos confirmarlos en otra línea celular y por ello, empleamos células embrionarias humanas de riñón, HEK293T. Esta línea celular es muy empleada para la técnica de transfección, ya que se transfecta muy bien y soporta grandes cantidades de lipofectamina. En esta línea celular también se realizó una puesta a punto de la cantidad de lipofectamina con el plásmido GFP, observando una mayor fluorescencia a mayor cantidad de lipofectamina (**Figura R-17A**). La relación cantidad de plásmido y cantidad de lipofectamina elegida fue de 1:2, es decir 100 ng de plásmido y 200 ng de lipofectamina. A continuación, se procedió a medir la producción de ROS tras sobreexpresar las células con los plásmidos, Nox5 β , Nox5 ϵ y una mezcla de ambos. Los resultados obtenidos confirmaron que Nox5 β producía grandes cantidades de ROS, mientras que la sobreexpresión de Nox5 ϵ no generó y además bloqueó la producción de H₂O₂ generada por la isoforma β (**Figura R-17B**).

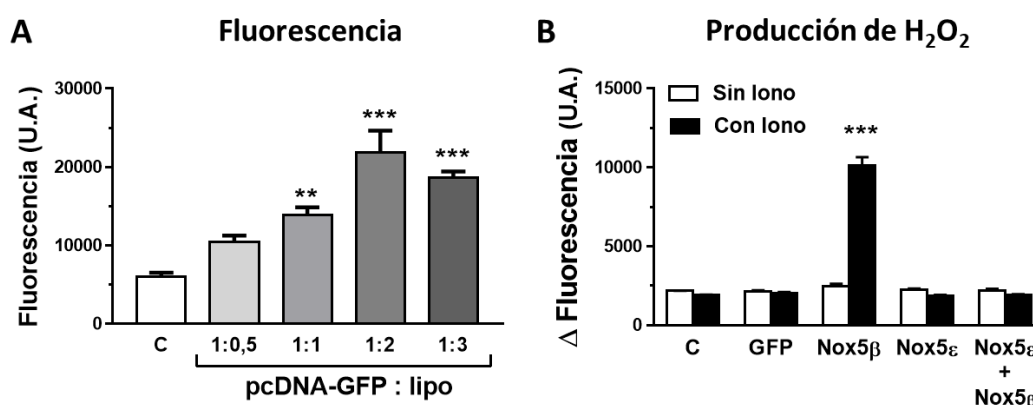


Figura R-17. Puesta a punto de la transfección con el plásmido GFP y medida de la producción de H₂O₂ tras sobreexpresar con Nox5 y Nox5 en células embrionarias de riñón, HEK293T. (A) Medida de la fluorescencia emitida por GFP tras sobreexpresar las HEK293T con distinta proporción de plasmido:lipofectamina. 10.000 células se sembraron en una placa p96 y tras 24 h, se transfectaron con el plásmido GFP, pero con distintas proporciones de lipofectamina (1:0,5-1:3). Al día siguiente, se cuantificó la fluorescencia en un lector de fluorescencia. La gráfica representa la media \pm SD (n=6), (***) p<0,001, con respecto al control. **(B)** Medida de producción de H₂O₂ extracelular después de sobreexpresar Nox5 β , Nox5 ϵ y una mezcla de ambos. Las células se sembraron de la misma forma que en A, pero se transfectaron con los plásmidos Nox5 β , Nox5 ϵ y con una mezcla de ambos en una relación plásmido:lipofectamina de 1:2. Tras 24 h, las células se lavaron e incubaron con Amplex red 50 μ M y HRP 0,1 U/ml. A continuación, el medio se le añadió ionomicina 1 μ M o no. La producción de peróxido de hidrógeno se midió después de 30 min en un lector de placas de fluorescencia. Los datos representan la media \pm SD (n = 3). (***) p<0,001, frente a control.

Para medir directamente la producción de superóxido utilizamos dos sondas, L-012 y citocromo c. Primero, medimos la producción de superóxido por L-012 midiendo en el tiempo la luminiscencia emitida por las células vivas transfectadas con Nox5 β , Nox5 ϵ y la cotransfección de ambas en presencia y ausencia de PMA (**Figura R-18A**). Ninguna de las condiciones mostró actividad significativa, pero sí a los 15 min cuando añadimos la ionomicina que aumentó instantáneamente la actividad o luminiscencia en el caso de Nox5 β

(Figura R-18A). Si las células transfectadas con Nox5 β eran pretratadas con PMA y tratadas con ionomicina a los 15 min, la luminiscencia perduró más en el tiempo (Figura R-18A) y generó más ROS que tratado sólo con ionomicina (Figura R-18B). Del mismo modo que con el Amplex red, las células transfectadas con Nox5 ϵ no generaron ROS e incluso bloquearon la producción debida a Nox5 β (Figura R-18B).

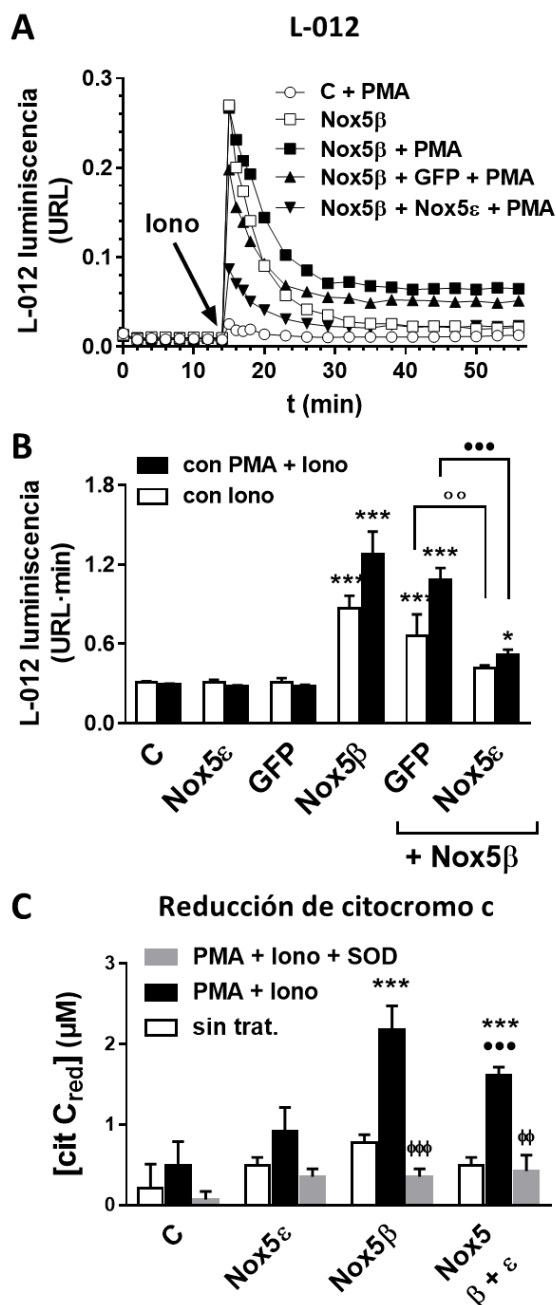


Figura. R-18. Producción de ROS por células LX-2 transfectadas con plásmidos que codifican Nox5 β y / o Nox5 ϵ determinado por luminiscencia (L-012) o por la reducción del citocromo c. (A) Para la luminiscencia con L-012, las células se sembraron y se transfectaron como en la Figura. R-16, pero usando placas blancas de fondo transparente. Después de 24 h, algunas células se pretrataron durante 15 min con PMA 200 nM como se explica en Material y Métodos, junto a L-012 500 μ M en HBSS-Hepes a cada pocillo y se registró la luminiscencia durante 14 min. A continuación, se añadió la ionomicina (Iono) 1 μ M y se midió la luminiscencia durante un total de 56 min. **(B)** Integración de la luminiscencia emitida por cada pocillo durante este tiempo. Los datos representan la media \pm SD (n = 3). (*) p < 0,05, (***) p < 0,001, frente a GFP; (oo) p < 0,01, frente a Nox5 β con ionomicina; (•••) p < 0,001, frente a Nox5 β con ionomicina y PMA. **(C)** La generación de anión superóxido se midió usando un ensayo de reducción de citocromo c con o sin SOD. Las células se sembraron en una placa de 24 pocillos y se transfectaron con plásmidos Nox5 β y Nox5 ϵ como se explica en Material y Métodos. Después de 24 h, las células se lavaron y el medio se reemplazó con HBSS-Hepes que contenía 10 μ M de citocromo c del corazón del caballo, PMA 200 mM y ionomicina 1 μ M, con o sin SOD 200 U/ml. Las células se incubaron durante 2 h en una incubador y a continuación se midió la absorbancia del sobrenadante a 550 nm. Los datos representan la media \pm SD (n = 3). (***) p < 0,001, frente a control; (•••) p < 0,001, frente a Nox5 β con ionomicina y PMA; (ΦΦ) p < 0,01, p < 0,001, frente a Nox5 β con ionomicina, PMA y SOD.

Paralelamente a los ensayos con L-012, se cuantificó la reducción del citocromo c en células LX-2 transfectadas con los plásmidos Nox5 β , Nox5 ϵ y la cotransfección de ambos en presencia y ausencia de PMA y ionomicina. Al igual que observamos con los dos ensayos anteriores, Nox5 β produjo un aumento significativo de superóxido, al contrario que Nox5 ϵ que no indujo e incluso bloqueó la actividad de Nox5 β (Figura R-18C). Además, para corroborar que la reducción del citocromo c era debida al anión superóxido se añadió la

superóxido dimutasa (SOD) al medio observando una total reducción de la actividad tanto en las células transfectadas con Nox5 β como en las cotransfectadas (**Figura R-18C**).

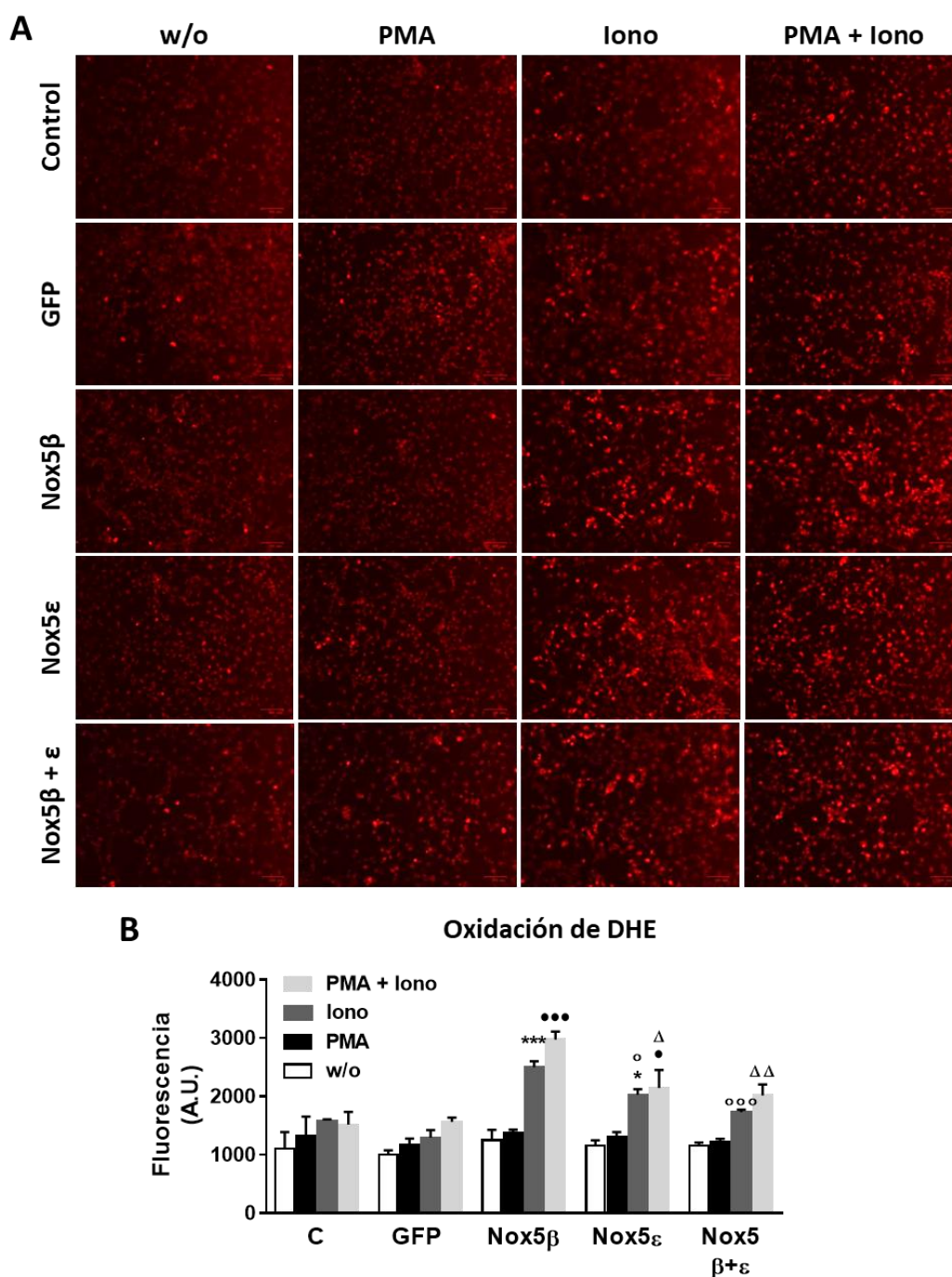


Figura. R-19. Oxidación de dihidroetidio tras sobreexpresar Nox5 β y Nox5 ϵ en LX-2. (A) Se sembraron células LX-2 en placas negras de fondo transparente de 96 pocillos y se transfectaron con plásmidos Nox5 β o Nox5 ϵ y con ambos a la vez. Después de 24 horas, las células se lavaron y se incubaron durante 20 minutos a 37 °C en la oscuridad en HBSS-Hepes que contenía DHE 10 μ M con o sin PMA 200 nM y ionomicina 1 μ M. A continuación, las células se lavaron con HBSS-Hepes y se capturaron las imágenes en un ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Se muestran imágenes representativas de tres experimentos. (B) Cuantificación de la fluorescencia emitida por el etidio. Los datos representan la media \pm SD (n = 3). (*) p<0,05, (***) p<0,001, frente a GFP con ionomicina; (•) p<0,05, (•••) p<0,001, frente a GFP con PMA e ionomicina; (o) p<0,05, (ooo) p<0,001, frente a Nox5 β con ionomicina; (Δ) p<0,05, ($\Delta\Delta$) p<0,01, frente a Nox5 β con PMA e ionomicina.

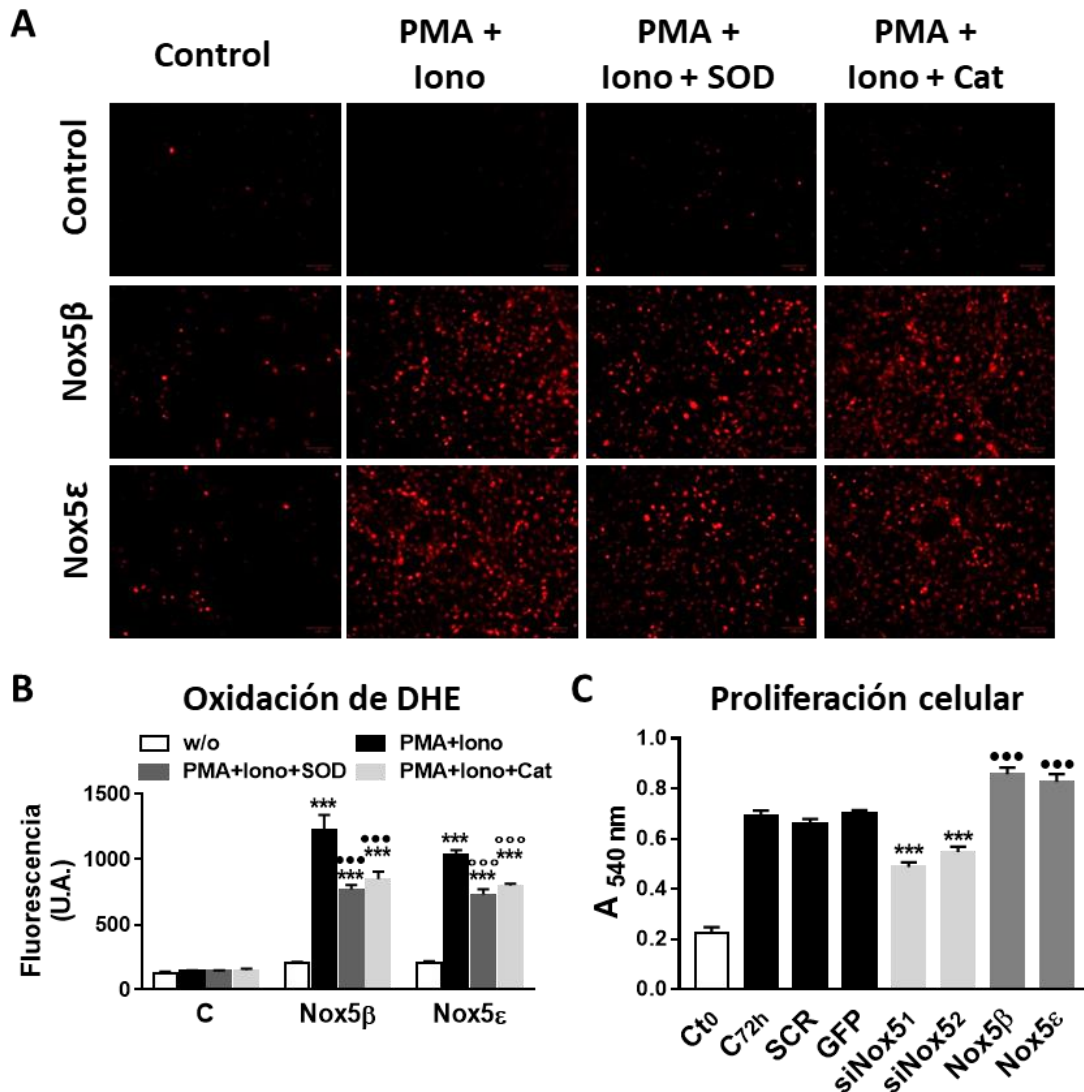


Figura R-20. Nox5β y Nox5ε estimulan la producción intracelular de ROS y la proliferación celular en HSC humanas. (A) Se sembraron y transfectaron las células con los plásmidos Nox5β o Nox5ε. Tras 24 h, las células se lavaron e incubaron con HBSS-Hepes que contenía DHE 10 μM con o sin PMA 200 nM y ionomicina 1 μM durante 20 min. A su vez, a algunos pocillos se les añadió SOD 100 U/ml o catalasa (Cat) 100 U/ml. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos. (B) Cuantificación de la fluorescencia emitida. Los datos representan la media ± SD (n = 6). (***) p<0,001, frente a control; (•) p<0,05, (•••) p<0,001, frente a Nox5β con PMA e ionomicina; (o) p<0,05, (ooo) p<0,001, frente a Nox5ε con PMA y ionomicina. (C) Efecto de la sobreexpresión de Nox5 o regulación negativa de Nox5 sobre la proliferación de células LX-2. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos y se transfectaron con 2,5 μg de plásmidos Nox5β o Nox5ε o con siRNA Nox5 30 nM (siNox5₁ o siNox5₂). Después de 24 horas, las células se tripsinizaron y se sembraron a 8.000 células /pocillo en medio completo en una placa de 96 pocillos (t = 0). Las células se cuantificaron al comienzo del experimento y 72 h más tarde para estimar el crecimiento celular. Los datos representan la media ± SD (n = 6). (***) p<0,001, frente a SCR (*scrambled*); (•••) p<0,001, frente a GFP.

Con los resultados obtenidos por Amplex red, L-012 y citocromo c confirmamos que Nox5β generaba superóxido, mientras que Nox5ε parecía ser una isoforma inactiva. Sin embargo, estos resultados no explicarían los efectos funcionales que provoca Nox5ε y han sido demostrados por algunos autores [169,181]. Por lo que decidimos ver lo que ocurría con la producción de ROS a nivel intracelular. Para ello, utilizamos la sonda dihidroetidio (DHE),

ya que el producto generado en la reacción presenta carga positiva y por tanto no puede difundir a través de la membrana.

Para ello, las células se transfectaron del mismo modo que antes y tras incubar las células con la sonda y tratamientos se sacaron fotografías de cada condición mediante un microscopio de fluorescencia (**Figura R-19A**). Los resultados mostraron que las transfecciones sin tratamiento y tratadas con PMA no inducían un aumento de la fluorescencia. En cambio, el tratamiento con ionomicina en presencia o ausencia de PMA aumentó significativamente la fluorescencia, tanto con la isoforma larga (Nox5 β) como al ser transfectados con Nox5 ϵ (**Figura R-19B**). Además, pudimos apreciar de nuevo un descenso significativo de la fluorescencia al contrafectar simultáneamente con ambos plásmidos, confirmando los resultados previos de que la isoforma corta es capaz de bloquear la producción de ROS generada por Nox5 β .

Con el fin de corroborar que este resultado era debido a la generación de ROS de forma intracelular, realizamos otro ensayo de DHE transfectando las células con ambos plásmidos, pero esta vez en presencia y ausencia de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (Cat). Como observamos en la **Figura R-20A y B**, de nuevo, al contrario que el control, Nox5 β y Nox5 ϵ aumentaron significativamente la fluorescencia al ser tratados con PMA y ionomicina. Además, la presencia en el medio de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (Cat) redujo parcialmente, pero no completamente la fluorescencia generada por ambos plásmidos confirmando la producción de ROS intracelular.

3. EFECTO DE NOX5 β Y NOX5 ϵ SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LX-2

A continuación, quisimos saber si la sobreexpresión o silenciamiento de Nox5 producía algún efecto funcional en las LX-2. En otros tipos celulares se ha demostrado que el aumento de expresión de Nox5 produce cambios en la proliferación celular, ya que relación directa entre el aumento de H₂O₂ y la inducción de la proliferación [169,181]. Por ello, decidimos cuantificar la proliferación inducida por Nox5 mediante el ensayo de incorporación de Rojo Neutro. Los resultados confirmaron que los plásmidos Nox5 β y Nox5 ϵ eran capaces de inducir levemente la proliferación demostrando que no existen diferencias al sobreexpresar una isoforma o la otra. Por el contrario, los siRNAs provocaron el efecto opuesto (**Figura R-20C**) confirmando de esta forma la relación existente entre Nox5 y la proliferación celular en LX-2.

4. INDUCCIÓN DE NOX5 POR TGF- β Y ANGIOTENSINA II

4.1. TGF- β y Angiotensina II inducen la expresión de Nox5

Otro objetivo que nos planteamos fue la búsqueda de estímulos fisiológicos que indujesen un aumento de la expresión de Nox5. Para ello, utilizamos una batería de estímulos

incluyendo lipopolisacárido, interferón- γ , endotelina 1 o hipoxia. La mayoría de ellos no varió la expresión de Nox5 de modo significativo, pero hubo dos que sí lo hicieron: el TGF- β y la Angiotensina II (Ang II). El tratamiento con TGF- β indujo tanto la forma larga (Nox5-L) como la corta (Nox5-S) de Nox5 observando una mayor inducción a una concentración de 1-2 ng/ml (**Figura R-21A**). Con la Angiotensina II, en cambio, la concentración de Nox5 aumentó de modo dependiente de la dosis (**Figura R-21A**).

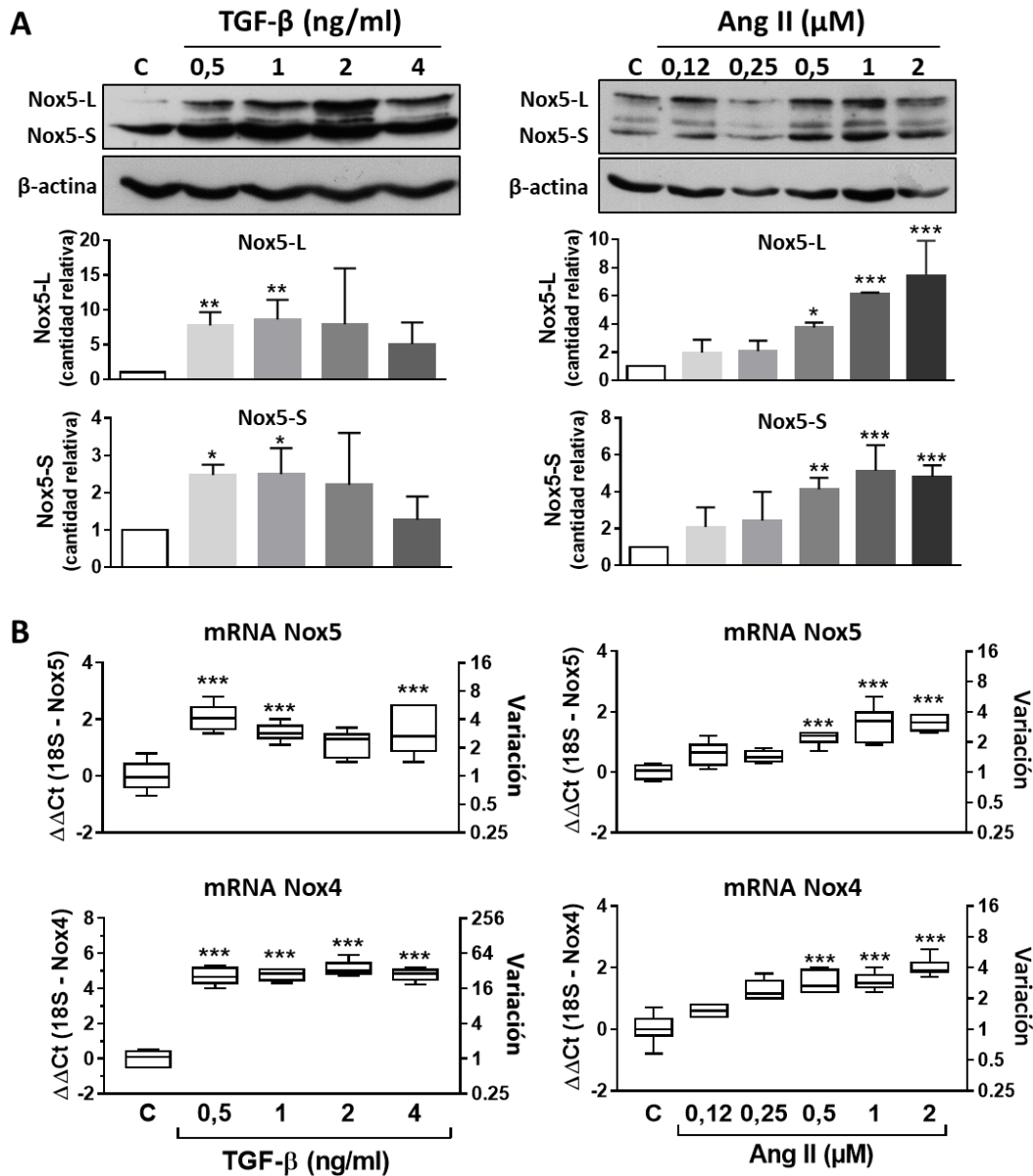


Figura. R-21. TGF- β y Angiotensina II inducen Nox5 en células LX-2. (A) Efecto del TGF- β y Ang II en la expresión de la proteína Nox5. Las células LX-2 se sembraron en placas de cultivo de 60 mm en medio completo, se trataron con diferentes concentraciones de TGF- β y Ang II durante 24 h y se lisaron para el análisis por western-blot. La expresión de proteína se normalizó con β -actina. Los gráficos muestran el nivel relativo de proteína entre las muestras a estudio y el control. Los datos representan la media \pm SD (n = 4). (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001, frente al control. (B) Efecto de TGF- β y Ang II en la expresión de mRNA de Nox5. Las células se trataron como antes y las células se lisaron con reactivo TRIzol. La RT-qPCR para Nox4 y Nox5 se realizó como se explica en Material y Métodos. La inducción de mRNA de Nox4 por TGF- β y Ang II se incluyó como control positivo. Los datos representan la media \pm SD (n = 6). (***) p<0,001, (*) vs. Control.

Además, se comprobó la inducción de Nox5 y Nox4 por TGF- β y Ang II determinando la expresión del mRNA por PCR cuantitativa (qPCR) (**Figura R-21B**). Los resultados mostraron que ambas citoquinas inducían 3-4 veces la expresión de Nox5, mientras que la expresión de Nox4, utilizada como control positivo, aumentó unas 20 veces tras el tratamiento con TGF- β y unas 4 veces tras el tratamiento con la Ang II (**Figura R-21B**)

4.2. Efecto de catalasa y antioxidantes sobre la inducción de Nox5

Zhou et al. [229] han descrito que el tratamiento con el H₂O₂ puede inducir la expresión Nox5 en células de adenocarcinoma de Barret, por lo que decidimos utilizar catalasa (Cat) para ver si afectaba a la inducción de Nox5 por TGF- β y Ang II.

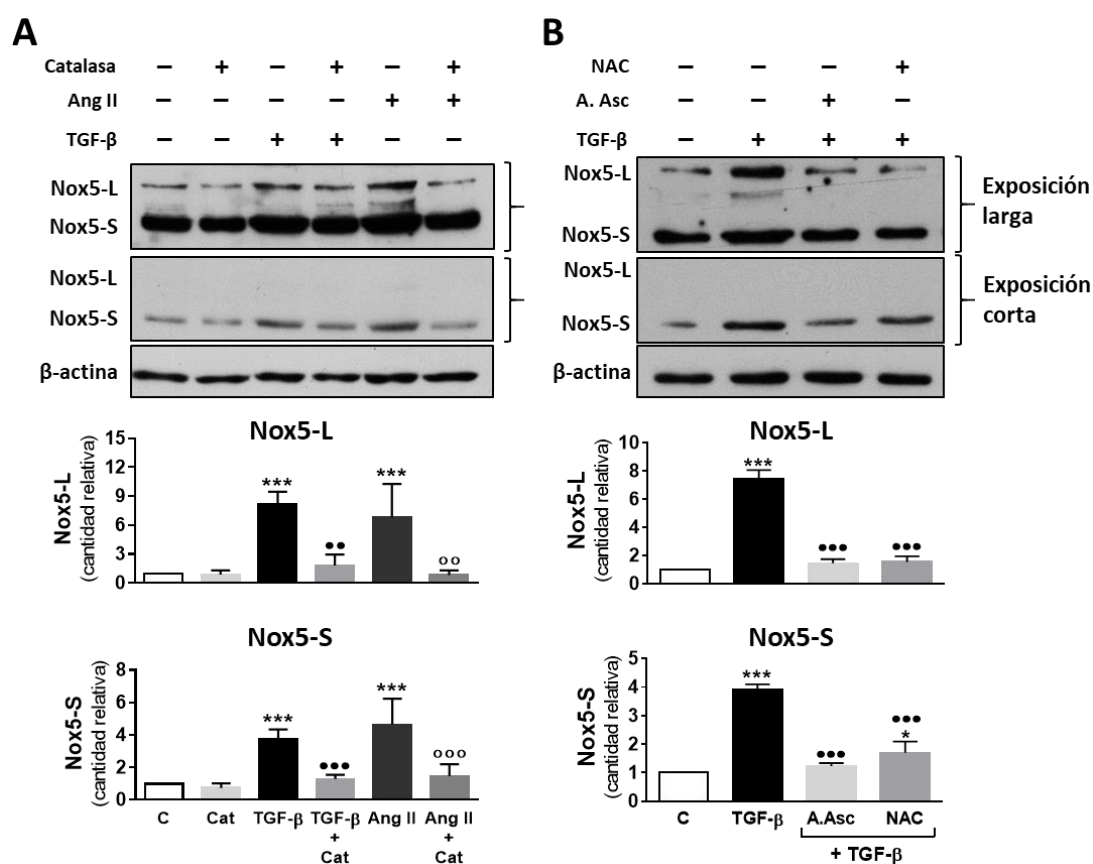


Figura R-22. Efecto de catalasa, ácido ascórbico y N-acetil cisteína en la inducción de Nox5. (A) La catalasa bloquea la inducción de Nox5 inducida por TGF- β y Angiotensina II. Las células LX-2 se cultivaron y se trataron en medio completo con TGF- β 1 ng/ml o Ang II 1 μ M durante 24 h en presencia o ausencia de catalasa (Cat) 200 U/ml. Al día siguiente, las células se lisaron y se midió la cantidad de Nox5 por western blot. La cuantificación de los niveles de Nox5-S y Nox5-L (panel inferior) se obtuvieron a partir de exposiciones cortas y largas, respectivamente. La expresión de proteína se normalizó frente a β -actina. Los gráficos muestran la cantidad relativa de proteína entre las muestras y el control. Los datos representan la media \pm SD (n = 4). (***) p<0,001, frente a control; (**) p<0,01, (***) p<0,001, frente a TGF- β ; (oo) p<0,01, (ooo) p<0,001, frente a Ang II. **(B)** Efecto del ácido ascórbico y N-acetil cisteína en la expresión de Nox5 inducido por TGF- β . Las células se trataron con A. Asc 5 mM y NAC 1 mM 1 h antes de ser tratadas con TGF- β . Tras 24 h las muestras se rascaron y procesaron de igual forma que en la parte A. Los datos representan la media \pm SD (n = 3). (*) p<0,05, (***) p<0,001, frente a control; (***) p<0,001, frente a TGF- β .

Los resultados mostraron que catalasa era capaz de disminuir totalmente la expresión de Nox5-L y Nox-S inducida por TGF- β y Ang II (**Figura R-22A**). Por tanto, parece que la inducción de TGF- β y Ang II en HSC ocurre vía H₂O₂. Para confirmar que la inducción de Nox5 estaba mediada por ROS, realizamos la inducción de Nox5 mediante TGF- β , pero esta vez en presencia de dos antioxidantes, ácido ascórbico y N-acetil cisteína. Como vemos en la **Figura R-22B**, los antioxidantes bloquearon casi totalmente la expresión de Nox5-L y Nox5-S corroborando la hipótesis de que el TGF- β y Ang II inducen Nox5 a través de la generación de ROS.

4.3. Nox5 no es inducida por la producción de H₂O₂ de Nox4

Los resultados obtenidos, por tanto, sugieren la participación de H₂O₂ en la inducción de Nox5 por TGF- β . Sin embargo, el origen de este ROS que es bloqueado en presencia de catalasa se desconoce. Una fuente posible podría ser Nox4, ya que esta variante se induce por TGF- β y Ang II. Además, el producto generado por Nox4 es H₂O₂, la misma molécula que elimina la catalasa e induce a Nox5. Con el fin de corroborar si Nox4 participaba en la inducción de Nox5, transfectamos las LX-2 con un siRNA específico para Nox4 y tras añadir TGF- β 1 ng/ml e incubar 24 h extrajimos el mRNA para cuantificar la expresión de Nox5. Los resultados de qPCR mostraron que el siNox4 no afectaba a la expresión de Nox5 en presencia o ausencia de TGF- β (**Figura R-23A**), por lo que parece que la inducción de Nox5 es independiente de la de Nox4.

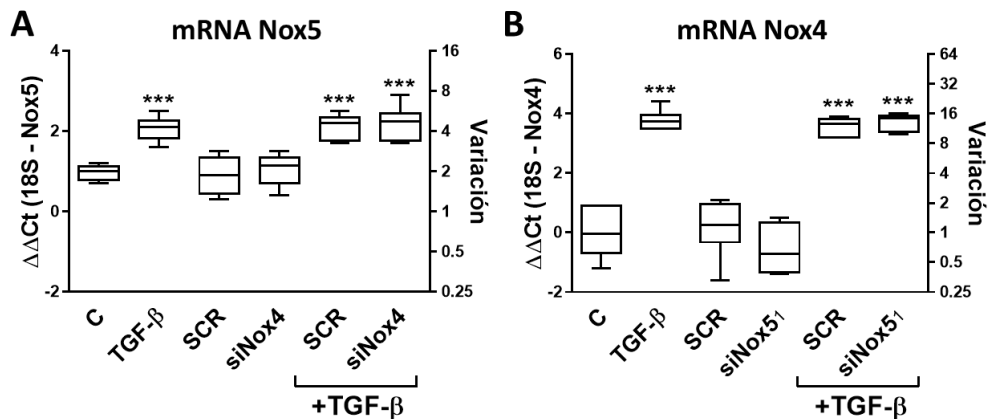


Figura R-23. El silenciamiento de Nox4 no afecta a la expresión de Nox5 y viceversa. (A) Silenciamiento de Nox4 para ver si afecta a la expresión de mRNA de Nox5. Las células LX-2 se sembraron en placas de cultivo de 60 mm en medio completo, se transfectaron con dos siRNAs: SCR (scrambled) y siNox4. Tras 24 h, añadimos TGF- β y al día siguiente se extrajo el mRNA para medir la expresión de Nox5 por qPCR. La expresión de Nox5 se normalizó frente a 18S. Los datos representan la media \pm SD (n = 6). (***) p<0,001; frente al control. **(B)** Silenciamiento de Nox5 y medida de expresión de Nox4. El procedimiento fue el mismo que en el apartado A, pero empleando el siRNA de Nox5 (siNox5₁) y midiendo la expresión de Nox5. La expresión de Nox5 se normalizó frente a 18S. Los datos representan la media \pm SD (n = 6). (***) p<0,001; frente al control.

Del mismo modo, para saber si Nox5 podría afectar a la expresión de Nox4 inducida por TGF- β , realizamos el mismo experimento que en la **Figura R-23A**, pero empleando el

siNox5₁ y midiendo por qPCR la expresión de Nox4. Como vemos en la **Figura R-23B**, el siRNA de Nox5, tampoco, afecto a la expresión de la Nox4.

5. EFECTOS PROFIBROGÉNICOS DE NOX5 EN LX-2

5.1. Inducción de colágeno por TGF- β y Angiotensina II

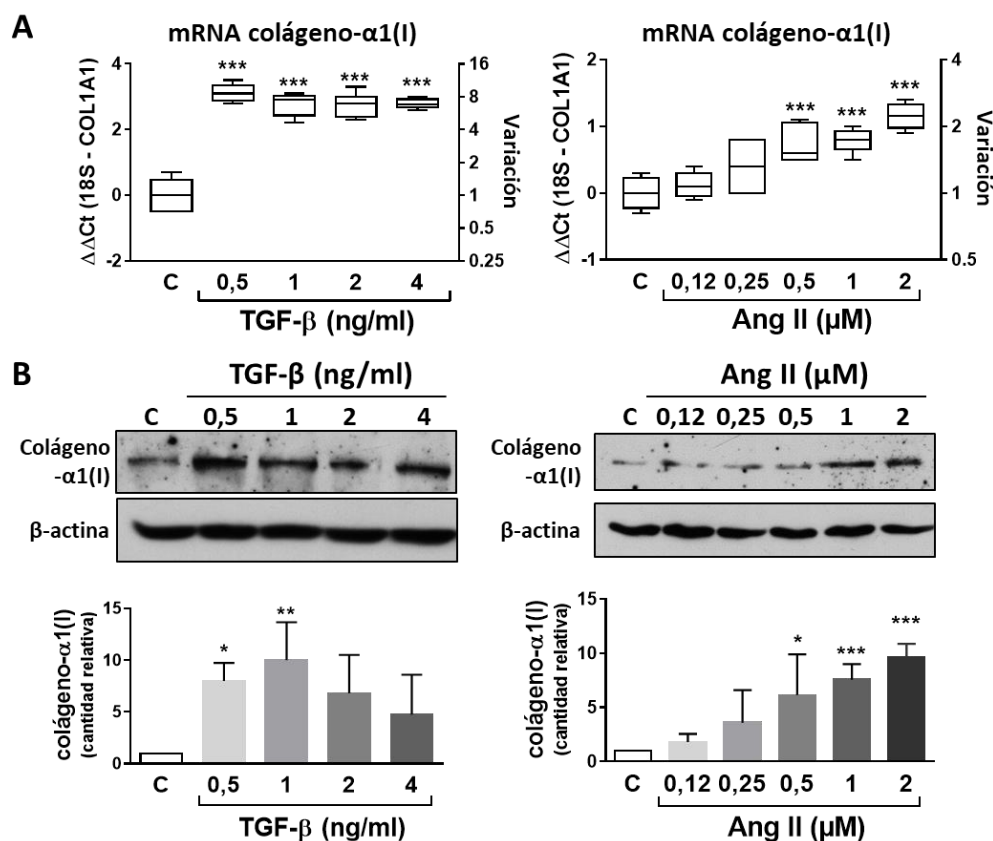


Figura R-24. Efecto del TGF- β y Ang II sobre la expresión de colágeno tipo I en células LX-2. (A) Efecto de TGF- β y Ang II sobre la expresión de mRNA de COL1A1. Las células se trataron como antes durante 24 horas y las células se lisaron con reactivo TRIzol para obtener el RNA. RT-qPCR se realizó con SYBR green como se explica en Material y Métodos y se normalizó a rRNA 18S. Los datos representan la media \pm SD (n = 6). (***) p<0,001; frente al control. **(B)** Efecto de TGF- β y Ang II sobre el nivel de proteína de colágeno tipo I. Las células LX-2 se sembraron en placas de cultivo de 60 mm en medio completo, se trataron con concentraciones crecientes de TGF- β y Ang II durante 24 h y se lisaron para el análisis de western-blot. La expresión de proteína se normalizó frente a β -actina. Los gráficos muestran el nivel relativo de proteína entre las muestras de prueba y control. Los datos representan la media \pm SD (n = 3). (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001; (*) vs. control.

Una vez demostrado que dos estímulos profibrogénicos, como son TGF- β y Ang II, inducían a Nox5, quisimos saber qué papel tenía esta variante en el desarrollo de la fibrosis hepática. Para ello, primero, cuantificamos la inducción del mRNA de COL1A1 por parte de estas dos citoquinas. El TGF- β aumentó 8 veces, mientras que la Ang II incrementó 2 veces la expresión de COL1A1 en LX-2 (**Figura R-24A**). Respecto a la expresión proteica, ambos factores aumentaron hasta 10 veces los niveles de proteína de procolágeno- α 1(I) en LX-2 (**Figura R-24B**). Cuando las células se cotrataron con TGF- β y dos antioxidantes, N-acetil

cisteína y ácido ascórbico, o con un inhibidor de la vía p38 MAPK (SB203580), los resultados mostraron que los tres compuestos eran capaces de bloquear total o parcialmente tanto la inducción de procolágeno- α 1(I) (**Figura R-25A**) como la activación de la vía p38 MAPK inducidos por TGF- β (**Figura R-25B**).

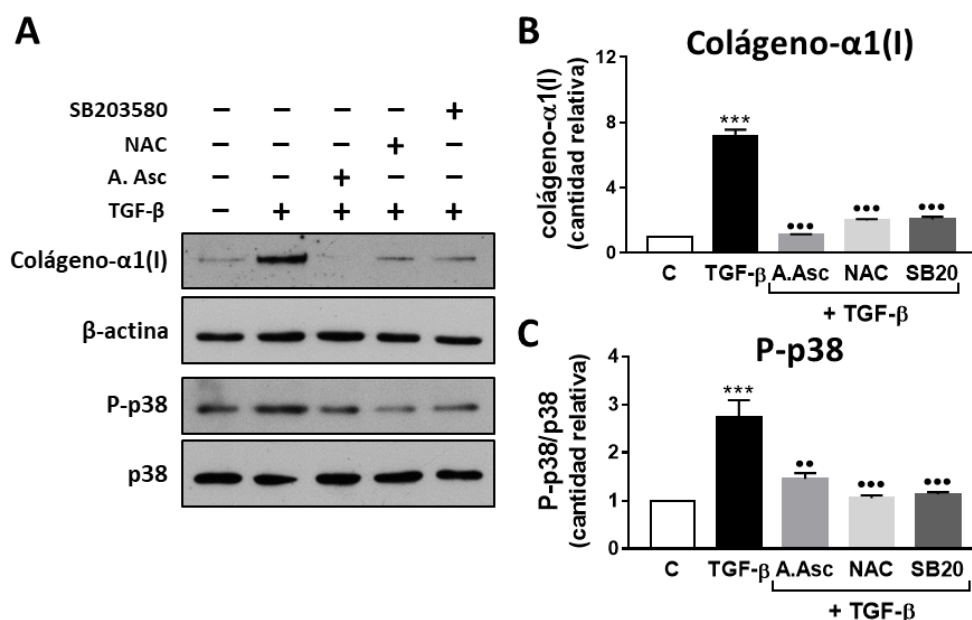


Figura R-25. Ácido ascórbico, N acetil cisteína y SB203580 revierten el efecto del TGF- β sobre la expresión de colágeno tipo I y la fosforilación de p38. (A) Imágenes de western-blot más representativas. **(B y C)** Las células fueron pretratadas con A. Asc 5 mM, NAC 1 mM y SB203580 20 μ M 1 h antes de ser tratados con TGF- β 1 ng/ml. En el caso de colágeno tipo I, las células fueron lisadas tras 24 h del tratamiento, mientras que para la p38 fosforilada las células se lisaron a las 3 h. La expresión de colágeno se normalizó frente a β -actina y la de P-p38 frente al p38 total. Los gráficos muestran el nivel relativo de proteína entre las muestras a estudio y el control. Los datos representan la media \pm SD (n = 3). (***) p<0,001, frente a control; (**) p <0,01, (***) p<0,001, frente a TGF- β .

5.2. Efectos del silenciamiento y la sobreexpresión de Nox5 sobre el colágeno

Para saber si Nox5 mediaba la síntesis de colágeno inducida por TGF- β , sembramos las HSC y silenciamos a Nox5 empleando siRNAs diseñados específicamente para esta variante (siNox5₁). Tras 24 h, añadimos TGF- β 1 ng/ml e incubamos otras 24 h para ver el efecto del silenciamiento sobre los niveles de expresión del mRNA y de la proteína de colágeno.

Los resultados de la PCR cuantitativa mostraron que el siRNA funcionaba correctamente disminuyendo la expresión de Nox5 en presencia y ausencia del TGF- β (**Figura R-26A**). Respecto a los niveles de mRNA de COL1A1, el siNox5₁, por sí sólo, no disminuía su expresión, al contrario que en combinación con TGF- β que revertía los niveles de COL1A1 inducidos por la citoquina (**Figura R-26B**). En el caso los niveles de proteína de colágeno, los resultados de western-blot validaron los datos obtenidos por PCR a tiempo real. El siRNA de Nox5 (siNox5₁), por sí sólo, no varió los niveles basales de proteína de procolágeno- α 1(I) (**Figura R-27A**). En presencia del TGF- β , en cambio, el silenciamiento redujo, parcialmente, los niveles de procolágeno- α 1(I) inducidos por la citoquina.

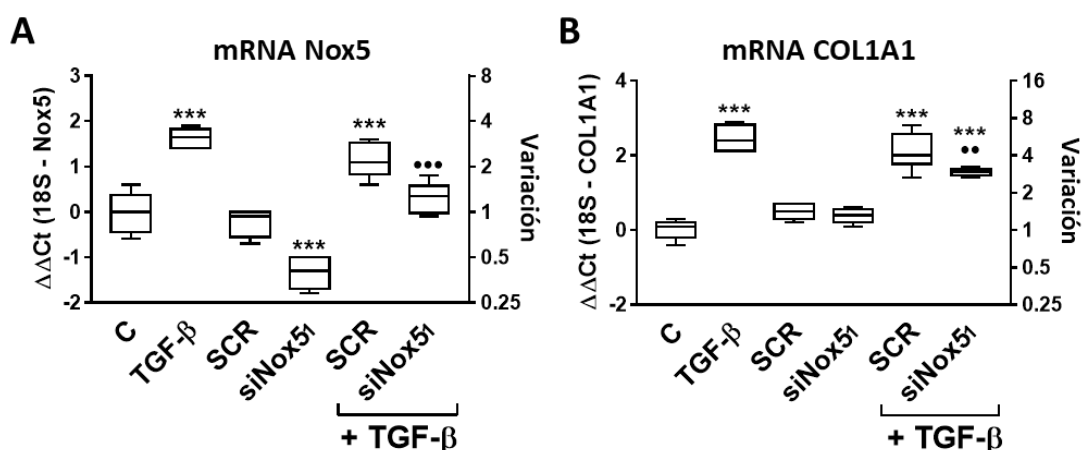


Figura R-26. El silenciamiento de Nox5 reduce los niveles de mRNA de Nox5 y colágeno tipo I en respuesta al TGF-β. (A y B) Cuantificación de la expresión de Nox5 y COL1A1 en LX-2, respectivamente, tras transfectar con siNox5₁ y tratar con TGF-β. Las células se transfectaron con siNox5₁ y luego se trataron con TGF-β 1 ng/ml durante 24 h. Después, las células LX-2 se lisaron con el TRIzol y se realizó una RT-qPCR para Nox5 y COL1A1. Los datos representan la media ± SD (n = 3). (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001, frente al control; (••) p<0,01, (•••) p<0,001; frente a TGF-β.

Si el silenciamiento de Nox5 reducía los niveles de colágeno inducidos por TGF-β, la sobreexpresión de Nox5 en LX-2 debería inducir un aumento de sus niveles. Para confirmar esta hipótesis, se sobreexpresaron Nox5β y Nox5ε transfecando sus plásmidos en HSC y se extrajeron las proteínas para realizar los western-blot. Los resultados obtenidos mostraron que la sobreexpresión de Nox5β y Nox5ε, inducía un aumento de los niveles de procolágeno-α1(I), pero no lo potenciaban en presencia de TGF-β (**Figura R-27B**).

A continuación, nos preguntamos si Nox5 modulaba la síntesis de colágeno tipo I a través de la vía canónica o no (vía Smad). Para ello, sembramos las células, silenciamos Nox5 mediante el siRNA y extrajimos los extractos proteicos a los 30 min. Los resultados mostraron que el silenciamiento de Nox5 no provocaba variación alguna de los niveles de fosforilación de Smad2 (**Figura R-28**).

Por consiguiente, decidimos observar qué ocurría en la vía no canónica de TGF-β. Realizamos el mismo proceso que con Smad2, pero, esta vez, extrajimos los extractos a las 3 h para medir la fosforilación de p38 MAPK. Los resultados mostraron que el silenciamiento de Nox5 bloqueaba parcialmente la fosforilación de p38 inducida por TGF-β (**Figura R-27A**). Sin embargo, los siRNA por sí solos no indujeron ningún cambio en P-p38. Por el contrario, tras sobreexpresar Nox5β o Nox5ε en LX-2, los niveles de fosforilación de p38 aumentaron en ambos casos, sin ver mayor efecto en combinación con la citoquina TGF-β (**Figura R-27B**).

Por tanto, estos datos sugieren que Nox5 media, en parte, los efectos fibrogénicos inducidos por la citoquina TGF-β en LX-2 a través de la vía p38 MAPK.

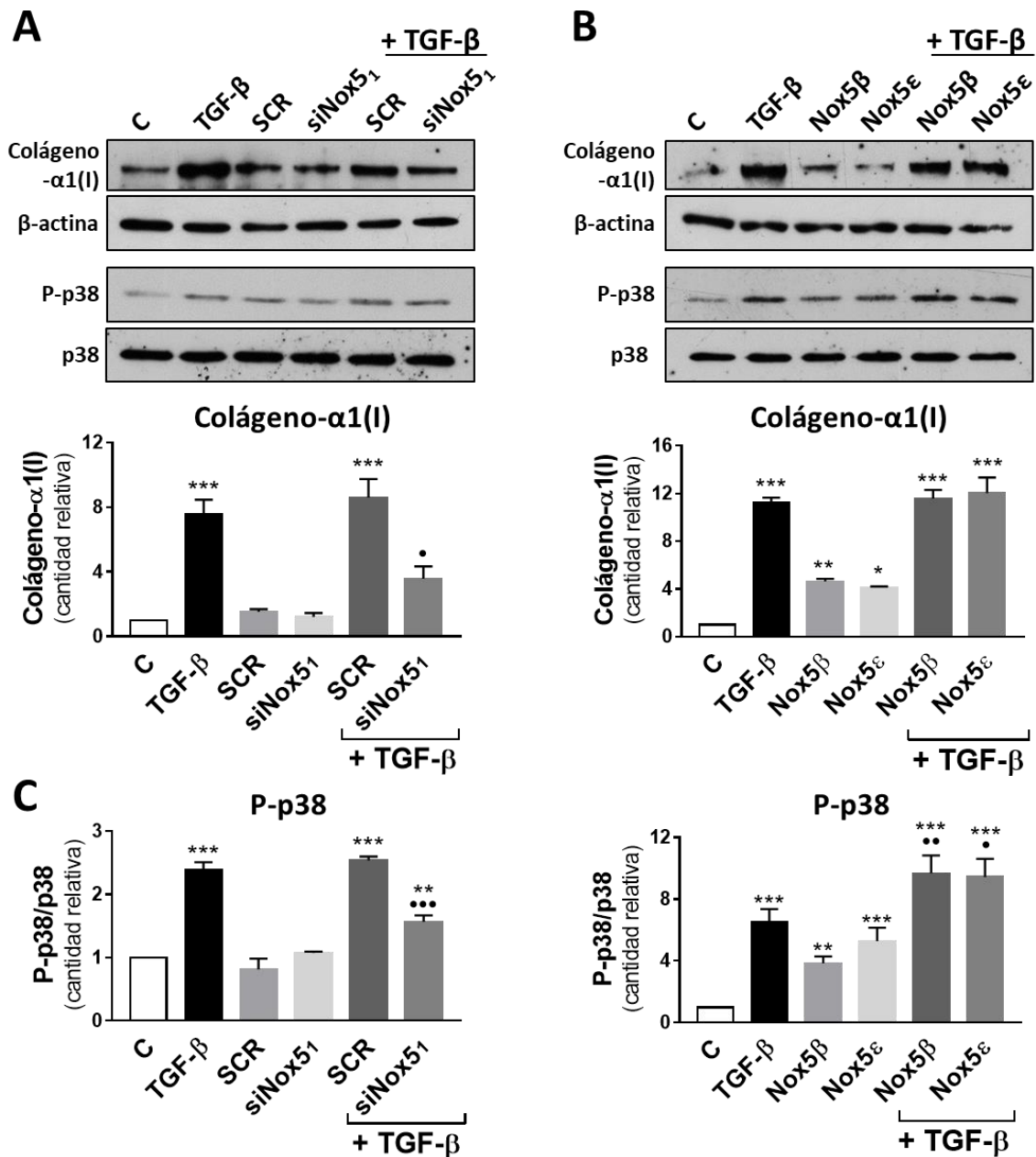


Figura R-27. Nox5 está implicado en la síntesis de colágeno-α1(I) inducido por TGF-β en células LX-2 humanas. (A) La reducción de Nox5 redujo la producción de colágeno en respuesta al TGF-β. Las células LX-2 se sembraron en placas de cultivo de 60 mm, se transfectaron con 30 nM de un siRNA no dirigido (scrambled, SCR) o siNox5₁ durante 24 h y luego se trataron con TGF-β 1 ng/ml durante 24 h. Las células se lisaron para el análisis mediante western-blot. La expresión de la proteína se normalizó con respecto a la β-actina. Los gráficos muestran la cantidad de proteína entre las muestras y control. Los datos representan la media ± SD (n = 4). (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001, frente al control; (•) p<0,05, frente al tratamiento con TGF-β. (B) La sobreexpresión de Nox5β o Nox5ε aumentó la síntesis de colágeno en células LX-2. Las células LX-2 se sembraron en placas de cultivo de 60 mm, se transfectaron con 5 μg de Nox5β o Nox5ε durante 24 horas y luego se trataron con 1 ng/ml de TGF-β durante 24 horas. Los datos representan la media ± SD (n = 3). (*) p<0,05, (**) p<0,01, (***) p<0,001, frente al control. (C) Efecto del silenciamiento o la sobreexpresión de Nox5 en la fosforilación de p38 MAPK. Las células se transfectaron como se explicó anteriormente y se midió P-p38 MAPK en LX-2 después de silenciar (siNox5₁) o sobreexpresar (Nox5β y Nox5ε) Nox5 antes de tratar las células con TGF-β 1 ng/ml durante 3 h. Los datos representan la media ± SD (n = 3). (**) p <0,01, (***) p <0,001, frente a control; (•) p <0,05, (••) p <0,01, frente al tratamiento con TGF-β.

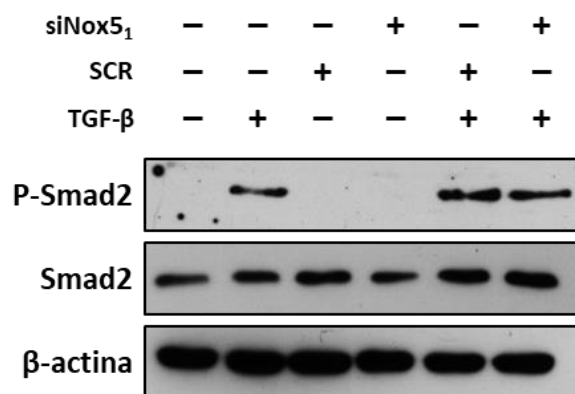


Figura R-28. El silenciamiento de Nox5 no afecta a la fosforilación de Smad2 inducida por TGF- β . Las células se sembraron y transfectaron con el siNox5₁ como se explica en el apartado de Material y Métodos. Al día siguiente, las células fueron tratadas con TGF- β 1 ng/ml y 30 min más tarde se rascaron para obtener el extracto proteico.

DISCUSIÓN

1. EXPRESIÓN DE NOX5 EN CÉLULAS ESTELARES HEPÁTICAS HUMANAS

Desde el descubrimiento de la gp91^{phox} en los años 80, las NADPH oxidasas han sido ampliamente estudiadas. Los trabajos publicados han mostrado que estas proteínas son enzimas cuya función intrínseca es la producción regulada y localizada de superóxido o peróxido de hidrógeno los cuales pueden proteger al organismo de patógenos, pero también ser los causantes de muchas de las enfermedades, como arteriosclerosis [230], hipertensión [231], alzhéimer [232], cáncer [233] e incluso enfermedades hepáticas [103,212]. En el caso de la fibrosis hepática, se ha visto que las Nox participan activamente en el desarrollo de la enfermedad generando aumento de ROS [103]. Estas especies reactivas median la progresión de la fibrosis hepática estimulando la producción de mediadores profibrogénicos a partir de células de Kupffer y células inflamatorias circulantes y activando directamente HSC induciendo su transdiferenciación a miofibroblastos [103]. Los miofibroblastos, a su vez, van a aumentar la expresión de las Nox incrementando la proliferación de estas célula y la síntesis colágeno tipo I [212].

Se ha descrito que los macrófagos expresan Nox2 [103] y Nox5 [180], mientras que los hepatocitos y las HSC expresan las variantes Nox1, Nox2 y Nox4 [103,234]. La expresión de Nox en HSC quiescentes es baja, aunque cuando existe un daño crónico las citoquinas secretadas hacen que su expresión aumente contribuyendo a la activación de estas células [103,218]. Aoyama et al. [217] han encontrado que tras la activación de las HSC la expresión del mRNA de Nox1 aumenta 4 veces y la de Nox4 16 veces. Además, los mismos autores afirman que la angiotensina II, una de las citoquinas secretadas durante la activación, induce un aumento de 4 veces en la expresión del mRNA de Nox1 y Nox4. Del mismo modo, Sancho et al. [102] han generado un modelo de HSC activadas observando un aumento de 3 veces en la expresión del mRNA de Nox1, de 5 veces la de Nox2 y de 7 veces la expresión de Nox4. A su vez, el mismo grupo ha visto que el TGF- β , citoquina secretada también durante la activación, duplica la expresión proteica de Nox1 y Nox2, mientras que aumenta 12 veces la de Nox4 tras 24 h de tratamiento [102].

Respecto a Nox5 se sabe muy poco acerca de su relevancia en la patología hepática, principalmente por la ausencia de este gen en los modelos murinos habitualmente utilizados para estudiar estas enfermedades. En este trabajo hemos estudiado el papel de esta variante en células estelares hepáticas humanas, en concreto en la línea celular inmortalizada LX-2. Esta es una línea celular no tumoral que ha sido muy estudiada, ya que conserva características clave de HSC, como la señalización por citoquinas, la expresión de genes neuronales, el metabolismo de los retinoides y la fibrosis, lo que la convierte en un modelo adecuado para estudios basados en cultivos de fibrosis hepática humana. Mediante PCR convencional hemos detectado que las células LX-2 basalmente expresan Nox2, Nox4 y Nox5.

No hemos podido detectar la variante Nox1 que está presente en otros modelos de HSC activadas, posiblemente debido a la baja expresión de esta variante en condiciones basales. Los resultados de PCR en tiempo real utilizando sondas Taqman mostraron que, en las mismas muestras, la expresión de Nox5 en LX-2 sin tratar, en estado basal, era mayor que la de Nox4, una variante esencial en del desarrollo de la fibrosis hepática.

El análisis de la expresión de las isoformas de Nox5 presentes en esta línea celular mostró que se expresaban tres formas largas (Nox5-L): Nox5 α y de Nox5 β y Nox5 δ . La expresión de la isoforma corta (Nox5-S) de Nox5 (Nox5 ϵ) no puede analizarse mediante PCR, ya que su secuencia está presente en el resto. Para dar respuesta a este problema nos planteamos la amplificación de los extremos o secuencias 5'UTR de las distintas variantes [227], pudiendo así diferenciar las distintas variantes por el tamaño sus extremos 5'. Mediante esta técnica pudimos identificar el amplicón de Nox5 ϵ , pero no el del resto de las isoformas. Los resultados de expresión de proteínas obtenidos por western-blot mostraron dos bandas diferenciadas: una de mayor tamaño (alrededor de 75 kDa) que supone un 10% del total de proteína de Nox5, y que corresponde a todas las isoformas largas de Nox5 (Nox5-L), y otra de menor tamaño (alrededor de 65 kDa) que constituye la mayor parte, alrededor de un 90% del total, y que corresponde a la isoforma Nox5-S o Nox5 ϵ . Además, el silenciamiento de Nox5 mediante siRNAs redujo significativamente la expresión del mRNA y de proteína de Nox5, confirmando que se trataba de esta proteína. En resumen, la línea celular LX-2 expresa principalmente Nox5-S o Nox5 ϵ y en menor medida Nox5-L. Este hecho explica el resultado obtenido de la amplificación de los extremos 5'UTR, ya que al ser la isoforma corta (Nox5 ϵ) la más expresada, y dado que el fragmento amplificado del extremo 5'UTR de esta isoforma tiene menor tamaño, se favorece su amplificación frente a las demás variantes de Nox5 obteniendo una sola banda en el gel de agarosa.

La expresión de distintas isoformas de Nox5 también ocurre en otros tejidos, como en muestras de riñón de pacientes con diabetes [179], donde se ha visto que hay un aumento de la expresión de Nox5 β . Del mismo modo, en muestras de arteria mamaria humana se ha encontrado que predomina la expresión de Nox5 α y de Nox5 β [169], mientras que el endotelio umbilical venoso las isoformas mayoritarias son Nox5 β y Nox5 δ [181]. En endotelio microvascular venoso humano también se ha detectado a Nox5 β y Nox5 δ y corresponden al 64% del total de Nox5 presente en este tipo celular. El resto, es decir el 36%, equivale a la expresión de la isoforma corta de Nox5 (Nox5-S), también llamada Nox5 ϵ [181]. Esta isoforma corta también está presente en muestras de pacientes con adenocarcinoma de Barret. De hecho, es la única que se expresa y es la encargada de generar ROS e inducir el aumento de la proliferación celular [202,229,235,236]. En otros tejidos, la presencia exacerbada de Nox5, también, desencadena efectos funcionales fisiopatológicos como cambios fenotípicos en podocitos [179], aumento de la apoptosis del endotelio [169], o un aumento de la proliferación de células musculares lisas [169] y células cancerosas promoviendo así metástasis del cáncer de mama [207].

2. ACTIVIDAD DE LAS DISTINTAS ISOFORMAS DE NOX5

Los resultados obtenidos muestran la presencia de Nox5-L y, sobre todo, de Nox5-S (Nox5 ϵ) en células LX-2. La presencia mayoritaria de la isoforma corta es llamativa, porque habitualmente se asume que es una isoforma inactiva debido a que carece de los 4 dominios *EF-hands* que permiten la activación de esta proteína por calcio [183]. De hecho, tras la infección de células musculares lisas con adenovirus que codifican para Nox5 β y Nox5 ϵ sólo se observa la generación de ROS en las células que expresan la isoforma larga [169], mientras que la isoforma corta no muestra actividad con ninguna de las técnicas empleadas por los autores.

Para saber si en HSC sucedía lo mismo, generamos dos plásmidos de expresión, uno que codifica para Nox5 β (una isoforma larga) y otro que traduce la proteína Nox5 ϵ o Nox5-S. Para medir la producción de ROS empleamos diversas técnicas. La primera sonda empleada fue el Amplex red, una molécula que es oxidada por la enzima peroxidasa (HRP) de rábano en presencia de H₂O₂. Esta técnica únicamente emite fluorescencia cuando existe la producción extracelular de H₂O₂, ya que la HRP no puede difundir a través de la membrana [226,237]. Otra técnica que empleamos fue el ensayo de reducción de citocromo c. Ésta es una técnica colorimétrica que se basa en la reducción del citocromo c por O₂^{•-} que únicamente mide la producción extracelular de este radical [238]. Con el fin de medir la producción intracelular de O₂^{•-}, decidimos utilizar también la sonda L-012. Esta molécula derivada del luminol reacciona rápidamente con el O₂^{•-} aumentando proporcionalmente la luminiscencia [239].

Teniendo esto en cuenta, realizamos las transfecciones de los plásmidos Nox5 β y Nox5 ϵ y cuantificamos su actividad con los ensayos descritos anteriormente. Con respecto a Nox5 β , como habían descritos otros autores [169,181,183] y de acuerdo a los datos obtenidos por los ensayos de Amplex red, citocromo c o L-012, observamos que la sobreexpresión de esta isoforma produce un aumento en la cantidad extracelulares de H₂O₂ y O₂^{•-} en presencia de ionomicina, y todavía el efecto es mayor al cotratarlo con PMA y ionomicina. Este aumento se cree que es debido a que el PMA activa a la PKC que a su vez fosforila a Nox5 β induciendo un cambio conformacional que hace que la unión por el calcio sea más eficiente, generando una cantidad de ROS mayor que si tratamos únicamente con ionomicina [183,184]. En el caso de Nox5 ϵ , ninguna de las técnicas fue capaz de detectar la generación extracelular de ROS por esta isoforma, ni en condiciones basales, ni en presencia de PMA y ionomicina. Incluso la cotransfección de este plásmido con Nox5 β bloqueó parcial o totalmente la generación de ROS producida por esta última. Algunos autores afirman que este hecho se debe a que Nox5 ϵ es capaz de oligomerizarse con las isoformas largas de Nox5 bloqueando su actividad [240]. Por tanto, los resultados parecían confirmar la hipótesis que afirman que esta enzima es inactiva y que puede oligomerizar con Nox5 β inactivándola [169,183].

Sin embargo, estos resultados no explican con los efectos funcionales observados por nosotros y otros autores con Nox5 ϵ [182,183,202,227]. De hecho, Pandey et al. [169] afirman que Nox5 ϵ es capaz de inducir cambios en la señalización celular, al igual que las isoformas largas, induciendo la proliferación celular. En nuestro caso, la sobreexpresión de Nox5 ϵ , también generó un aumento de la proliferación y síntesis de colágeno tipo I. Por tanto, ¿qué sentido tiene que una proteína sea inactiva, pero que induzca cambios funcionales?

Los resultados que hemos obtenido indican que tanto las técnicas de Amplex red [226], citocromo c [241] y L-012 miden principalmente la generación extracelular de H₂O₂ y O₂^{•-}. De hecho, la presencia de superóxido dismutasa (SOD) no permeable a través de membrana bloqueó totalmente la reducción de citocromo c. Sorprendentemente, observamos el mismo efecto con la sonda L-012. Para ver si estábamos en lo cierto o no, empleamos la sonda dihidroetidio (DHE), molécula que puede ser oxidada por el superóxido generando como producto 2-hidroxitidio que puede adentrarse en el núcleo, unirse al DNA y emitir fluorescencia [241]. El 2-hidroxitidio generado presenta carga positiva por lo que no difunde a través de la membrana por lo que esperábamos que su fluorescencia representara principalmente la generación de superóxido a nivel intracelular. Sorprendentemente la sobreexpresión tanto de Nox5 β como de Nox5 ϵ produjo un aumento en la fluorescencia, y la adición de SOD no permeable sólo redujo ligeramente la fluorescencia total (**Figura R-19**), confirmando que la técnica medía fundamentalmente la cantidad de ROS intracelular. Este resultado indica que la isoforma Nox5 ϵ genera ROS intracelularmente y es consecuente con los datos publicados por otros grupos que afirman que Nox5 ϵ , en su línea celular o modelo, genera un aumento de ROS induciendo cambios en la proliferación o en la supervivencia celular (175,237).

En resumen, la sobreexpresión de Nox5 β genera un aumento de ROS tanto intracelular como extracelular, posiblemente debido a que Nox5 β es activable por calcio y genera una cantidad de ROS mucho mayor que Nox5 ϵ . Además, hay que tener en cuenta que Nox5 se expresa principalmente en el espacio perinuclear, como el retículo endoplasmático [181]. La isoforma Nox5 ϵ generaría ROS, principalmente, dentro de la célula, y muy poco en el medio de cultivo. De hecho, parece que la sobreexpresión de Nox5 ϵ eleva ligeramente la reducción extracelular de citocromo c, si bien esta diferencia no es estadísticamente significativa (**Figura R-18C**). En la actualidad se desconoce cuál es el mecanismo de activación de Nox5 ϵ . Al carecer de los dominios *EF-hands*, no puede ser directamente activada por calcio, pero sí por proteínas que se activen al aumentar la concentración de este catión en el medio intracelular, como es el caso de la proteína quinasa C (PKC) y calcio/calmodulina quinasa II (CAMKII). El aumento de calcio en el citosol entre otras proteínas puede activar a PKC modulando de esta forma distintas rutas de señalización [242]. De hecho, Jagnandan et al [184] han demostrado que el PMA activa a PKC- β fosforilando a Nox5 en distintas serinas y treoninas situadas en el extremo carboxilo terminal y pudiendo modular su actividad. Respecto a CAMKII, Pandey et al [192] han demostrado que la CAMKII, proteína activada por

calcio y calmodulina, incrementa la actividad de Nox5 tras fosforilar a esta enzima en la Serina 475 situado también en el extremo carboxilo terminal. Por tanto, la fosforilación por CAMKII podría activar a Nox5ε induciendo un aumento de su actividad. Sin embargo, se sabe que estas modificaciones lo que hacen es aumentar la sensibilidad de la enzima al calcio, por lo que necesariamente debe haber otras proteínas responsables de la activación de Nox5ε.

En todo caso la hipótesis de que Nox5ε es una isoforma activa que genera ROS es apoyada por otros autores. BelAiba et al. [181] afirman que Nox5ε, al igual que Nox5β, genera ROS promoviendo la proliferación endotelial y finalmente la angiogénesis vascular. Además, Fu et al. [182] han descubierto que el cultivo de las células del adenocarcinoma de Barret a pH ácido genera un aumento de la oxidación del Amplex red y en la reducción del citocromo c, y por tanto, un incremento de ROS. Este aumento es parcialmente bloqueado al silenciar Nox5-S, indicando que esta enzima media este efecto. Además, entre las 6 isoformas existentes de Nox5, han descubierto que la encargada del aumento de ROS y aumento en la proliferación celular es Nox5ε, ya que es la única isoforma presente en este tipo celular.

En conclusión, podemos afirmar que las técnicas de Amplex red, citocromo c y L-012 miden principalmente los niveles extracelulares de ROS, mientras que la sonda DHE mide principalmente la producción intracelular de ROS. Además, analizando los resultados del DHE concluimos que Nox5ε, al igual que Nox5β, genera ROS intracelularmente. Este resultado afianza la hipótesis de que Nox5-S también es una isoforma activa [181,182]. Paradójicamente parece que el efecto biológico de Nox5 no depende de cuál sea la isoforma concreta expresada, ya que tanto la forma corta como las largas parecen producir los mismos efectos. El mecanismo de activación de Nox5ε se desconoce, aunque ionomicina y PMA podrían desencadenar cascadas de señalización dentro de la célula capaces de activar a Nox5ε.

3. POSIBLE RELEVANCIA DE NOX5 EN LA FIBROSIS HEPÁTICA

Diversos autores han descrito que las NADPH oxidasas tienen un importante papel en la etiopatogenia de diversas enfermedades, incluida las enfermedades hepáticas. Actualmente, se cree que Nox1, Nox2 y Nox4 son esenciales para el desarrollo de la fibrosis hepática. Esto se conoce gracias a trabajos donde han estudiado el papel que juegan Nox1 y Nox2 en la fibrosis hepática en ratones *Knock out* (KO) [218]. Estos ratones sufren un descenso de la expresión de α-SMA, de colágeno tipo I y de secreción de TIMP-1, desencadenando una menor activación de las HSC y una reducción de la fibrosis hepática inducida por CCl₄ o ligadura del conducto biliar. Además, Lan et al. [220] han obtenido sendos ratones KO de Nox1 y de Nox4 que han sometido a tratamiento con CCl₄ para generar la fibrosis hepática. De estos estudios concluyen que la ausencia de expresión de Nox1 y Nox4 produce una atenuación de la expresión de α-SMA, de desmina, de enzimas hepáticas, de genes relacionados con la inflamación y un descenso de los niveles de colágeno. Además, las

HSC obtenidas de estos ratones presentan una menor expresión de genes relacionados con la proliferación, como ciclina D1, Bcl-2, PCNA y PDGFRB, y una menor expresión de genes relacionados con la fibrosis, como son el colágeno, el TIMP-1 y el TβRII. Del mismo modo, la administración del inhibidor de Nox1 y Nox4, GKT137831 a ratones con ligadura del conducto biliar, se traduce en menores cantidades de proteínas relacionados con la fibrosis, como α-SMA, colágeno tipo I y TGF-β [221]. Todos estos trabajos confirman la importancia de Nox1, Nox2 y Nox4 en la fibrosis hepática.

Se conoce poco de la posible implicación de Nox5 en la fibrosis hepática, principalmente porque esta enzima está ausente en roedores y, por tanto, los modelos tradicionales de enfermedad de ratón o rata ignoran la posible relevancia de esta isoenzima [243]. En este trabajo hemos encontrado que la sobreexpresión de Nox5β o de Nox5ε induce la proliferación de HSC humanas, mientras que el silenciamiento de Nox5 mediante siRNAs específicos la inhibe. La inducción de la proliferación causada por Nox5 puede ser un hecho relevante, ya que la inducción de la proliferación de las HSC conduce finalmente en una mayor síntesis de colágeno tipo I y, por tanto, a una mayor fibrosis [37]. Otros grupos han descrito que la sobreexpresión de Nox5 en otros tipos celulares produce un aumento de la proliferación celular. BelAiba et al. [181] afirman que tanto Nox5β como Nox5ε inducen un aumento del 20-30% de la proliferación de células endoteliales promoviendo la angiogénesis. Por el contrario, el silenciamiento de Nox5 mediante siRNA atenúa la proliferación inducida por la trombina. A su vez, la sobreexpresión de Nox5β y Nox5ε en células musculares lisas induce un aumento del 15% y del 30%, respectivamente, de la proliferación celular [169]. Esta relación entre Nox5 y la proliferación celular también se ha descrito en células cancerosas, como el adenocarcinoma esofágico [182,227], próstata [244] y mama [207].

Probablemente, el efecto proliferativo de Nox5 sea debido al aumento de ROS que genera, y en particular a la generación de bajas concentraciones de H₂O₂, que desencadenan la activación de vías de señalización relacionadas con el estrés oxidativo, como se ha demostrado en células musculares lisas [169], en fibroblastos de pulmón y en células epiteliales [245]. Se ha visto que un incremento en la concentración de H₂O₂ puede actuar oxidando grupos SH de cisteínas de tirosina fosfatasa, activando de este modo las vías de señalización relacionadas con la proliferación celular, como es el caso de ERK [246]. Además, el H₂O₂, también, podría oxidar factores de transcripción, como AP-1 o c-myc, modulando su unión al DNA y activando la proliferación de las HSC. Por tanto, es probable que cualquier estímulo que induzca un aumento de Nox5 promueva la proliferación celular de las HSC vía P-ERK o factores de transcripción. Por otra parte, Nox5 podría mediar el efecto mitogénico de algunas citoquinas. En el desarrollo de la fibrosis hepática, la inducción de la proliferación ocurre principalmente gracias a la secreción de citoquinas, entre las que destaca el PDGF, el principal mitógeno de este tipo celular. En este sentido se ha descrito que Nox5, y no Nox4, media el efecto proliferativo del PDGF en células musculares lisas de aorta humana [171].

Otro descubrimiento relevante en este trabajo relacionado con la fibrosis hepática es la capacidad de dos citoquinas profibrogénicas, TGF- β y Ang II, de inducir la expresión de Nox5. La inducción de Nox5 por Ang II ya había sido descrita anteriormente en células endoteliales humanas [170]. En estas células Ang II duplica la expresión de Nox5 generando aumento de ROS, que promueve la fosforilación de ERK y en último término la proliferación celular. Pandey et al. [169] han encontrado un resultado similar en células musculares lisas vasculares, aunque en este caso miden únicamente la expresión del mRNA de Nox5 que se triplica. El tratamiento con Ang II también induce Nox5 en podocitos humanos [179]. Respecto al TGF- β , el efecto de esta citoquina sobre Nox5 es menos conocido y parece depender del tejido estudiado. Cucoranu et al. [247] afirman que el TGF- β , al contrario de lo que ocurre con Nox4, suprime la expresión de Nox5 en fibroblastos cardiacos. Por el contrario, Kim et al. [248] describen que la misma citoquina en células HeLa induce a las 24 h la expresión de Nox2, Nox4 y Nox5. Del mismo modo, el tratamiento con TGF- β eleva la expresión de Nox5 en células mesangiales humanas [203]. Además, encuentran que el silenciamiento de Nox5 disminuye la cantidad de ROS, los mediadores de la inflamación y la síntesis de colágeno inducidos por hiperglucemia y el tratamiento con TGF- β .

El aumento de expresión de Nox5 por las citoquinas TGF- β y angiotensina II es un hecho novedoso en el campo de fibrosis hepática. Sin embargo, no es extraño, ya que se conoce la relación capacidad de estas citoquinas de inducir otras isoenzimas de Nox. Por ejemplo, en modelos de fibrosis en ratón se ha visto que Ang II duplica la expresión de Nox1 y Nox4 en HSC activadas, generando un aumento de ROS y de colágeno de tipo I [217]. A su vez, Sancho et al. [102] han mostrado que Nox1, Nox2 y Nox4 se inducen tras el tratamiento de HSC de ratón con TGF- β . La inducción de Nox4 por TGF- β también se ha descrito en diversos tejidos humanos y murinos, incluyendo el músculo liso [249], HSC [250] y fibroblastos cardiacos [247].

Una cuestión que queda pendiente es averiguar el mecanismo por el que se induce Nox5. Como se resume en la **Figura D-1**, nuestros resultados sugieren que este aumento de Nox5 es dependiente de H₂O₂ ya que catalasa, ácido ascórbico y N-acetil cisteína bloquean total o parcialmente la expresión proteica de esta variante. Este resultado es consecuente con las observaciones hechas por otros autores que muestran que la adición extracelular de H₂O₂ es capaz de inducir la expresión de Nox5 en otros tipos celulares, vía MAPK o mediante factores de transcripción [191] (237). De hecho, estudios *in silico* y funcionales confirman la existencia de regiones de unión a factores de transcripción que modulan la expresión de Nox5, como son, STAT1/STAT3, CREB, NF- κ B, AP-1 y C/EBP [166,186], de los cuales al menos los tres últimos son sensibles al estrés oxidativo.

Muchos trabajos han mostrado que los efectos biológicos de TGF- β y Ang II son mediados por la rápida producción de H₂O₂, pero todavía se desconoce cuál es el origen celular de este compuesto. Entre las muchas fuentes de ROS que existen en HSC, dos de las principales son la mitocondria y las distintas isoenzimas de Nox. Una posibilidad sería que el

H₂O₂ se generase en la mitocondria. De hecho, existe un trabajo donde se afirma que es el complejo III de la mitocondria es el encargado de generar ROS intracelular tras estimular fibroblastos con TGF-β e inducir la expresión de Nox4 [100]. A pesar de este resultado, se sabe muy poco acerca de la posible inducción de NADPH oxidasas por vía mitocondrial. También sería posible que fuera una Nox constitutiva el origen del peróxido de hidrógeno. Dado que diversos autores han descrito que el TGF-β induce la expresión de Nox4 [102,221], sería posible que Nox4 pudiera ser el origen de ese peróxido. Sin embargo, el silenciamiento de Nox4 por siRNAs no parece tener efecto alguno sobre la expresión de Nox5 por TGF-β. Además, las células LX-2, basalmente, expresan niveles bajos de Nox4, variante que se cree que es constitutivamente activa, y por tanto no activable [252]. Quizá Nox1 y Nox2, al ser activables y regulables por otras proteínas [252], pudieran generar ROS de forma rápida e inducir la expresión de Nox5 tras tratar las células con TGF-β y angiotensina II, aunque esta hipótesis está por demostrar.

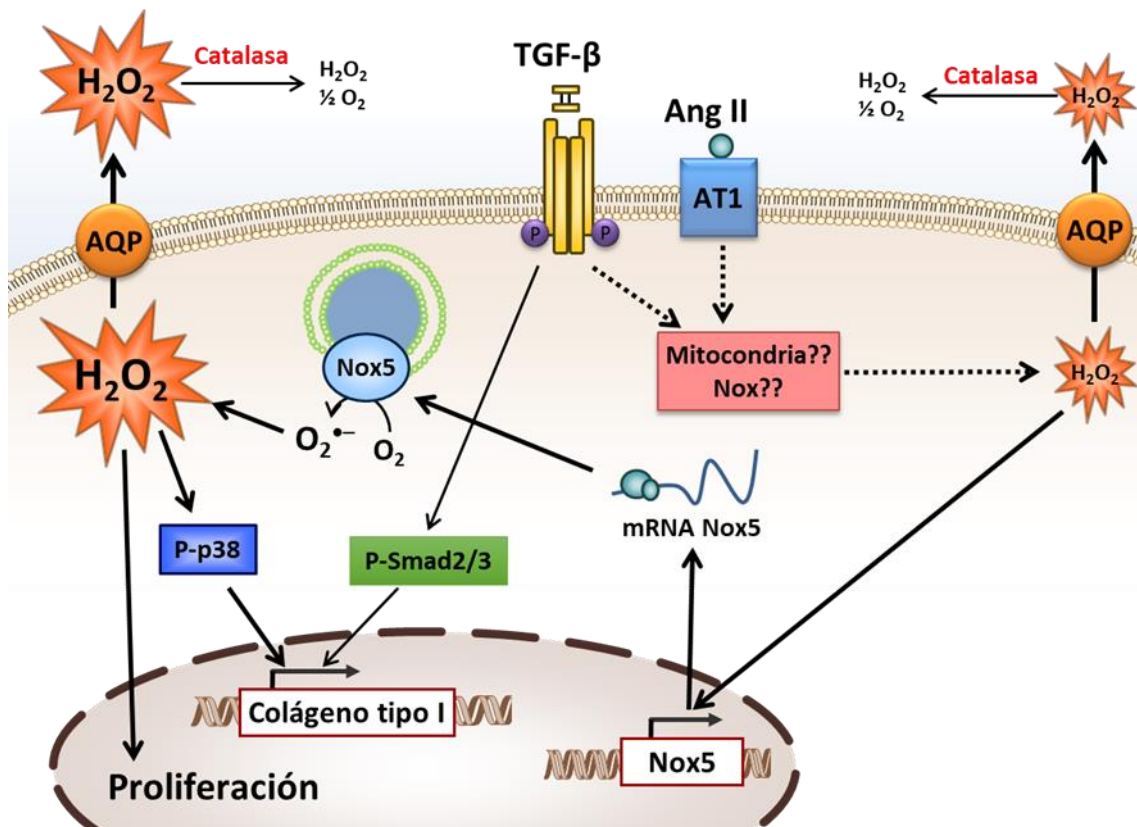


Figura D-1. Esquema resumen de la inducción de Nox5 por TGF-β y angiotensina II y de los efectos funcionales de Nox5 en HSC. TGF-β y angiotensina II provocan el aumento de síntesis de colágeno vía Smad2/3 y la inducción de Nox5 vía generación de H₂O₂. Esta inducción de Nox5 puede ser atenuada por la adición de catalasa o antioxidantes que eliminan el H₂O₂ generado. A su vez, el aumento de Nox5 genera ROS que inducen la proliferación celular y aumentan la síntesis de colágeno vía p38 MAPK.

Este trabajo además de describir por primera vez, la expresión de Nox5 y su inducción por dos citoquinas profibrogénicas en la línea celular LX-2, muestra la relación que existe entre la expresión de Nox5 y la síntesis de colágeno tipo I. Los resultados obtenidos sugieren

que Nox5 media, al menos parcialmente, la inducción del colágeno de tipo I por TGF- β en HSC. Este efecto podría no ser específico de este tejido, puesto en células mesangiales humanas los niveles de colágeno inducidos por hiperglucemia y TGF- β también se atenúan tras silenciar Nox5 [203]. Otros autores han demostrado claramente que el silenciamiento de Nox4 también bloquea la expresión de algunos genes diana del TGF- β en células estelares hepáticas derivadas de ratón, incluyendo el colágeno tipo I (209). Sin embargo, los efectos de Nox5 sobre la expresión del colágeno no parecen estar mediados por Nox4. La sobreexpresión o el silenciamiento de Nox5 en células LX-2 no afecta a la expresión de Nox4 y, a la inversa, el silenciamiento de Nox4 no afecta a la inducción de Nox5 por TGF- β .

Si bien no se hemos profundizado en las vías de señalización implicadas, parece que la inducción de colágeno por TGF- β mediada por Nox5 depende de la activación de p38 MAPK. En células estelares hepáticas estimuladas por TGF- β se ha visto que Smad y p38 MAPK regulan independientemente la expresión del gen de colágeno alfa1 (I) [86]. Los resultados obtenidos muestran que el silenciamiento y la sobreexpresión de Nox5 influyen sobre la activación de p38 MAPK, mientras que no parecen influir a la fosforilación de Smad2. La proteína p38-MAPK es conocida por ser modulada por los niveles intracelulares de ROS. De hecho, un aumento de ROS provoca un aumento en la fosforilación de p38 MAPK y en la síntesis de ECM [89]. Además de la activación de las vías de señalización, la inducción de colágeno por el aumento de ROS producido por Nox5 podría explicarse por la modulación de factores de transcripción, como NF- κ B. Por ejemplo, la señal inducida por NF- κ B puede ser modulada por aumento de ROS, ya que evita la fosforilación del inhibidor de NF- κ B y su posterior degradación, bloqueando, de esta forma la señalización de NF- κ B [253]. Dado que NF- κ B bloquea la síntesis de colágeno en HSC [254], sería posible que el aumento de ROS pudiera bloquear a NF- κ B, permitiendo el aumento de colágeno tipo I.

Para conocer la relevancia clínica de estos resultados sería importante poder validar estos resultados en muestras de pacientes con fibrosis/cirrosis. Aunque disponemos de un anticuerpo específico para detectar Nox5 por western-blot, no tenemos un anticuerpo adecuado para realizar estudios inmunohistoquímicos. Incluso los controles realizados en el laboratorio con ratones transgénicos que sobreexpresan Nox5 dan resultados pobres. Sin embargo, se han publicado algunos resultados obtenidos mediante estudios genéticos en pacientes. Por ejemplo, existen datos preliminares que indican que en pacientes con cirrosis el gen de Nox5 duplica su expresión con respecto a pacientes control (219). Además, recientemente ha salido publicado un estudio donde se muestra que la expresión de mRNA de Nox1, Nox4, Nox5, Duox1 y Duox2 está significativamente aumentada en pacientes con hepatocarcinoma en comparación con donantes sanos [224]. Entre todos ellos, Nox4 y Duox1 son las variantes que más sobreexpresadas, pero, sorprendentemente, los pacientes con mayor expresión de estas variantes presentan un mejor pronóstico en las curvas de supervivencia. Por el contrario, un aumento de la expresión de los genes Nox1, Nox2 y Nox5 está asociado con un peor pronóstico de los pacientes. Estos resultados son interesantes por

dos motivos. En primer lugar, Nox4 y Duox1 son enzimas que liberan directamente H₂O₂, mientras que Nox1/2/5 generan el radical anión superóxido. En segundo lugar, TGF-β induce la expresión de Nox4 y Nox5, pero su función parece ser diferente. Parece que Nox5 tendría un papel patológico, mientras que, al menos en este caso, Nox4 puede tener un efecto citoprotector. Estas observaciones no se limitan a las enfermedades hepáticas, ya que se están publicando resultados similares en enfermedades cardiovasculares y renales [256]. Por ejemplo, los ratones KO de Nox4 son más susceptibles a lesiones tubulares agudas y crónicas, insuficiencia cardíaca y aterosclerosis.

4. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la expresión y relevancia funcional de Nox5 en una línea celular de células estelares hepáticas humanas, LX-2. Esta es una línea no tumoral inmortalizada que ha sido ampliamente estudiada y conserva características clave de las HSC, como la señalización por citoquinas, la expresión de genes neuronales, el metabolismo de retinoides y la fibrogénesis, por lo que se considera que es un modelo adecuado para los estudios en cultivo sobre la fibrosis hepática humana. Pero, como todo modelo, también presenta sus limitaciones. Por ejemplo, habría que comprobar la expresión de Nox5 en células HSC primarias humanas. Las células LX-2 ya están activadas y sería interesante saber si las HSC quiescentes expresan o no Nox5. Hay que tener en cuenta que los factores que inducen Nox5, como el TGF-β o el peróxido de hidrógeno, provocan la activación de las HSC, por lo que la expresión de esta proteína podría ser una consecuencia de este proceso. También habría que profundizar en las vías de señalización que median tanto la inducción de Nox5 por TGF-β y la angiotensina II, como sobre los efectos que la expresión de Nox5, y la consiguiente producción de ROS, tienen sobre las rutas y los factores de transcripción que inducen la proliferación celular y la fibrogénesis. Por último, todavía no se conoce el mecanismo por el cual la forma truncada de Nox5 (Nox5-S) es capaz de generar radicales libres.

Además, no debemos olvidar que el hígado es un órgano complejo donde existe una gran variedad de células que interactúan entre ellas promoviendo la fibrosis hepática. Por ello, otra opción sería realizar cocultivos que ayudarían a entender mejor la inducción de Nox5 y los efectos funcionales tanto en HSC como en endotelio, hepatocitos, macrófagos o células de Kupffer. Un paso más sería recurrir a modelos animales de fibrosis *in vivo* con la incorporación del gen de Nox5 en el genoma de los roedores para ver cuáles son sus efectos en el hígado. Habría que decidir si realizar un *knock-in* global o específico de tejido, y valorar si es más conveniente una expresión constitutiva o inducible, para evitar los posibles efectos deletéreos que Nox5 pudiera tener en el desarrollo y crecimiento del ratón. Otra alternativa sería utilizar lagomorfos como modelo experimental animal, como el conejo, ya que estos animales sí poseen Nox5 en su genoma.

Sin embargo, entre todas opciones la mejor sería la obtención de muestras de pacientes fibróticos y cirróticos para ver si Nox5 se sobreexpresa o no en estos pacientes y si su expresión correlaciona con el estadio de la enfermedad. En este momento no se dispone de un anticuerpo comercial para la detección específica de Nox5 mediante inmunohistoquímica, lo que ha limitado mucho la evaluación de la posible relevancia clínica de Nox5 en las enfermedades hepáticas. Algunos autores están empezando a medir la correlación entre la expresión de mRNA de las distintas NADPH oxidasas y la evolución del paciente con resultados prometedores. Sin embargo, estas determinaciones se hacen extractos totales de muestras hepáticas sin distinguir entre los distintos tipos celulares. Las modernas técnicas de *single-cell sequencing* podrían ayudar a determinar la expresión de las NADPH oxidasas en cada tipo celular, lo que podría aclarar la relevancia de cada tipo celular en este proceso.

CONCLUSIONES

1. La línea de células estelares hepáticas humanas LX-2 expresa basalmente tres tipos de NADPH oxidasas: Nox2, Nox4 y Nox5. Respecto a Nox5, estas células expresan 3 isoformas largas (Nox5 α , Nox5 β y Nox5 δ) y una isoforma corta y truncada (Nox5 ϵ), que representa el 90% del total de la proteína.
2. La sobreexpresión de Nox5 β , pero no de Nox5 ϵ , genera ROS extracelularmente en presencia de calcio, a juzgar por la producción de peróxido de hidrógeno, la reducción de citocromo c y la luminiscencia producida por el derivado del luminol L-012. Sin embargo, tanto Nox5 β como Nox5 ϵ generan especies reactivas de oxígeno intracelularmente en esas condiciones, lo que sugiere que ambas formas tienen propiedades prooxidantes.
3. Tanto Nox5 β como Nox5 ϵ promueven la proliferación y la síntesis de colágeno de tipo I en células estelares hepáticas humanas.
4. TGF- β y angiotensina II, dos de las citoquinas profibrogénicas más importantes, inducen la expresión de Nox5 en un proceso mediado por el peróxido de hidrógeno.
5. Nox5 parece mediar algunos de los efectos profibrogénicos del TGF- β , ya que el silenciamiento de Nox5 reduce la cantidad de colágeno de tipo I sintetizado en respuesta a esta citoquina. Además, este efecto parece estar mediado por la síntesis de peróxido de hidrógeno por parte de Nox5 y la posterior activación de p38 MAPK.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] D.H. Adams, B. Eksteen, Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006) 244–251.
- [2] J.P. Iredale, Models of liver fibrosis: Exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 539–548.
- [3] J.E. Puche, Y. Saiman, S.L. Friedman, Hepatic stellate cells and liver fibrosis, *Compr. Physiol.* 3 (2013) 1473–1492.
- [4] C. Trautwein, S.L. Friedman, D. Schuppan, M. Pinzani, Hepatic fibrosis: Concept to treatment, *J. Hepatol.* 62 (2015) S15–S24.
- [5] R.E. Mann, R.G. Smart, R. Govoni, The epidemiology of alcoholic liver disease, *Alcohol Res. Health.* 27 (2003) 209–219.
- [6] F. Scaglioni, S. Ciccia, M. Marino, G. Bedogni, S. Bellentani, ASH and NASH, *Dig. Dis.* 29 (2011) 202–210.
- [7] A. Pellicoro, P. Ramachandran, J.P. Iredale, J.A. Fallowfield, Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ, *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 181–194.
- [8] R. Xu, Z. Zhang, F.S. Wang, Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury, *Cell. Mol. Immunol.* 9 (2012) 296–301.
- [9] Y. Wang, J. Gao, D. Zhang, J. Zhang, J. Ma, H. Jiang, New insights into the antifibrotic effects of sorafenib on hepatic stellate cells and liver fibrosis, *J. Hepatol.* 53 (2010) 132–144.
- [10] F. Hong, H. Chou, M.I. Fiel, S.L. Friedman, Antifibrotic activity of sorafenib in experimental hepatic fibrosis: refinement of inhibitory targets, dosing, and window of efficacy in vivo, *Dig. Dis. Sci.* 58 (2013) 257–264.
- [11] T. Kisseleva, D.A. Brenner, Anti-fibrogenic strategies and the regression of fibrosis, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 25 (2011) 305–317.
- [12] M. Cohen-Naftaly, S.L. Friedman, Current status of novel antifibrotic therapies in patients with chronic liver disease, *Therap. Adv. Gastroenterol.* 4 (2011) 391–417.
- [13] M. Blachier, H. Leleu, M. Peck-Radosavljevic, D.C. Valla, F. Roudot-Thoraval, The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data, *J. Hepatol.* 58 (2013) 593–608.
- [14] P. Burra, Hepatitis C, *Semin. Liver Dis.* 29 (2009) 53–65.
- [15] C.J.L. Murray, T. Vos, R. Lozano, M. Naghavi, A.D. Flaxman, C. Michaud, M. Ezzati, K. Shibuya, J.A. Salomon, S. Abdalla, V. Aboyans, M.A. AlMazroa, Z.A. Memish, Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010, *Lancet (London, England)*. 380 (2012) 2197–2223.
- [16] V.W. Setiawan, D.O. Stram, J. Porcel, S.C. Lu, L. Le Marchand, M. Noureddin, Prevalence of chronic liver disease and cirrhosis by underlying cause in understudied ethnic groups: The multiethnic cohort, *Hepatology.* 64 (2016) 1969–1977.
- [17] E. Andradas, M. Alfaro, E. Regidor, J. Gutierrez-Fisac, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Patrones de mortalidad en España, 2015, Madrid, 2018.

- [18] S. Scaglione, S. Kliethermes, G. Cao, D. Shoham, R. Durazo, A. Luke, M.L. Volk, The Epidemiology of Cirrhosis in the United States, *J. Clin. Gastroenterol.* 49 (2015) 690–696.
- [19] Y. Lurie, M. Webb, R. Cytter-Kuint, S. Shteingart, G.Z. Lederkremer, Non-invasive diagnosis of liver fibrosis and cirrhosis, *World J. Gastroenterol.* 21 (2015) 11567–11583.
- [20] K.S. Nallagangula, S.K. Nagaraj, L. Venkataswamy, M. Chandrappa, Liver fibrosis: a compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression, *Futur. Sci. OA.* 4 (2018) FSO250.
- [21] R.G. Wells, Cellular Sources of Extracellular Matrix in Hepatic Fibrosis, *Clin. Liver Dis.* 12 (2008) 759–768.
- [22] S.F. Badylak, D.O. Freytes, T.W. Gilbert, Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function, *Acta Biomater.* 5 (2009) 1–13.
- [23] P. Bedossa, V. Paradis, Liver extracellular matrix in health and disease, *J. Pathol.* 200 (2003) 504–515.
- [24] S. De Minicis, D. a Brenner, NOX in liver fibrosis, *Arch. Biochem. Biophys.* 462 (2007) 266–272.
- [25] J.P. Iredale, A. Thompson, N.C. Henderson, Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1832 (2013) 876–883.
- [26] A. Pellicoro, R.L. Aucott, P. Ramachandran, A.J. Robson, J.A. Fallowfield, V.K. Snowden, S.N. Hartland, M. Vernon, J.S. Duffield, R.C. Benyon, S.J. Forbes, J.P. Iredale, Elastin accumulation is regulated at the level of degradation by macrophage metalloelastase (MMP-12) during experimental liver fibrosis, *Hepatology.* 55 (2012) 1965–1975.
- [27] J. Ehling, M. Bartneck, V. Fech, B. Butzbach, R. Cesati, R. Botnar, T. Lammers, F. Tacke, Elastin-based molecular MRI of liver fibrosis, *Hepatology.* 58 (2013) 1517–1518.
- [28] S. Hemmann, J. Graf, M. Roderfeld, E. Roeb, Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies, *J. Hepatol.* 46 (2007) 955–975.
- [29] P. Ramachandran, J.P. Iredale, Macrophages: Central regulators of hepatic fibrogenesis and fibrosis resolution, *J. Hepatol.* 56 (2012) 1417–1419.
- [30] S. Duarte, J. Baber, T. Fujii, A.J. Coito, Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis, *Matrix Biol.* 44–46 (2015) 147–156.
- [31] H. Yoshiji, S. Kuriyama, Y. Miyamoto, U.P. Thorgeirsson, D.E. Gomez, M. Kawata, J. Yoshii, Y. Ikenaka, R. Noguchi, H. Tsujinoue, T. Nakatani, S.S. Thorgeirsson, H. Fukui, Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model, *Hepatology.* 32 (2000) 1248–1254.
- [32] M. Consolo, A. Amoroso, D.A. Spandidos, M.C. Mazarino, Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease, *Int. J. Mol. Med.* 24 (2009) 143–152.

- [33] V. Leroy, F. Monier, S. Bottari, C. Trocme, N. Sturm, M.N. Hilleret, F. Morel, J.P. Zarski, Circulating Matrix Metalloproteinases 1, 2, 9 and Their Inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as Serum Markers of Liver Fibrosis in Patients With Chronic Hepatitis C: Comparison With PIIINP and Hyaluronic Acid, *Am. J. Gastroenterol.* 99 (2004) 271–279.
- [34] K. Wake, “Sternzellen” in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A, *Am. J. Anat.* 132 (1971) 429–462.
- [35] T. Tsuchida, S.L. Friedman, Mechanisms of hepatic stellate cell activation, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 14 (2017) 397–411.
- [36] R. Bataller, D.A. Brenner, Liver fibrosis, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 209–218.
- [37] S.L. Friedman, Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 125–172.
- [38] Y.S. Lee, W.I. Jeong, Retinoic acids and hepatic stellate cells in liver disease, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 27 Suppl 2 (2012) 75–79.
- [39] Y. Shirakami, S.A. Lee, R.D. Clugston, W.S. Blaner, Hepatic metabolism of retinoids and disease associations, *Biochim. Biophys. Acta.* 1821 (2012) 124–136.
- [40] I.N. Crispe, Liver antigen-presenting cells, *J. Hepatol.* 54 (2011) 357–365.
- [41] R. Weiskirchen, F. Tacke, Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology, *Hepatobiliary Surg. Nutr.* 3 (2014) 344–363.
- [42] L. Atzori, G. Poli, A. Perra, Hepatic stellate cell: a star cell in the liver, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 1639–1642.
- [43] S. Lemoine, A. Cadoret, H. El Mourabit, D. Thabut, C. Housset, Origins and functions of liver myofibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta.* 1832 (2013) 948–954.
- [44] D.A. Mann, D.E. Smart, Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation, *Gut.* 50 (2002) 891–896.
- [45] G. Carpino, S. Morini, S. Ginanni Corradini, A. Franchitto, M. Merli, M. Siciliano, F. Gentili, A. Onetti Muda, P. Berloco, M. Rossi, A.F. Attili, E. Gaudio, Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation, *Dig. Liver Dis.* 37 (2005) 349–56.
- [46] P.A. Knolle, D. Wohlleber, Immunological functions of liver sinusoidal endothelial cells, *Cell. Mol. Immunol.* 13 (2016) 347–53.
- [47] R. Urtasun, N. Nieto, Hepatic stellate cells and oxidative stress, *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 99 (2007) 223–30.
- [48] Y.M. Yang, E. Seki, TNF α in liver fibrosis, *Curr. Pathobiol. Rep.* 3 (2015) 253–261.
- [49] F. Meng, K. Wang, T. Aoyama, S.I. Grivennikov, Y. Paik, D. Scholten, M. Cong, K. Iwaisako, X. Liu, M. Zhang, C.H. Österreicher, F. Stickel, K. Ley, D.A. Brenner, T. Kisseleva, Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice, *Gastroenterology.* 143 (2012) 765–776.

- [50] S.Y. Kim, J.M. Jeong, S.J. Kim, W. Seo, M.H. Kim, W.M. Choi, W. Yoo, J.H. Lee, Y.R. Shim, H.S. Yi, Y.S. Lee, H.S. Eun, B.S. Lee, K. Chun, S.J. Kang, S.C. Kim, B. Gao, G. Kunos, H.M. Kim, W.I. Jeong, Pro-inflammatory hepatic macrophages generate ROS through NADPH oxidase 2 via endocytosis of monomeric TLR4–MD2 complex, *Nat. Commun.* 8 (2017) 2247.
- [51] L. Cao, X.-B. Quan, W.-J. Zeng, X.O. Yang, M.J. Wang, Mechanism of Hepatocyte Apoptosis, *J. Cell Death.* 9 (2016) 19–29.
- [52] S.S. Zhan, J.X. Jiang, J. Wu, C. Halsted, S.L. Friedman, M.A. Zern, N.J. Torok, Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo, *Hepatology.* 43 (2006) 435–443.
- [53] H.L. Reeves, S.L. Friedman, Activation of hepatic stellate cells - a key issue in liver fibrosis, *Front. Biosci.* 7 (2002) 808-826.
- [54] J.S. Campbell, S.D. Hughes, D.G. Gilbertson, T.E. Palmer, M.S. Holdren, A.C. Haran, M.M. Odell, R.L. Bauer, H.P. Ren, H.S. Haugen, M.M. Yeh, N. Fausto, Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 3389–3394.
- [55] R. Novosyadlyy, J. Dudas, R. Pannem, G. Ramadori, J.-G. Scharf, Crosstalk between PDGF and IGF-I receptors in rat liver myofibroblasts: implication for liver fibrogenesis, *Lab. Invest.* 86 (2006) 710–723.
- [56] E.R. García-Trevijano, M.J. Iraburu, L. Fontana, J.A. Domínguez-Rosales, A. Auster, A. Covarrubias-Pinedo, M. Rojkind, Transforming growth factor beta1 induces the expression of alpha1(I) procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBPbeta-dependent mechanism in rat hepatic stellate cells, *Hepatology.* 29 (1999) 960–970.
- [57] I. Fabregat, J. Moreno-Càceres, A. Sánchez, S. Dooley, B. Dewidar, G. Giannelli, P. Ten Dijke, IT-LIVER Consortium, TGF- β signalling and liver disease, *FEBS J.* 283 (2016) 2219–2232.
- [58] S. Dooley, P.T. Dijke, TGF- β in progression of liver disease, *Cell Tissue Res.* 347 (2012) 245–256.
- [59] X. Fan, Q. Zhang, S. Li, Y. Lv, H. Su, H. Jiang, Z. Hao, Attenuation of CCl₄-Induced Hepatic Fibrosis in Mice by Vaccinating against TGF- β 1, *PLoS One.* 8 (2013) e82190.
- [60] A.C. de Gouville, V. Boullay, G. Krysa, J. Pilot, J.M. Brusq, F. Loriolle, J.M. Gauthier, S.A. Papworth, A. Laroze, F. Gellibert, S. Huet, Inhibition of TGF-beta signaling by an ALK5 inhibitor protects rats from dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis, *Br. J. Pharmacol.* 145 (2005) 166–177.
- [61] P. Wang, Y. Koyama, X. Liu, J. Xu, H.Y. Ma, S. Liang, I.H. Kim, D.A. Brenner, T. Kisseleva, Promising Therapy Candidates for Liver Fibrosis, *Front. Physiol.* 7 (2016) 47.
- [62] V. Arroyo, J. Bosch, M. Mauri, F. Ribera, F. Navarro-López, J. Rodés, Effect of angiotensin-II blockade on systemic and hepatic haemodynamics and on the renin-angiotensin-aldosterone system in cirrhosis with ascites, *Eur. J. Clin. Invest.* 11 (1981) 221–229.
- [63] A.W. Schneider, J.F. Kalk, C.P. Klein, Effect of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, on portal pressure in cirrhosis, *Hepatology.* 29 (1999) 334–339.
- [64] D.M. Kingsley, The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms, *Genes Dev.* 8 (1994) 133–146.

- [65] A. Biernacka, M. Dobaczewski, N.G. Frangogiannis, TGF- β signaling in fibrosis, *Growth Factors*. 29 (2011) 196–202.
- [66] M. Shi, J. Zhu, R. Wang, X. Chen, L. Mi, T. Walz, T.A. Springer, Latent TGF- β structure and activation, *Nature*. 474 (2011) 343–349.
- [67] N.O. Fortunel, A. Hatzfeld, J.A. Hatzfeld, Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis, *Blood*. 96 (2000) 2022–2036.
- [68] R. Lafyatis, Transforming growth factor β - at the centre of systemic sclerosis, *Nat. Rev. Rheumatol*. 10 (2014) 706–719.
- [69] A. Tandon, J.C.K. Tovey, A. Sharma, R. Gupta, R.R. Mohan, Role of transforming growth factor Beta in corneal function, biology and pathology, *Curr. Mol. Med*. 10 (2010) 565–578.
- [70] C.L. Lino Cardenas, I.S. Henaoui, E. Courcot, C. Roderburg, C. Cauffiez, S. Aubert, M.C. Copin, B. Wallaert, F. Glowacki, E. Dewaeles, J. Milosevic, J. Maurizio, J. Tedrow, B. Marcet, J.M. Lo-Guidice, N. Kaminski, P. Barbry, T. Luedde, M. Perrais, B. Mari, N. Pottier, miR-199a-5p Is upregulated during fibrogenic response to tissue injury and mediates TGFbeta-induced lung fibroblast activation by targeting caveolin-1, *PLoS Genet*. 9 (2013) e1003291.
- [71] N. Khalil, Post translational activation of latent transforming growth factor beta (L-TGF-beta): clinical implications, *Histol. Histopathol*. 16 (2001) 541–551.
- [72] H. Leyland, J. Gentry, M.J. Arthur, R.C. Benyon, The plasminogen-activating system in hepatic stellate cells, *Hepatology*. 24 (1996) 1172–1178.
- [73] R. Kumar, C. Mickael, B. Kassa, L. Gebreab, J.C. Robinson, D.E. Koyanagi, L. Sanders, L. Barthel, C. Meadows, D. Fox, D. Irwin, M. Li, B.A. McKeon, S. Riddle, R. Dale Brown, L.E. Morgan, C.M. Evans, D. Hernandez-Saavedra, A. Bandeira, J.P. Maloney, T.M. Bull, W.J. Janssen, K.R. Stenmark, R.M. Tuder, B.B. Graham, TGF- β activation by bone marrow-derived thrombospondin-1 causes Schistosoma- and hypoxia-induced pulmonary hypertension, *Nat. Commun*. 8 (2017) 15494.
- [74] J.P. Annes, J.S. Munger, D.B. Rifkin, Making sense of latent TGFbeta activation, *J. Cell Sci*. 116 (2003) 217–224.
- [75] M.H. Barcellos-Hoff, T.A. Dix, Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1, *Mol. Endocrinol*. 10 (1996) 1077–1083.
- [76] J.S. Munger, J.G. Harpel, F.G. Giancotti, D.B. Rifkin, Interactions between growth factors and integrins: latent forms of transforming growth factor-beta are ligands for the integrin α v β 1, *Mol. Biol. Cell*. 9 (1998) 2627–2638.
- [77] R.J. Akhurst, A. Hata, Targeting the TGF β signalling pathway in disease, *Nat. Rev. Drug Discov*. 11 (2012) 790–811.
- [78] E. Wiercinska, L. Wickert, B. Denecke, H.M. Said, J. Hamzavi, A.M. Gressner, M. Thorikay, P. ten Dijke, P.R. Mertens, K. Breitkopf, S. Dooley, Id1 is a critical mediator in TGF-beta-induced transdifferentiation of rat hepatic stellate cells, *Hepatology*. 43 (2006) 1032–1041.
- [79] I. Carmona-Cuenca, C. Roncero, P. Sancho, L. Caja, N. Fausto, M. Fernández, I. Fabregat, Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF-beta in hepatocytes is required for its pro-apoptotic activity, *J. Hepatol*. 49 (2008) 965–976.
- [80] M. Tian, J.R. Neil, W.P. Schiemann, Transforming growth factor- β and the hallmarks of cancer, *Cell. Signal*. 23 (2011) 951–962.

- [81] X. Yan, Z. Liu, Y. Chen, Regulation of TGF-beta signaling by Smad7, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 41 (2009) 263–272.
- [82] X. Yan, H. Liao, M. Cheng, X. Shi, X. Lin, X.H. Feng, Y.G. Chen, Smad7 Protein Interacts with Receptor-regulated Smads (R-Smads) to Inhibit Transforming Growth Factor- β (TGF- β)/Smad Signaling, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 382–92.
- [83] M.K. Lee, C. Pardoux, M.C. Hall, P.S. Lee, D. Warburton, J. Qing, S.M. Smith, R. Derynck, TGF- β activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA, *EMBO J.* 26 (2007) 3957–3967.
- [84] Y.E. Zhang, Non-Smad pathways in TGF-beta signaling, *Cell Res.* 19 (2009) 128–139.
- [85] F. Furukawa, K. Matsuzaki, S. Mori, Y. Tahashi, K. Yoshida, Y. Sugano, H. Yamagata, M. Matsushita, T. Seki, Y. Inagaki, M. Nishizawa, J. Fujisawa, K. Inoue, p38 MAPK mediates fibrogenic signal through smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts, *Hepatology*. 38 (2003) 879–889.
- [86] S. Tsukada, J.K. Westwick, K. Ikejima, N. Sato, R.A. Rippe, SMAD and p38 MAPK signaling pathways independently regulate alpha1(I) collagen gene expression in unstimulated and transforming growth factor-beta-stimulated hepatic stellate cells, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 10055–10064.
- [87] R. Derynck, Y.E. Zhang, Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling, *Nature*. 425 (2003) 577–584.
- [88] J. Pan, Q. Chang, X. Wang, Y. Son, Z. Zhang, G. Chen, J. Luo, Y. Bi, F. Chen, X. Shi, Reactive oxygen species-activated Akt/ASK1/p38 signaling pathway in nickel compound-induced apoptosis in BEAS 2B cells, *Chem. Res. Toxicol.* 23 (2010) 568–577.
- [89] Y. Son, S. Kim, H.T. Chung, H.O. Pae, Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases, *Methods Enzymol.* 528 (2013) 27–48.
- [90] C.J. Parsons, M. Takashima, R.A. Rippe, Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22 (2007) 79–84.
- [91] B. Schnabl, C.A. Bradham, B.L. Bennett, A.M. Manning, B. Stefanovic, D.A. Brenner, TAK1/JNK and p38 have opposite effects on rat hepatic stellate cells, *Hepatology*. 34 (2001) 953–963.
- [92] J. Kluwe, J.P. Pradere, G.Y. Gwak, A. Mencin, S. De Minicis, C.H. Osterreicher, J. Colmenero, R. Bataller, R.F. Schwabe, Modulation of hepatic fibrosis by c-Jun-N-terminal kinase inhibition, *Gastroenterology*. 138 (2010) 347–359.
- [93] A. Hamidi, J. Song, N. Thakur, S. Itoh, A. Marcusson, A. Bergh, C.H. Heldin, M. Landström, TGF- β promotes PI3K-AKT signaling and prostate cancer cell migration through the TRAF6-mediated ubiquitylation of p85 α , *Sci. Signal.* 10 (2017) 4186.
- [94] D.A. Fruman, H. Chiu, B.D. Hopkins, S. Bagrodia, L.C. Cantley, R.T. Abraham, The PI3K Pathway in Human Disease, *Cell*. 170 (2017) 605–635.
- [95] P. Sancho-Bru, E. Juez, M. Moreno, V. Khurdayan, M. Morales-Ruiz, J. Colmenero, V. Arroyo, D.A. Brenner, P. Ginès, R. Bataller, Hepatocarcinoma cells stimulate the growth, migration and expression of pro-angiogenic genes in human hepatic stellate cells, *Liver Int.* 30 (2010) 31–41.

- [96] S. Reif, A. Lang, J.N. Lindquist, Y. Yata, E. Gabele, A. Scanga, D.A. Brenner, R.A. Rippe, The role of focal adhesion kinase-phosphatidylinositol 3-kinase-akt signaling in hepatic stellate cell proliferation and type I collagen expression, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 8083–8090.
- [97] L. Alili, M. Sack, K. Puschmann, P. Brenneisen, Fibroblast-to-myofibroblast switch is mediated by NAD(P)H oxidase generated reactive oxygen species, *Biosci. Rep.* 34 (2014) 7–17.
- [98] E. Junn, K.N. Lee, H.R. Ju, S.H. Han, J.Y. Im, H.S. Kang, T.H. Lee, Y.S. Bae, K.S. Ha, Z.W. Lee, S.G. Rhee, I. Choi, Requirement of hydrogen peroxide generation in TGF-beta 1 signal transduction in human lung fibroblast cells: involvement of hydrogen peroxide and Ca²⁺ in TGF-beta 1-induced IL-6 expression, *J. Immunol.* 165 (2000) 2190–2197.
- [99] C. Michaeloudes, M.B. Sukkar, N.M. Khorasani, P.K. Bhavsar, K.F. Chung, TGF-β regulates Nox4, MnSOD and catalase expression, and IL-6 release in airway smooth muscle cells, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 300 (2011) 295-304.
- [100] M. Jain, S. Rivera, E.A. Monclus, L. Synenki, A. Zirk, J. Eisenbart, C. Feghali-Bostwick, G.M. Mutlu, G.R.S. Budinger, N.S. Chandel, Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor-β signaling, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 770–777.
- [101] N. Tobar, V. Villar, J.F. Santibanez, ROS-NFκB mediates TGF-β1-induced expression of urokinase-type plasminogen activator, matrix metalloproteinase-9 and cell invasion, *Mol. Cell. Biochem.* 340 (2010) 195–202.
- [102] P. Sancho, J. Mainez, E. Crosas-Molist, C. Roncero, C.M. Fernández-Rodríguez, F. Pinedo, H. Huber, R. Eferl, W. Mikulits, I. Fabregat, NADPH Oxidase NOX4 Mediates Stellate Cell Activation and Hepatocyte Cell Death during Liver Fibrosis Development, *PLoS One.* 7 (2012) 45285.
- [103] S. Liang, T. Kisseleva, D.A. Brenner, The Role of NADPH Oxidases (NOXs) in Liver Fibrosis and the Activation of Myofibroblasts, *Front. Physiol.* 7 (2016) 1–10.
- [104] J.S. Lubel, C.B. Herath, L.M. Burrell, P.W. Angus, Liver disease and the renin-angiotensin system: Recent discoveries and clinical implications, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23 (2008) 1327–1338.
- [105] R.M. Touyz, C. Berry, Recent advances in angiotensin II signaling, *Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. Medicas e Biol.* 35 (2002) 1001–1015.
- [106] M. Horiuchi, J. Iwanami, M. Mogi, Regulation of angiotensin II receptors beyond the classical pathway, *Clin. Sci.* 123 (2012) 193–203.
- [107] T. Kawai, S.J. Forrester, S. O'Brien, A. Baggett, V. Rizzo, S. Eguchi, AT1 receptor signaling pathways in the cardiovascular system, *Pharmacol. Res.* 125 (2017) 4–13.
- [108] G. Yin, C. Yan, B.C. Berk, Angiotensin II signaling pathways mediated by tyrosine kinases, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 (2003) 780–783.
- [109] S. Higuchi, H. Ohtsu, H. Suzuki, H. Shirai, G.D. Frank, S. Eguchi, Angiotensin II signal transduction through the AT₁ receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology, *Clin. Sci.* 112 (2007) 417–428.
- [110] P.K. Mehta, K.K. Griendling, Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system, *Am. J. Physiol. Physiol.* 292 (2007) 82–97.

- [111] C. Nahmias, A.D. Strosberg, The angiotensin AT₂ receptor: searching for signal-transduction pathways and physiological function, *Trends Pharmacol. Sci.* 16 (1995) 223–225.
- [112] R.M. Touyz, D. Endemann, G. He, J.S. Li, E.L. Schiffrin, Role of AT₂ receptors in angiotensin II-stimulated contraction of small mesenteric arteries in young SHR, *Hypertension*. 33 (1999) 366–372.
- [113] J.A. Grace, C.B. Herath, K.Y. Mak, L.M. Burrell, P.W. Angus, Update on new aspects of the renin-angiotensin system in liver disease: clinical implications and new therapeutic options, *Clin. Sci. (Lond)*. 123 (2012) 225–239.
- [114] M. Asbert, W. Jiménez, J. Gaya, P. Ginés, V. Arroyo, F. Rivera, J. Rodés, Assessment of the renin-angiotensin system in cirrhotic patients. Comparison between plasma renin activity and direct measurement of immunoreactive renin, *J. Hepatol.* 15 (1992) 179–183.
- [115] G. Paizis, M.E. Cooper, J.M. Schembri, C. Tikellis, L.M. Burrell, P.W. Angus, Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver, *Gastroenterology*. 123 (2002) 1667–1676.
- [116] H. Wei, H. Lu, D. Li, Y. Zhan, Z. Wang, X. Huang, The expression of AT₁ receptor on hepatic stellate cells in rat fibrosis induced by CCl₄, *Chin. Med. J. (Engl)*. 114 (2001) 583–587.
- [117] R. Bataller, P. Sancho-Bru, P. Ginès, J.M. Lora, A. Al-Garawi, M. Solé, J. Colmenero, J.M. Nicolás, W. Jiménez, N. Weich, J.-C. Gutiérrez-Ramos, V. Arroyo, J. Rodés, Activated human hepatic stellate cells express the renin-angiotensin system and synthesize angiotensin II, *Gastroenterology*. 125 (2003) 117–125.
- [118] R. Bataller, P. Ginès, J. Nicolás, Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells, *Gastroenterology*. (2000) 1149–1156.
- [119] A. Li, J. Zhang, X. Zhang, J. Wang, S. Wang, X. Xiao, R. Wang, P. Li, Y. Wang, Angiotensin II induces connective tissue growth factor expression in human hepatic stellate cells by a transforming growth factor β -independent mechanism, *Sci. Rep.* 7 (2017) 7841.
- [120] R. Bataller, R.F. Schwabe, Y.H. Choi, L. Yang, Y.H. Paik, J. Lindquist, T. Qian, R. Schoonhoven, C.H. Hagedorn, J.J. Lemasters, D.A. Brenner, NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 1383–1394.
- [121] N.K. Tonks, Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 833–846.
- [122] C. He, X. Miao, J. Li, H. Qi, Angiotensin II induces endothelin-1 expression in human hepatic stellate cells, *Dig. Dis. Sci.* 58 (2013) 2542–9.
- [123] A.A. Lee, W.H. Dillmann, A.D. McCulloch, F.J. Villarreal, Angiotensin II stimulates the autocrine production of transforming growth factor-beta 1 in adult rat cardiac fibroblasts, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27 (1995) 2347–2357.
- [124] P. Moreno-Alvarez, M. Sosa-Garrocho, M.A. Briones-Orta, C. González-Espinosa, J. Medina-Tamayo, E. Molina-Jijón, J. Pedraza-Chaverri, M. Macías-Silva, Angiotensin II increases mRNA levels of all TGF- β isoforms in quiescent and activated rat hepatic stellate cells, *Cell Biol. Int.* 34 (2010) 969–978.

- [125] G. Wolf, Link between angiotensin II and TGF-beta in the kidney, *Miner. Electrolyte Metab.* 24 (1998) 174–180.
- [126] G. Wolf, F.N. Ziyadeh, R.A. Stahl, Angiotensin II stimulates expression of transforming growth factor beta receptor type II in cultured mouse proximal tubular cells, *J. Mol. Med. (Berl)*. 77 (1999) 556–564.
- [127] M. Moreno, T. Gonzalo, R.J. Kok, P. Sancho-Bru, M. van Beuge, J. Swart, J. Prakash, K. Temming, C. Fondevila, L. Beljaars, M. Lacombe, P. van der Hoeven, V. Arroyo, K. Poelstra, D.A. Brenner, P. Ginès, R. Bataller, Reduction of advanced liver fibrosis by short-term targeted delivery of an angiotensin receptor blocker to hepatic stellate cells in rats, *Hepatology*. 51 (2010) 942–952.
- [128] A. Phaniendra, D.B. Jestadi, L. Periyasamy, Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases, *Indian J. Clin. Biochem.* 30 (2015) 11–26.
- [129] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, *Pharmacogn. Rev.* 4 (2010) 118–126.
- [130] G. Bartosz, Reactive oxygen species: Destroyers or messengers?, *Biochem. Pharmacol.* 77 (2009) 1303–1315.
- [131] J.A. Imlay, S.M. Chin, S. Linn, Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro, *Science*. 240 (1988) 640–642.
- [132] J. Øvrevik, M. Refsnes, M. Låg, J.A. Holme, P.E. Schwarze, Activation of Proinflammatory Responses in Cells of the Airway Mucosa by Particulate Matter: Oxidant- and Non-Oxidant-Mediated Triggering Mechanisms, *Biomolecules*. 5 (2015) 1399–1440.
- [133] Y. Liu, G. Fiskum, D. Schubert, Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain, *J. Neurochem.* 80 (2002) 780–787.
- [134] M.P. Murphy, How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem. J.* 417 (2009) 1–13.
- [135] H.P. Indo, M. Davidson, H.C. Yen, S. Suenaga, K. Tomita, T. Nishii, M. Higuchi, Y. Koga, T. Ozawa, H.J. Majima, Evidence of ROS generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage, *Mitochondrion*. 7 (2007) 106–118.
- [136] N. Cantu-Medellin, E.E. Kelley, Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation, *Redox Biol.* 1 (2013) 353–358.
- [137] K. Bedard, K.H. Krause, The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology, *Physiol. Rev.* 87 (2007) 245–313.
- [138] Y. Groemping, K. Rittinger, Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective, *Biochem. J.* 386 (2005) 401–416.
- [139] L. Van Heerebeek, C. Meischl, W. Stooker, C.J.L.M. Meijer, H.W.M. Niessen, D. Roos, NADPH oxidase(s): new source(s) of reactive oxygen species in the vascular system?, *J. Clin. Pathol.* 55 (2002) 561–568.
- [140] J. Cachat, C. Deffert, S. Hugues, K.H. Krause, Phagocyte NADPH oxidase and specific immunity, *Clin. Sci.* 128 (2015) 635–648.
- [141] I. Takac, K. Schröder, L. Zhang, B. Lardy, N. Anilkumar, J.D. Lambeth, A.M. Shah, F. Morel, R.P. Brandes, The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 13304–13313.

- [142] A.R. Cross, A.W. Segal, The NADPH oxidase of professional phagocytes - prototype of the NOX electron transport chain systems, *Biochim. Biophys. Acta.* 1657 (2004) 1–22.
- [143] F. Magnani, S. Nenci, E. Millana Fananas, M. Ceccon, E. Romero, M.W. Fraaije, A. Mattevi, Crystal structures and atomic model of NADPH oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114 (2017) 201702293.
- [144] R. Ameziane-El-Hassani, S. Morand, J.L. Boucher, Y.M. Frapart, D. Apostolou, D. Agnandji, S. Gnidehou, R. Ohayon, M.S. Noël-Hudson, J. Francon, K. Lalaoui, A. Virion, C. Dupuy, Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca²⁺-dependent H₂O₂-generating activity, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 30046–30054.
- [145] J.D. Lambeth, NOX enzymes and the biology of reactive oxygen, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 181–189.
- [146] Y.H. Paik, J. Kim, T. Aoyama, S. De Minicis, R. Bataller, D. a Brenner, Role of NADPH oxidases in liver fibrosis, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014) 2854–2872.
- [147] F. Chen, S. Haigh, Y. Yu, T. Benson, Y. Wang, X. Li, H. Dou, Z. Bagi, A.D. Verin, D.W. Stepp, G. Csanyi, A. Chadli, N.L. Weintraub, S.M.E. Smith, D.J.R. Fulton, Nox5 stability and superoxide production is regulated by C-terminal binding of Hsp90 and CO-chaperones, *Free Radic. Biol. Med.* 89 (2015) 793–805.
- [148] Y.H. Paik, D. a Brenner, NADPH oxidase mediated oxidative stress in hepatic fibrogenesis, *Korean J. Hepatol.* 17 (2011) 251–257.
- [149] P.L. Hordijk, Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins, *Circ. Res.* 98 (2006) 453–462.
- [150] S.Y. Kim, J.G. Lee, W.S. Cho, K.H. Cho, J. Sakong, J.R. Kim, B.R. Chin, S.H. Baek, Role of NADPH oxidase-2 in lipopolysaccharide-induced matrix metalloproteinase expression and cell migration, *Immunol. Cell Biol.* 88 (2010) 197–204.
- [151] S.D. Hingtgen, X. Tian, J. Yang, S.M. Dunlay, A.S. Peek, Y. Wu, R. V Sharma, J.F. Engelhardt, R.L. Davisson, Nox2-containing NADPH oxidase and Akt activation play a key role in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy, *Physiol. Genomics.* 26 (2006) 180–191.
- [152] S. Johar, A.C. Cave, A. Narayanapanicker, D.J. Grieve, A.M. Shah, Aldosterone mediates angiotensin II-induced interstitial cardiac fibrosis via a Nox2-containing NADPH oxidase, *FASEB J.* 20 (2006) 1546–1548.
- [153] J. El-Benna, P.M.C. Dang, M.A. Gougerot-Pocidallo, J.C. Marie, F. Braut-Boucher, p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases, *Exp. Mol. Med.* 41 (2009) 217–225.
- [154] E. Bechor, I. Dahan, T. Fradin, Y. Berdichevsky, A. Zahavi, A. Federman Gross, M. Rafalowski, E. Pick, The dehydrogenase region of the NADPH oxidase component Nox2 acts as a protein disulfide isomerase (PDI) resembling PDIA3 with a role in the binding of the activator protein p67phox, *Front. Chem.* 3 (2015) 3.
- [155] A. Fontayne, P.M.C. Dang, M.A. Gougerot-Pocidallo, J. El-Benna, Phosphorylation of p47phox sites by PKC alpha, beta II, delta, and zeta: effect on binding to p22phox and on NADPH oxidase activation, *Biochemistry.* 41 (2002) 7743–7750.

- [156] C.R. Hoyal, A. Gutierrez, B.M. Young, S.D. Catz, J.H. Lin, P.N. Tschlis, B.M. Babior, Modulation of p47PHOX activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 5130–5135.
- [157] G.M. Bokoch, T. Zhao, Regulation of the phagocyte NADPH oxidase by Rac GTPase, *Antioxid. Redox Signal.* 8 (2006) 1533–1548.
- [158] Y.A. Suh, R.S. Arnold, B. Lassegue, J. Shi, X. Xu, D. Sorescu, A.B. Chung, K.K. Griending, J.D. Lambeth, Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1, *Nature.* 401 (1999) 79–82.
- [159] B. Lassègue, D. Sorescu, K. Szöcs, Q. Yin, M. Akers, Y. Zhang, S.L. Grant, J.D. Lambeth, K.K. Griending, Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways, *Circ. Res.* 88 (2001) 888–894.
- [160] C.Y. Fan, M. Katsuyama, C. Yabe-Nishimura, PKCdelta mediates up-regulation of NOX1, a catalytic subunit of NADPH oxidase, via transactivation of the EGF receptor: possible involvement of PKCdelta in vascular hypertrophy, *Biochem. J.* 390 (2005) 761–767.
- [161] Y. Kuwano, T. Kawahara, H. Yamamoto, S. Teshima-Kondo, K. Tominaga, K. Masuda, K. Kishi, K. Morita, K. Rokutan, Interferon-gamma activates transcription of NADPH oxidase 1 gene and upregulates production of superoxide anion by human large intestinal epithelial cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290 (2006) 433-443.
- [162] S.H. Lee, D.W. Park, S.C. Park, Y.K. Park, S.Y. Hong, J.R. Kim, C.H. Lee, S.H. Baek, Calcium-independent phospholipase A2beta-Akt signaling is involved in lipopolysaccharide-induced NADPH oxidase 1 expression and foam cell formation, *J. Immunol.* 183 (2009) 7497–7504.
- [163] H.E. Boudreau, B.W. Casterline, B. Rada, A. Korzeniowska, T.L. Leto, Nox4 involvement in TGF-beta and SMAD3-driven induction of the epithelial-to-mesenchymal transition and migration of breast epithelial cells, *Free Radic. Biol. Med.* 53 (2012) 1489–1499.
- [164] K.T. Moe, N.O. Yin, T.M. Naylynn, K. Khairunnisa, M.A. Wutyi, Y. Gu, M.S.M. Atan, M.C. Wong, T.H. Koh, P. Wong, Nox2 and Nox4 mediate tumour necrosis factor- α -induced ventricular remodelling in mice, *J. Cell. Mol. Med.* 15 (2011) 2601–2613.
- [165] M. Higashi, H. Shimokawa, T. Hattori, J. Hiroki, Y. Mukai, K. Morikawa, T. Ichiki, S. Takahashi, A. Takeshita, Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses angiotensin II-induced cardiovascular hypertrophy in rats in vivo: effect on endothelial NAD(P)H oxidase system, *Circ. Res.* 93 (2003) 767–775.
- [166] S.A. Manea, A. Todirita, M. Raicu, A. Manea, C/EBP transcription factors regulate NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells, *J. Cell. Mol. Med.* 18 (2014) 1467–1477.
- [167] M. Zana, Z. Péterfi, H.A. Kovács, Z.E. Tóth, B. Enyedi, F. Morel, M.H. Paclet, Á. Donkó, S. Morand, T.L. Leto, M. Geiszt, Interaction between p22phox and Nox4 in the endoplasmic reticulum suggests a unique mechanism of NADPH oxidase complex formation, *Free Radic. Biol. Med.* 116 (2018) 41–49.
- [168] B. Bánfi, F. Tirone, I. Durussel, J. Knisz, P. Moskwa, G.Z. Molnár, K.H. Krause, J. a Cox, Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5), *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 18583–18591.

- [169] D. Pandey, A. Patel, V. Patel, F. Chen, J. Qian, Y. Wang, S.A. Barman, R.C. Venema, D.W. Stepp, R. Daniel Rudic, D.J.R. Fulton, Expression and functional significance of NADPH oxidase 5 (Nox5) and its splice variants in human blood vessels, *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 302 (2012) 1919–1928.
- [170] A.C. Montezano, D. Burger, T.M. Paravicini, A.Z. Chignalia, H. Yusuf, M. Almasri, Y. He, G.E. Callera, G. He, K.H. Krause, D. Lambeth, M.T. Quinn, R.M. Touyz, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Reduced Oxidase 5 (Nox5) Regulation by Angiotensin II and Endothelin-1 Is Mediated via Calcium/Calmodulin-Dependent, Rac-1-Independent Pathways in Human Endothelial Cells, *Circ. Res.* 106 (2010) 1363–1373.
- [171] D.B. Jay, C.A. Papaharalambus, B. Seidel-Rogol, A.E. Dikalova, B. Lassègue, K.K. Griendling, Nox5 mediates PDGF-induced proliferation in human aortic smooth muscle cells, *Free Radic. Biol. Med.* 45 (2008) 329–335.
- [172] J. MacLeod, The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa, *Am. J. Physiol. Content.* 138 (1943) 512–518.
- [173] B. Banfi, G. Molnar, A. Maturana, K. Steger, B. Hegedus, N. Demaurex, K.H. Krause, A Ca²⁺ - activated NADPH Oxidase in Testis, Spleen, and Lymph Nodes, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 37594–37601.
- [174] G. Cheng, Z. Cao, X. Xu, E.G.V. Meir, J.D. Lambeth, Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5, *Gene.* 269 (2001) 131–140.
- [175] D.J.R. Fulton, Nox5 and the Regulation of Cellular Function, *Antioxid. Redox Signal.* 11 (2009) 2443–2452.
- [176] B. Lardy, M. Bof, L. Aubry, M.H. Paclet, F. Morel, M. Satre, G. Klein, NADPH oxidase homologs are required for normal cell differentiation and morphogenesis in *Dictyostelium discoideum*, *Biochim. Biophys. Acta.* 1744 (2005) 199–212.
- [177] T. Kawahara, M.T. Quinn, J.D. Lambeth, Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes, *BMC Evol. Biol.* 7 (2007) 109.
- [178] K. Bedard, V. Jaquet, K.H. Krause, NOX5: from basic biology to signaling and disease, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 725–734.
- [179] C.E. Holterman, J.F. Thibodeau, C. Towaij, A. Gutsol, A.C. Montezano, R.J. Parks, M.E. Cooper, R.M. Touyz, C.R.J. Kennedy, Nephropathy and elevated BP in mice with podocyte-specific NADPH Oxidase 5 expression, *J. Am. Soc. Nephrol.* 25 (2014) 784–797.
- [180] A. Manea, S.A. Manea, A.M. Gan, A. Constantin, I.M. Fenyo, M. Raicu, H. Muresian, M. Simionescu, Human monocytes and macrophages express NADPH oxidase 5; a potential source of reactive oxygen species in atherosclerosis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 461 (2015) 172–179.
- [181] R.S. BelAiba, T. Djordjevic, A. Petry, K. Diemer, S. Bonello, B. Banfi, J. Hess, A. Pogrebniak, C. Bickel, A. Görlach, NOX5 variants are functionally active in endothelial cells, *Free Radic. Biol. Med.* 42 (2007) 446–459.
- [182] X. Fu, D.G. Beer, J. Behar, J. Wands, D. Lambeth, W. Cao, cAMP-response element-binding protein mediates acid-induced NADPH Oxidase NOX5-S expression in Barrett Esophageal Adenocarcinoma cells, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 20368–20382.

- [183] F. Chen, Y. Wang, S. Barman, D.J.R. Fulton, Enzymatic regulation and functional relevance of NOX5, *Curr. Pharm. Des.* 21 (2015) 5999–6008.
- [184] D. Jagnandan, J.E. Church, B. Banfi, D.J. Stuehr, M.B. Marrero, D.J.R. Fulton, Novel mechanism of activation of NADPH oxidase 5. calcium sensitization via phosphorylation, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 6494–6507.
- [185] S.S. Brar, Z. Corbin, T.P. Kennedy, R. Hemendinger, L. Thornton, B. Bommarius, R.S. Arnold, A.R. Whorton, A.B. Sturrock, T.P. Huecksteadt, M.T. Quinn, K. Krenitsky, K.G. Ardie, J.D. Lambeth, J.R. Hoidal, NOX5 NAD(P)H oxidase regulates growth and apoptosis in DU 145 prostate cancer cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285 (2003) 353–369.
- [186] A. Manea, S.A. Manea, I.C. Florea, C.M. Luca, M. Raicu, Positive regulation of NADPH oxidase 5 by proinflammatory-related mechanisms in human aortic smooth muscle cells, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 1497–1507.
- [187] J. Si, J. Behar, J. Wands, D.G. Beer, D. Lambeth, Y. Eugene Chin, W. Cao, STAT5 mediates PAF-induced NADPH oxidase NOX5-S expression in Barrett’s esophageal adenocarcinoma cells, *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* 294 (2007) 174–183.
- [188] C.C. Wei, N. Reynolds, C. Palka, K. Wetherell, T. Boyle, Y.P. Yang, Z.Q. Wang, D.J. Stuehr, Characterization of the 1st and 2nd EF-hands of NADPH oxidase 5 by fluorescence, isothermal titration calorimetry, and circular dichroism, *Chem. Cent. J.* 6 (2012) 29.
- [189] L. Serrander, V. Jaquet, K. Bedard, O. Plastre, O. Hartley, S. Arnaudeau, N. Demaurex, W. Schlegel, K.-H. Krause, NOX5 is expressed at the plasma membrane and generates superoxide in response to protein kinase C activation, *Biochimie.* 89 (2007) 1159–1167.
- [190] F. Chen, Y. Yu, S. Haigh, J. Johnson, R. Lucas, D.W. Stepp, D.J.R. Fulton, Regulation of NADPH Oxidase 5 by Protein Kinase C Isoforms, *PLoS One.* 9 (2014) e88405.
- [191] D. Pandey, D.J.R. Fulton, Molecular regulation of NADPH oxidase 5 via the MAPK pathway, *AJP Hear. Circ. Physiol.* 300 (2011) 1336–1344.
- [192] D. Pandey, J.P. Gratton, R. Rafikov, S.M. Black, D.J.R. Fulton, Calcium/calmodulin-dependent kinase II mediates the phosphorylation and activation of NADPH oxidase 5, *Mol. Pharmacol.* 80 (2011) 407–415.
- [193] K.K. Prior, M.S. Leisegang, I. Josipovic, O. Löwe, A.M. Shah, N. Weissmann, K. Schröder, R.P. Brandes, CRISPR/Cas9-mediated knockout of p22phox leads to loss of Nox1 and Nox4, but not Nox5 activity, *Redox Biol.* 9 (2016) 287–295.
- [194] F. Tirone, J.A. Cox, NADPH oxidase 5 (NOX5) interacts with and is regulated by calmodulin, *FEBS Lett.* 581 (2007) 1202–1208.
- [195] H.N. Fridolfsson, D.M. Roth, P.A. Insel, H.H. Patel, Regulation of intracellular signaling and function by caveolin, *FASEB J.* 28 (2014) 3823–3831.
- [196] I. Lobysheva, G. Rath, B. Sekkali, C. Bouzin, O. Feron, B. Gallez, C. Dessy, J.L. Balligand, Moderate caveolin-1 downregulation prevents NADPH oxidase-dependent endothelial nitric oxide synthase uncoupling by angiotensin II in endothelial cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (2011) 2098–2105.
- [197] F. Chen, S. Barman, Y. Yu, S. Haigh, Y. Wang, S.M. Black, R. Rafikov, H. Dou, Z. Bagi, W. Han, Y. Su, D.J.R. Fulton, Caveolin-1 is a negative regulator of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species, *Free Radic. Biol. Med.* 73 (2014) 201–213.

- [198] F. Chen, D. Pandey, A. Chadli, J.D. Catravas, T. Chen, D.J.R. Fulton, Hsp90 regulates NADPH oxidase activity and is necessary for superoxide but not hydrogen peroxide production, *Antioxid. Redox Signal.* 14 (2011) 2107–2119.
- [199] F. Chen, Y. Yu, J. Qian, Y. Wang, B. Cheng, C. Dimitropoulou, V. Patel, A. Chadli, R.D. Rudic, D.W. Stepp, J.D. Catravas, D.J.R. Fulton, Opposing actions of heat shock protein 90 and 70 regulate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase stability and reactive oxygen species production, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32 (2012) 2989–2999.
- [200] T.J. Guzik, W. Chen, M.C. Gongora, B. Guzik, H.E. Lob, D. Mangalat, N. Hoch, S. Dikalov, P. Rudzinski, B. Kapelak, J. Sadowski, D.G. Harrison, Calcium-dependent NOX5 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase contributes to vascular oxidative stress in human coronary artery disease, *J. Am. Coll. Cardiol.* 52 (2008) 1803–1809.
- [201] J. Hong, D. Li, W. Cao, Rho Kinase ROCK2 Mediates Acid-Induced NADPH Oxidase NOX5-S Expression in Human Esophageal Adenocarcinoma Cells, *PLoS One.* 11 (2016) e0149735.
- [202] J. Hong, M. Resnick, J. Behar, J. Wands, R.A. DeLellis, W. Cao, Role of Rac1 in regulation of NOX5-S function in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301 (2011) 413-420.
- [203] J.C. Jha, C. Banal, J. Okabe, S.P. Gray, T. Hettige, B.S.M. Chow, V. Thallas-Bonke, L. De Vos, C.E. Holterman, M.T. Coughlan, D.A. Power, A. Skene, E.I. Ekinci, M.E. Cooper, R.M. Touyz, C.R. Kennedy, K. Jandeleit-Dahm, NADPH Oxidase Nox5 accelerates renal injury in diabetic nephropathy, *Diabetes.* 66 (2017) 2691–2703.
- [204] C.C. Wei, N. Motl, K. Levek, L.Q. Chen, Y.P. Yang, T. Johnson, L. Hamilton, D.J. Stuehr, Conformational States and Kinetics of the Calcium Binding Domain of NADPH Oxidase 5, *Open Biochem. J.* 4 (2010) 59–67.
- [205] P. Yu, W. Han, V.A.M. Villar, Y. Yang, Q. Lu, H. Lee, F. Li, M.T. Quinn, J.J. Gildea, R.A. Felder, P.A. Jose, Unique role of NADPH oxidase 5 in oxidative stress in human renal proximal tubule cells, *Redox Biol.* 2 (2014) 570–579.
- [206] S. Antony, G. Jiang, Y. Wu, J.L. Meitzler, H.R. Makhlof, D.C. Haines, D. Butcher, D.S. Hoon, J. Ji, Y. Zhang, A. Juhasz, J. Lu, H. Liu, I. Dahan, M. Konate, K.K. Roy, J.H. Doroshov, NADPH oxidase 5 (NOX5) - induced reactive oxygen signaling modulates normoxic HIF-1 α and p27 Kip1 expression in malignant melanoma and other human tumors, *Mol. Carcinog.* 5 (2017).
- [207] S.H. Dho, J.Y. Kim, K.P. Lee, E.S. Kwon, J.C. Lim, C.J. Kim, D. Jeong, K.-S. Kwon, STAT5A-mediated NOX5-L expression promotes the proliferation and metastasis of breast cancer cells, *Exp. Cell Res.* 351 (2017) 51–58.
- [208] T. Shigemura, M. Shiohara, M. Kato, S. Furuta, K. Kaneda, K. Morishita, H. Hasegawa, M. Fujii, A. Gorchach, K. Koike, T. Kamata, Superoxide-Generating Nox5 α Is Functionally Required for the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Induced Cell Transformation Phenotype, *J. Virol.* 89 (2015) 9080–9089.
- [209] X. Zhou, D. Li, M.B. Resnick, J. Wands, W. Cao, NADPH Oxidase NOX5-S and Nuclear Factor B1 Mediate Acid-Induced Microsomal Prostaglandin E Synthase-1 Expression in Barrett's Esophageal Adenocarcinoma Cells, *Mol. Pharmacol.* 83 (2013) 978–990.

- [210] A.S. Kamiguti, L. Serrander, K. Lin, R.J. Harris, J.C. Cawley, D.J. Allsup, J.R. Slupsky, K.H. Krause, M. Zuzel, Expression and activity of NOX5 in the circulating malignant B cells of hairy cell leukemia, *J. Immunol.* 175 (2005) 8424–8430.
- [211] A.C. Montezano, D. Burger, G.S. Ceravolo, H. Yusuf, M. Montero, R.M. Touyz, Novel Nox homologues in the vasculature: focusing on Nox4 and Nox5, *Clin. Sci. (Lond)*. 120 (2011) 131–141.
- [212] E. Crosas-Molist, I. Fabregat, Role of NADPH oxidases in the redox biology of liver fibrosis, *Redox Biol.* 6 (2015) 106–111.
- [213] R.-M. Liu, L.P. Desai, Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis, *Redox Biol.* 6 (2015) 565–77.
- [214] Y.J. Choi, D.H. Kim, S.J. Kim, J. Kim, S.I. Jeong, C.H. Chung, K.Y. Yu, S.Y. Kim, Decursin attenuates hepatic fibrogenesis through interrupting TGF-beta-mediated NAD(P)H oxidase activation and Smad signaling in vivo and in vitro, *Life Sci.* 108 (2014) 94–103.
- [215] C.D. Bondi, N. Manickam, D.Y. Lee, K. Block, Y. Gorin, H.E. Abboud, J.L. Barnes, NAD(P)H oxidase mediates TGF-beta1-induced activation of kidney myofibroblasts, *J. Am. Soc. Nephrol.* 21 (2010) 93–102.
- [216] S. Ismail, A. Sturrock, P. Wu, B. Cahill, K. Norman, T. Huecksteadt, K. Sanders, T. Kennedy, J. Hoidal, NOX4 mediates hypoxia-induced proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells: the role of autocrine production of transforming growth factor- β 1 and insulin-like growth factor binding protein-3, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 296 (2009) 489–499.
- [217] T. Aoyama, Y.H. Paik, S. Watanabe, B. Laleu, F. Gaggini, L. Fioraso-Cartier, S. Molango, F. Heitz, C. Merlot, C. Szyndralewicz, P. Page, D.A. Brenner, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in experimental liver fibrosis: GKT137831 as a novel potential therapeutic agent, *Hepatology.* 56 (2012) 2316–2327.
- [218] Y.H. Paik, K. Iwaisako, E. Seki, S. Inokuchi, B. Schnabl, C.H. Österreicher, T. Kisseleva, D.A. Brenner, The nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NOX) homologues NOX1 and NOX2/gp91phox mediate hepatic fibrosis in mice, *Hepatology.* 53 (2011) 1730–1741.
- [219] S.C. Yanguas, B. Cogliati, J. Willebrords, M. Maes, I. Colle, B. van den Bossche, C.P.M.S. de Oliveira, W. Andraus, V.A.F. Alves, I. Leclercq, M. Vinken, Experimental models of liver fibrosis, *Arch. Toxicol.* 90 (2016) 1025–1048.
- [220] T. Lan, T. Kisseleva, D.A. Brenner, Deficiency of NOX1 or NOX4 prevents liver inflammation and fibrosis in mice through inhibition of hepatic stellate cell activation, *PLoS One.* 10 (2015) 1–19.
- [221] J.X. Jiang, X. Chen, N. Serizawa, C. Szyndralewicz, P. Page, K. Schröder, R.P. Brandes, S. Devaraj, N.J. Török, Liver fibrosis and hepatocyte apoptosis are attenuated by GKT137831, a novel NOX4/NOX1 inhibitor in vivo, *Free Radic. Biol. Med.* 53 (2012) 289–296.
- [222] S. De Minicis, E. Seki, Y.H. Paik, C.H. Österreicher, Y. Kodama, J. Kluwe, L. Torozzi, K. Miyai, A. Benedetti, R.F. Schwabe, D.A. Brenner, Role and cellular source of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in hepatic fibrosis, *Hepatology.* 52 (2010) 1420–1430.

- [223] K. Muffak-Granero, C. Olmedo, F. Garcia-Alcalde, A. Comino, T. Villegas, J.M. Villar, D. Garrote, A. Blanco, P. Bueno, J.A. Ferron, Gene network profiling before and after transplantation in alcoholic cirrhosis liver transplant recipients, *Transplant. Proc.* 44 (2012) 1493–1495.
- [224] H.S. Eun, S.Y. Cho, J.S. Joo, S.H. Kang, H.S. Moon, E.S. Lee, S.H. Kim, B.S. Lee, Gene expression of NOX family members and their clinical significance in hepatocellular carcinoma, *Sci. Rep.* 7 (2017) 11060.
- [225] P. Greenwel, J. Rubin, M. Schwartz, E.L. Hertzberg, M. Rojkind, Liver fat-storing cell clones obtained from a CCl₄-cirrhotic rat are heterogeneous with regard to proliferation, expression of extracellular matrix components, interleukin-6, and connexin 43, *Lab. Invest.* 69 (1993) 210–216.
- [226] B. Kalyanaraman, V. Darley-Usmar, K.J.A. Davies, P.A. Dennery, H.J. Forman, M.B. Grisham, G.E. Mann, K. Moore, L.J. Roberts, H. Ischiropoulos, Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (2012) 1–6.
- [227] J. Hong, M. Resnick, J. Behar, L.J. Wang, J. Wands, R.A. DeLellis, R.F. Souza, S.J. Spechler, W. Cao, Acid-induced p16 hypermethylation contributes to development of esophageal adenocarcinoma via activation of NADPH oxidase NOX5-S, *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* 299 (2010) 697–706.
- [228] S. Carnesecchi, A.L. Rougemont, J.H. Doroshov, M. Nagy, S. Mouche, F. Gumy-Pause, I. Szanto, The NADPH oxidase NOX5 protects against apoptosis in ALK-positive anaplastic large-cell lymphoma cell lines, *Free Radic. Biol. Med.* 84 (2015) 22–29.
- [229] X. Zhou, D. Li, M.B. Resnick, J. Behar, J. Wands, W. Cao, Signaling in H₂O₂-induced increase in cell proliferation in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 339 (2011) 218–227.
- [230] D. Sorescu, D. Weiss, B. Lassègue, R.E. Clempus, K. Szöcs, G.P. Sorescu, L. Valppu, M.T. Quinn, J.D. Lambeth, J.D. Vega, W.R. Taylor, K.K. Griendling, Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis, *Circulation.* 105 (2002) 1429–1435.
- [231] A. Baltanás, J.L. Miguel-Carrasco, G. San José, C. Cebrián, M.U. Moreno, J. Dotor, F. Borrás-Cuesta, B. López, A. González, J. Díez, A. Fortuño, G. Zalba, A synthetic peptide from transforming growth factor- β_1 type III receptor inhibits NADPH oxidase and prevents oxidative stress in the kidney of spontaneously hypertensive rats, *Antioxid. Redox Signal.* 19 (2013) 1607–1618.
- [232] M.L. Block, NADPH oxidase as a therapeutic target in Alzheimer's disease, *BMC Neurosci.* 9 Suppl 2 (2008) 8.
- [233] K. Roy, Y. Wu, J.L. Meitzler, A. Juhasz, H. Liu, G. Jiang, J. Lu, S. Antony, J.H. Doroshov, NADPH oxidases and cancer, *Clin. Sci.* 128 (2015) 863–875.
- [234] J.X. Jiang, N.J. Török, NADPH Oxidases in Chronic Liver Diseases, *Adv. Hepatol.* 2014 (2014).
- [235] D. Li, W. Cao, Bile acid receptor TGR5, NADPH Oxidase NOX5-S and CREB Mediate Bile Acid-Induced DNA Damage In Barrett's Esophageal Adenocarcinoma Cells, *Sci. Rep.* 6 (2016) 31538.

- [236] D. Li, W. Cao, Role of intracellular calcium and NADPH oxidase NOX5-S in acid-induced DNA damage in Barrett's cells and Barrett's esophageal adenocarcinoma cells, *AJP Gastrointest. Liver Physiol.* 306 (2014) 863–872.
- [237] A. Andueza, A. García-Garzón, M. Ruiz de Galarreta, E. Ansorena, M.J. Iraburu, M.J. López-Zabalza, J.J. Martínez-Irujo, Oxidation pathways underlying the pro-oxidant effects of apigenin, *Free Radic. Biol. Med.* 87 (2015) 169–180.
- [238] S. Dikalov, K. Griendling, D. Harrison, Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies, *Hypertension.* 49 (2007) 717–727.
- [239] A. Daiber, M. Oelze, M. August, M. Wendt, K. Sydow, H. Wieboldt, A.L. Kleschyov, T. Munzel, Detection of superoxide and peroxynitrite in model systems and mitochondria by the luminol analogue L-012, *Free Radic. Res.* 38 (2004) 259–269.
- [240] T. Kawahara, H.M. Jackson, S.M.E. Smith, P.D. Simpson, J.D. Lambeth, Nox5 Forms a Functional Oligomer Mediated by Self-Association of Its Dehydrogenase Domain, *Biochemistry.* 50 (2011) 2013–2025.
- [241] S.I. Dikalov, D.G. Harrison, Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014) 372–382.
- [242] G. Santulli, R. Nakashima, Q. Yuan, A.R. Marks, Intracellular calcium release channels: an update, *J. Physiol.* 595 (2017) 3041–3051.
- [243] J.C. Jha, A.M.D. Watson, G. Mathew, L.C. de Vos, K. Jandeleit-Dahm, The emerging role of NADPH oxidase NOX5 in vascular disease, *Clin. Sci.* 131 (2017) 981–990.
- [244] M. Höll, R. Koziel, G. Schäfer, H. Pircher, A. Pauck, M. Hermann, H. Klocker, P. Jansen-Dürr, N. Sampson, ROS signaling by NADPH oxidase 5 modulates the proliferation and survival of prostate carcinoma cells, *Mol. Carcinog.* 55 (2016) 27–39.
- [245] S.H. Dho, J.Y. Kim, E.S. Kwon, J.C. Lim, S.S. Park, K.-S. Kwon, NOX5-L can stimulate proliferation and apoptosis depending on its levels and cellular context, determining cancer cell susceptibility to cisplatin, *Oncotarget.* 6 (2015) 39235–39246.
- [246] M. Rojkind, J.A. Domínguez-Rosales, N. Nieto, P. Greenwel, Role of hydrogen peroxide and oxidative stress in healing responses, *Cell. Mol. Life Sci.* 59 (2002) 1872–1891.
- [247] I. Cucoranu, R. Clempus, A. Dikalova, P.J. Phelan, S. Ariyan, S. Dikalov, D. Sorescu, NAD(P)H oxidase 4 mediates transforming growth factor-beta1-induced differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts, *Circ. Res.* 97 (2005) 900–907.
- [248] Y.M. Kim, M. Cho, Activation of NADPH oxidase subunit NCF4 induces ROS-mediated EMT signaling in HeLa cells, *Cell. Signal.* 26 (2014) 784–796.
- [249] A. Sturrock, B. Cahill, K. Norman, T.P. Huecksteadt, K. Hill, K. Sanders, S. V Karwande, J.C. Stringham, D.A. Bull, M. Gleich, T.P. Kennedy, J.R. Hoidal, P. Thomas, C. Stringham, Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 290 (2006) 661–673.
- [250] V. Proell, I. Carmona-Cuenca, M.M. Murillo, H. Huber, I. Fabregat, W. Mikulits, TGF-beta dependent regulation of oxygen radicals during transdifferentiation of activated hepatic stellate cells to myofibroblastoid cells, *Comp. Hepatol.* 6 (2007) 1.

- [251] R. Accetta, S. Damiano, A. Morano, P. Mondola, R. Paternò, E. V Avvedimento, M. Santillo, Reactive Oxygen Species Derived from NOX3 and NOX5 Drive Differentiation of Human Oligodendrocytes, *Front. Cell. Neurosci.* 10 (2016) 146.
- [252] R.P. Brandes, N. Weissmann, K. Schröder, Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation, *Free Radic. Biol. Med.* 76 (2014) 208–226.
- [253] M.J. Morgan, Z. Liu, Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling, *Cell Res.* 21 (2011) 103–115.
- [254] R.A. Rippe, L.W. Schrum, B. Stefanovic, J.A. Solís-Herruzo, D.A Brenner, NF-kappaB inhibits expression of the alpha1(I) collagen gene, *DNA Cell Biol.* 18 (1999) 751–761.
- [255] L. Hassan-Montero, P. Bueno, C. Olmedo, A.M. Comino, K. Muffak-Granero, F. Garcia-Alcalde, M. Serradilla, J.M. Villar, D. Garrote, A. Blanco, J.A. Ferrón, Gene expression profiling in liver transplant recipients with alcoholic cirrhosis, *Transplant. Proc.* 40 (2008) 2955–2958.
- [256] R.D. Rajaram, R. Dissard, V. Jaquet, S. de Seigneux, Potential benefits and harms of NADPH oxidase type 4 in the kidneys and cardiovascular system, *Nephrol. Dial. Transplant.* (2018).

ANEXOS

1. ANEXO 1: SECUENCIA PLÁSMIDO pcDNA 3.2-NOX5β

La secuencia del plásmido de expresión pcDNA 3.2-Nox5β en formato FASTA es el siguiente (la secuencia en negrita y con mayor tamaño es el inserto):

```
GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCT
GCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAA
TTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTA
TTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGT
AAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA
GGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAA
GTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTAC
TTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCG
GTTTGACTCACGGGGATTCCAAGTCTCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGCACAAAATCAACGGGACTTT
CCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGGGAGGTCTATAAAGCAGAGC
TCTCTGGCTAAGTAGAGAACCCTACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAG
TTAAGCTATCAACAAGTTGTACAAACACCATGAGTGCCGAGGAGGATGCCAGGTGGCTCCGGTGGGTG
ACTCAGCAGTTTAAGACCATTGCAGGAGAAGATGGGGAGATCAGCCTGCAAGAATTCAAAGCAG
CTCTGCATGTGAAAGAGTCCTTCTTTGCAGAGCGATTCTTTGCCCTATTTGACTCCGATAGAAGTG
GCACCATCACCTCCAGGAGCTGCAGGAGGCACTGACCCTGCTCATCCATGGCAGCCCCATGGAC
AAACTCAAATTCCTCTTCCAGGTGTATGACATCGATGGCAGTGGCTCCATTGACCCGGATGAGCTG
CGCACTGTGCTGCAGTCGTGTCTGCGCGAGAGCGCCATCTCGCTGCCTGACGAGAAGCTGGACCA
GCTGACGCTGGCGCTCTTGAATCGGCCGACGCGGACGGCAACGGGGCCATCACCTTCGAGGAG
CTCCGGGACGAGCTGCAGCGCTTCCCGGAGTCATGGAGAACCTGACCATCAGCGCTGCCCACTG
GCTGACGGCCCCCGCCCCCGCCACGCCGCGCCGCGCCAGCTGACCCGCGCCTACTGGCA
CAACCACCGCAGCCAGCTGTTCTGCCTGGCCACCTATGCAGGCCTCCACGTGCTGCTCTTCGGGCT
GGCGGCCAGCGCGCACCGGGACCTCGGCGCCAGCGTCATGGTGGCCAAGGGCTGTGGCCAGTGC
CTCAACTTCGACTGCAGCTTCATCGCGGTGCTGATGCTCAGACGCTGCCTCACCTGGCTGCGGGCC
ACGTGGCTGGCTCAAGTCTTACCACTGGACCAGAACATCCAGTTCACCAGCTTATGGGCTACGTG
GTAGTGGGGCTGTCCCTCGTGCACACTGTGGCTCACACTGTGAACCTTGTACTCCAGGCTCAGGCG
GAGGCCAGCCCTTTCCAGTCTGGGAGCTGCTGCTCACCACGAGGCCTGGCATTGGCTGGGTACA
CGGTTCCGGCCTCCCCGACAGGTGTCGCTCTGCTGCTGCTCCTCCTCATGTTTCTGCTCCAGT
TCCTGCATCCGAGGAGTGGCCACTTTGAGGTGTTCTATTGGACTCACCTGTCTACCTCCTCGTGT
GGCTTCTGCTCATCTTTCATGGGCCCAACTTCTGGAAGTGGCTGCTGGTGCCTGGAATCTTGTTTTT
CCTGGAGAAGGCCATCGGACTGGCAGTGTCCCGCATGGCAGCCGTGTGCATCATGGAAGTCAACC
TCCTCCCCTCAAGGTCATCTCCTCATCAAGCGGCCCTTTTTTTCACTATAGACCTGGTGAC
TACTTGTATCTGAACATCCCCACCATTGCTCGCTATGAGTGGCACCCCTTACCATCAGCAGTGCTC
CTGAGCAGAAAGACTATCTGGCTGCACATTCGGTCCCAAGGCCAGTGGACAAACAGGCTGTAT
GAGTCCTTCAAGGCATCAGACCCACTGGGCCGTGGTCTAAGAGGCTGTGAGGAGTGTGACAAAT
GAGAAAGAGTCAAAGGTCGTTCAAGGGCTCTGAGATACTTTTGGAGAAACACAAATTCTGTAAC
ATCAAGTGTACATCGATGGGCCTTATGGGACCCCCACCCGAGGATCTTTGCCTCTGAGCATGCC
GTGCTCATCGGGCAGGCATCGGCATCACCCCTTTGCTTCCATTCTGCAGAGTATCATGTACAGG
```

CACCAGAAAAGAAAGCATACTTGCCCCAGCTGCCAGCACTCTGGATCGAAGGTGTCCAAGACAA
CATGAAGCTCCATAAGGTGGACTTTATCTGGATCAACAGAGACCAGCGGTCTTTCGAGTGGTTG
TGAGCCTGCTGACTAACTGGAGATGGACCAGGCCGAGGAGGCTCAATACGGCCGCTTCTGGA
GCTGCATATGTACATGACATCTGCACTGGGCAAGAATGACATGAAGGCCATTGGCCTGCAGATGG
CCCTTGACCTCTGGCCAACAAGGAGAAGAAAGACTCCATCACGGGGCTGCAGACGCGCACCCA
GCCTGGGCGGCCTGACTGGAGCAAGGTGTTCCAGAAAGTGGCTGCTGAGAAGAAGGGCAAGGT
GCAGGTCTTCTTGTGGCTCCCCAGCTCTGGCCAAGGTGCTGAAGGGCCATTGTGAGAAGTTCG
GCTTCAGATTTTTCAAGAGAATTTCTAGCTCGA

GTACAAAGTGGTTGATCTAGAGGGCCCGGTTCTGAAGG
TAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTTAGTAATGAGTTAAACGGGGGAGGCTAACTGA
AACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAAGACAGAATAAACGCGACGGGTGTTGG
GTCGTTTGTTCATAAACCGGGGGTTCGGTCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCCATGGGGCCAATA
CGCCCGGTTTCTTCTTTTCCCAACCCACCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGC
AGGCCCTGCCATAGCAGATCTGCGCAGCTGGGGCTCTAGGGGTATCCCAACGCGCCCTGTAGCGGGCATTAAAGCGCG
CGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTCCTT
CTCGCCACGTTCCGCGGCTTCCCCGTCAGCTCAATCGGGGCATCCCTTAGGGTCCGATTTAGTGCTTACGGCACCT
CGACCCAAAAAAGTATTAGGGTGTGGTTCACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTG
GAGTCCACGTTCTTAAATAGTGGACTCTTGTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAA
GGGATTTGGGGATTCGGCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTAACGCGAATTAATTCTGTGGAATGT
GTGTCAGTTAGGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAAC
CAGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCC
GCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTATTTA
TGCAGAGCCGAGGCCGCTCTGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAA
AAAGCTCCGGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGA
TGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCT
CTGATGCCCGCTGTTCCGGCTGTGAGCGCAGGGGCGCCCGTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAATG
AACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGTATCGTGGCTGGCCACGACGGCGTTCCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGCTCACT
GAAGCGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGCGAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCAGAA
AGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTATCGGCTACCTGCCATTGACCACCAAGCGAAACA
TCGCATCGAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCG
CGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGC
TTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCTGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAG
GACATAGCGTTGGTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTACGGTATC
GCCGCTCCCGATTGCGCAGCGCATGCCTTCTATCGCTTCTTACGAGTCTTCTGAGCGGACTCTGGGGTTCGCGAAATG
ACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTTGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATC
GTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGATCTCATGCTGGAGTCTTCCGCCACCCAACTGTTTATTG
CAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAATTTACAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGT
TTGTCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCT
GTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGC
CTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCAT
TAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGTTTGCATTGGGCGCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGC
TCGGTCTGTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCAAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGC
AGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTCCATAGG
CTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAATAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCA
GGCGTTTTCCCTGGAAGTCCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTT
GGGAAGCGTGGCGTTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCAAGCTGGGCTGTG
GCACGAACCCCGTTAGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTA
TCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGT

GCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGG
 TAGTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGGTTCGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAA
 AGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACACGTTAAGGGATTTTGGT
 ATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTA
 AACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCCATAGTTGCCT
 GACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCAC
 GCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCG
 CCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCAT
 TGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTTGGTATGGCTTATTAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACA
 TGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTAT
 CACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCA
 ACCAAGTCACTTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACAT
 AGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCTTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCA
 GTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCAACTGATCTTACGATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGG
 AAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTACTCTTCTTTTCAATATTATTG
 AAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGC
 ACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC

2. ANEXO 2: SECUENCIA PLÁSMIDO pcDNA 3.2-NOX5ε

La secuencia del plásmido de expresión pcDNA 3.2-Nox5ε en formato FASTA es el siguiente (la secuencia en negrita y con mayor tamaño es el inserto):

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCAGTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCT
 GCTCCCTGCTTGTGTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCGCGAGCAAAATTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAA
 TTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTA
 TTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGT
 AAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA
 GGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAA
 GTACGCCCTTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTAC
 TTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCG
 GTTTACTCACGGGATTTCCAAGTCTCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGCACAAAATCAACGGGACTTT
 CCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTTATATAAGCAGAGC
 TCTCTGGCTAACTAGAGAACCCTGCTTACTGGCTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAG
 TTAAGCTATCAACAAGTTGTACTCCGGGACGAGCTGCAGCGCTTCCCGGAGTCATGGAGAACCTGACC
ATCAGCGCTGCCACTGGCTGACGGCCCCCGCCCCCGCCACGCCC GCGCCGGCCGCGCCAGCTG
ACCCGCGCTACTGGACAACCACCGCAGCCAGCTGTTCTGCCTGGCCACCTATGCAGGCCTCCAC
GTGCTGCTTTCGGGCTGGCGGCCAGCGCACCCGGGACCTCGGCGCCAGCGTCATGGTGGCCAA
GGGCTGTGGCCAGTGCCTCAACTTCGACTGCAGCTTCATCGCGGTGCTGATGCTCAGACGCTGCCT
CACCTGGCTGCGGGCCACGTGGCTGGCTCAAGTCCCTACCACTGGACCAGAACATCCAGTCCACCA
GCTTATGGGCTACGTGGTAGTGGGGCTGTCCCTCGTGACACTGTGGCTCACACTGTGAACTTTGT
ACTCCAGGCTCAGGCGGAGGCCAGCCCTTCCAGTTCTGGGAGCTGCTGCTACCACGAGGCCTG
GCATTGGCTGGGTACACGGTTCGGCCTCCCCGACAGGTGTCGCTCTGCTGCTGCTCCTCCTCAT
GTTTCTGCTCCAGTTCCTGCATCCGAGGAGTGGCCACTTTGAGGTGTTCTATTGGACTCACCTG
TCCTACCTCCTCGTGTGGCTTCTGCTCATCTTTCATGGGCCAACTTCTGGAAGTGGCTGCTGGTGC
CTGGAATCTTGTTCCTGGAGAAGGCCATCGGACTGGCAGTGTCCCGCATGGCAGCCGTGTGC
ATCATGGAAGTCAACCTCCTCCCCTCAAGGTCATCTCCTCATCAAGCGGCCCCCTTTTTTTTCA
CTATAGACCTGGTACTACTTGTATCTGAACATCCCCACCATTGCTCGCTATGAGTGGCACCCCTTC

ACCATCAGCAGTGTCTCTGAGCAGAAAGACACTATCTGGCTGCACATTCGGTCCCAAGGCCAGTG
GACAAACAGGCTGTATGAGTCTTCAAGGCATCAGACCCACTGGGCCGTGGTTCTAAGAGGCTGT
CGAGGAGTGTGACAATGAGAAAGAGTCAAAGGTCGTCCAAGGGCTCTGAGATACTTTTGGAGAA
ACACAAATTCTGTAACATCAAGTGCTACATCGATGGGCCTTATGGGACCCCCACCCGAGGATCTT
TGCTCTGAGCATGCCGTGCTCATCGGGCAGGCATCGGCATCACCCCCTTTGCTTCCATTCTGCA
GAGTATCATGTACAGGCACCAGAAAAGAAAGCATACTTGCCCCAGCTGCCAGCACTCCTGGATCG
AAGGTGTCCAAGACAACATGAAGCTCCATAAGGTGGACTTTATCTGGATCAACAGAGACCAGCG
GTCTTTGAGTGGTTGTGAGCCTGCTGACTAAACTGGAGATGGACCAGGCCGAGGAGGCTCAAT
ACGGCCGCTTCTGGAGCTGCATATGTACATGACATCTGCACTGGGCAAGAATGACATGAAGGCC
ATTGGCCTGCAGATGGCCCTTGACCTCCTGGCCAACAAGGAGAAGAAAGACTCCATCACGGGGCT
GCAGACGCGCACCCAGCCTGGGCGGCCTGACTGGAGCAAGGTGTTCCAGAAAGTGGCTGCTGAG
AAGAAGGGCAAGGTGCAGGTCTTCTTCTGTGGCTCCCCAGCTCTGGCCAAGGTGCTGAAGGGCCA
TTGTGAGAAGTTGGCTTCAAGATTCTTCAAGAGAATTTCTAGCAAAGTGGTTGATCTAGAGGGCCCGCGG
TTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTTAGTAATGAGTTAAACGGGGGAGG
CTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAACGCACG
GGTGTGGGTGCTTTGTTATAAACCGGGGGTTCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTCGATACCCACCGAGACCCATTGG
GGCAATACGCCCGCTTCTTCTTTTCCCCACCCACCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCCG
GGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCAGATCTGCGCAGCTGGGGCTTAGGGGGTATCCACCGCGCCTGTAGCGGCGCATT
AGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTACCCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCTTTGCTTTCTTCC
CTTCTTTCTCGCCAGTTCGCGGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGCATCCCTTAGGGTCCGATTAGTGTCTTAC
GGCACCTCGACCCAAAAAATTGATTAGGGTGTGGTTCACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCCGCTTT
GACGTTGGAGTCCAGTCTTAAATAGTGGACTCTGTTCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTG
ATTTATAAGGGATTTGGGGATTTGGCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTAACGCGAATTAATTCTG
TGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTA
GTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAA
CCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTT
TTTTTATTATGCAAGAGGCCGAGGCCCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTGGAGGCCTAG
GCTTTTGCAAAAAGCTCCCGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGAT
TGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGACAACAGACAA
TCGGCTGCTCTGATGCCCGGTGTTCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTG
CCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCAGCTGTGCTCGAC
GTTGCTACTGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATTGGCGAAGTCCCGGGCAGGATCTCCTGTCTCACCTTGCTCCT
GCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTGACACCAA
GCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCA
GGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTGTGACCCATGGCG
ATGCCTGCTTCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTCTGGATTATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACC
GCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTT
ACGGTATCGCCGCTCCGATTTCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTGACGAGTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTC
GCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCT
TCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGATCTCATGCTGGAGTCTTCCGCCACCCCAACT
GTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTA
GTTGTGGTTTGTCAAACCTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGG
TCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGAAAGCCT
GGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGCTGTCGA
GCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTGCATTTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTC
GCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGG
ATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCGTTTTTC
CATAGGCTCCGCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAG
ATACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTT
TCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCAAGCTGGG
CTGTGTGCACGAACCCCGTTAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGTAAGACAC
GACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAA

GTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAG
AGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAG
AAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCACGTTAAGGGAT
TTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTAAATAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATAT
ATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATA
GTTGCCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGA
GACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAAC
TTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTT
GTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGC
GAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGC
AGTGTTACTCATGTTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTG
AGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGGACCGAGTTGCTTTGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCG
CGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTT
GAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAGTATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAA
AAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTTCTTTTTTCAAT
ATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAACAATAGGGGT
TCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC

3. ANEXO 3: PUBLICACIONES

Oxidation pathways underlying the pro-oxidant effects of apigenin

Andueza A, García-Garzón A, Ruiz de Galarreta M, Ansorena E, Iraburu MJ, López-Zabalza MJ, Martínez-Irujo JJ

Free Radical Biology & Medicine. 2015 Oct;87:169-80.

doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.003.

NADPH oxidase 5 promotes proliferation and fibrosis in human hepatic stellate cells

Andueza A, Garde N, García-Garzón A, Ansorena E, López-Zabalza MJ, Iraburu MJ, Zalba G, Martínez-Irujo JJ.

Free Radical Biology & Medicine. 2018 Jul 21;126:15-26.

doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.013.

Andueza A, García-Garzón A, Ruiz de Galarreta M, et al, Oxidation pathways underlying the pro-oxidant effects of apigenin. *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, 87:169-80. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.003>

Andueza A, Garde N, García-Garzón A, et al, NADPH oxidase 5 promotes proliferation and fibrosis in human hepatic stellate cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 2018, 21;126:15-26. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.013>