

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Disfunción endotelial renal y estrés oxidativo en la obesidad:
papel de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK)**

**Renal endothelial dysfunction and oxidative stress in obesity :
role of AMP-related kinase (AMPK)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Claudia Rodríguez Prados

Directores

Dolores Prieto Ocejo
Luis Rivera de los Arcos
Cristina Contreras

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Disfunción endotelial renal y estrés oxidativo en la obesidad: papel de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK)

Renal endothelial dysfunction and oxidative stress in obesity: role of AMP-related kinase (AMPK)

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Claudia Rodríguez Prados

DIRECTORES

Prof. Dra. Dolores Prieto Ocejo

Prof. Dr. Luis Rivera de los Arcos

Dra. Cristina Contreras Jiménez

Madrid, 2021

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



TESIS DOCTORAL

**DISFUNCIÓN ENDOTELIAL RENAL Y ESTRÉS OXIDATIVO
EN LA OBESIDAD: PAPEL DE LA PROTEÍNA QUINASA
ACTIVADA POR AMP (AMPK)**

**Renal endothelial dysfunction and oxidative stress in obesity: role of
AMP-related kinase (AMPK)**

Claudia Rodríguez Prados

DIRECTORES

Prof. Dra. Dolores Prieto Ocejo
Prof. Dr. Luis Rivera de los Arcos
Dra. Cristina Contreras Jiménez

MADRID, 2021



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Los doctores Dolores Prieto Ocejo, Catedrática, Luis Rivera de los Arcos, Catedrático y Cristina Contreras Jiménez, Profesora Contratada Doctor de la Sección Departamental de Fisiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que D^a Claudia Rodríguez Prados, Graduada en Farmacia, ha realizado bajo nuestra dirección, el trabajo de investigación titulado “DISFUNCIÓN ENDOTELIAL RENAL Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LA OBESIDAD: PAPEL DE LA PROTEÍNA QUINASA ACTIVADA POR AMP (AMPK)// Renal endothelial dysfunction and oxidative stress in obesity: role of AMP-related kinase (AMPK)” como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, Julio 2021

Prof. Dra. Prieto Ocejo Prof. Dr. Rivera de los Arcos Dra. Contreras Jiménez

A mis padres y a mi hermana Sara

“Estoy entre aquellos que piensan que la ciencia tiene una gran belleza”

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

En las próximas páginas me gustaría dedicar unas palabras a todas aquellas personas que me han apoyado, enseñado y acompañado en este largo camino de gran crecimiento profesional y personal que ha sido para mí la Tesis.

En primer lugar, quiero agradecer enormemente a mis directores Prof. Dra. Dolores Prieto, Prof. Dr. Luis Rivera y Dra. Cristina Contreras por todo lo que me habéis enseñado a lo largo de estos años. Lola, eres para mí un referente, mi mentora y un gran ejemplo de resiliencia y de lucha por lo que uno quiere, transmites una gran pasión por la ciencia y amor por la fisiología. Has sido un motor de energía fundamental todo este tiempo, muchas gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de realizar este proyecto. Luis, muchas gracias por tu apoyo incondicional y tus palabras de ánimo siempre, tus historias y anécdotas científicas, he aprendido mucho de ti. Cristina, eres una fuente de energía positiva y buen rollo y lo contagias a todos los que te rodean. No me imagino este proyecto sin ti, has sido un apoyo fundamental y hemos pasado muy buenos momentos, mil anécdotas, risas y fiestas, en especial el congreso de Cádiz, las estancias y los viajes por Santiago de Compostela los llevaré conmigo siempre. ¡Eres genial!

Al Dr. Miguel López por su amabilidad, su colaboración, su ayuda y rigor científico y por poner a nuestra disposición todo el material y equipamiento necesarios durante las estancias en el CIMUS de la Universidad de Santiago de Compostela. Gracias a todo su grupo de investigación por su apoyo y su gran acogida.

A la Dr. Carmen Martínez y al Dr. Ramaroson Andriantsitohaina muchas gracias por darme la oportunidad de realizar la estancia predoctoral en vuestro laboratorio SOPAM en Angers, fue una experiencia muy enriquecedora a nivel científico y personal. Aprovecho también para agradecer a todos los miembros del equipo por ayudarme y enseñarme todas las técnicas que eran nuevas para mí. Merci beaucoup!

Al Dr. Javier Saénz-Medina, gracias por tu colaboración con el Departamento y por proporcionarnos y facilitarnos esas valiosas muestras y material que han enriquecido tanto el trabajo de esta investigación.

También quiero agradecer de forma especial a la Dra. Ana Sánchez y a la Dra. Mercedes Muñoz. Ana, muchas gracias por todo lo que me has enseñado desde que entré por primera vez en el departamento, por tu paciencia y tu tranquilidad, por animarme en los malos momentos, por tus buenos consejos y tu sentido del humor. Es un placer haber podido trabajar contigo tantas horas en el laboratorio y conocerte mejor, eres una persona maravillosa. Merche, me faltan páginas para agradecerte todo el apoyo que me has ofrecido desde que te conozco. Es una suerte haber compartido la estancia en Angers contigo, fue una experiencia inolvidable que nos unió mucho. ¡Eres un ejemplo de lucha y esfuerzo, te admiro mucho, te deseo lo mejor en la vida y aquí cuentas con una amiga!

Por supuesto, quiero dar las gracias al resto de profesores del Departamento por acogerme y hacerme sentir como en mi segunda casa y por enseñarme tanto durante las clases de la carrera y la Tesis, gracias a vosotros comparto esa pasión por la fisiología. Gracias al Prof. Dr. Albino García Sacristán, a la Prof. Dra. Sara Benedito, al Prof. Dr. Medardo Hernández, a la Dra. Paz Recio, a la Dra. Elvira López-Oliva, a la Dra. Belén Climent, al Dr. Ángel Agís, a la Dra. Rafaela Raposo, al Dr. Vítor Leite, al Dr. Jorge Navarro y a la Dra. Pilar Montenegro. Tito recordaré con cariño tus piques futboleros ¡Hala Madrid!; Sara te admiro mucho, me gustaría si llego algún día a dar clases parecerme un poco a ti; Elvira gracias por tu cercanía, tu calidez, tu simpatía y tus ánimos; Paz y Belén gracias por vuestra alegría, cariño y todos los buenos ratos compartidos en las comidas; Vítor gracias por las charlas y los cafés que hemos compartido; Jorge gracias por tu energía positiva y buen rollo siempre.

Me gustaría recordar de forma especial a la Dra. Cristina Martínez, profesora muy querida y gran persona a la que siempre echaremos de menos.

Gracias a Francisco Puente, Manuel Perales, Macarena Martín y Carmen Bragado por vuestra labor técnica y administrativa, aportáis alegría y hacéis mucho más fácil el día a día. Paco, eres el alma, el pegamento y la alegría del laboratorio y siempre nos sacas una sonrisa. Voy a echar de menos los chistes, la música por la mañana y sobre todo esos mojitos tan ricos que haces. Manolo, gracias por escuchar mis agobios, tu tranquilidad y tus ánimos y por esas grandes charlas por las tardes. Maca, mil gracias por tu buen sentido del humor y por toda tu ayuda en secretaría, el estrés de los papeles y los plazos se lleva mejor gracias a gente como tú.

A Álex, gran compañero de laboratorio y amigo, gracias por todos los buenos momentos, nuestras charlas en la cafetería, las risas y por ayudarme tanto durante el doctorado. Te mereces y te deseo lo mejor en el futuro, ya iré a visitarte a Estados Unidos. A Raquel, compañera de doctorado, gracias por tus ánimos y por escuchar mis agobios, tengo muchos buenos recuerdos de nuestro curso de verano en El Escorial. A los futuros doctores, Alfonso mucho ánimo y suerte en esta difícil pero productiva y enriquecedora etapa, cuenta conmigo para lo que necesites. ¡Gracias por las risas y las quedadas, eres un gran compañero!

Gracias a Xavi y a Álvaro, el spanish team en Angers, que junto con Merche fuisteis mi familia durante los meses de la estancia, guardo muy buenos recuerdos y un gran cumpleaños sorpresa en París.

A mis amigas de Farmacia, Ángela, Marisol, Lidia, Inés, Lara y Yajie, gracias por todas las quedadas, el gocheo, los viajes y las aventuras que hemos compartido a lo largo de todos estos años. ¡Os quiero maripilis!

A mis amigas Ubi y Yami que desde la distancia y con vuestros largos audios de WhatsApp me habéis acompañado y me habéis enviado vuestras energías positivas.

A mi amiga Teresa, por tus grandes consejos siempre tan acertados y sabios.

A mi amiga Rocío, por tu amistad desde que entramos en la carrera, has sido un gran apoyo para mí durante estos años de tanto esfuerzo y duro trabajo, me has escuchado y animado muchísimo y nuestras quedadas me han dado la vida. ¡Gracias!

A mi amiga Cristina, gracias por tu larga amistad, que dura ya más de 20 años. Gracias por tu alegría, las risas y todas las grandes anécdotas que compartimos ¡Por muchos más años de amistad, te quiero mucho!

A mi tío Rafa, por animarme y darme ese empujoncito que necesitaba para empezar este proyecto. Eres un crack, te admiro y te quiero muchísimo.

A mis primos y tíos, gracias por vuestro apoyo.

A mis abuelos, por vuestros piropos, cariño y amor incondicional ¡Sois los mejores y os quiero mucho!

Por último, quería agradecer y dedicar de forma muy especial esta Tesis Doctoral a mis padres y a mi hermana, sois mi hogar y sin vosotros este proyecto no hubiese sido posible y no tendría sentido.

A mi hermana Sara, por ser la persona más importante y que más quiero en el mundo. Estos años han sido muy intensos para las dos y has sido y serás siempre mi roca y yo la tuya. Te admiro muchísimo por tu esfuerzo, tu compromiso, tu valor, tu fortaleza, tu alegría, tu ternura, esa sonrisa que no desaparece y se contagia y podría seguir... Eres un ejemplo para mí y es una suerte tenerte como hermana. Además, me has ayudado muchísimo con la maquetación de la Tesis, eres una artista increíble en todo lo que haces. ¡TE QUIERO INFINITO!

A mis padres, por darme el mayor regalo que es la vida. Gracias por todo vuestro apoyo, vuestros sabios consejos y nuestras largas charlas. Sois mis referentes, gracias por todos los valores que me habéis enseñado. El orgullo y el esfuerzo de esta Tesis es tanto mío como vuestro. ¡Sois los mejores! ¡OS QUIERO MUCHÍSIMO!

Este trabajo de investigación ha sido financiado gracias al Proyecto SAF2016-77526-R del Ministerio de Economía y Competitividad (España) y al Proyecto PID2019-105689RB-I00 del Ministerio de Ciencia e Innovación, cuya investigadora principal es la Prof. Dra. Dolores Prieto Ocejo y la Ayuda para la Formación de Profesorado Universitario FPU16/04582 del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (España).



ÍNDICE

SUMMARY	1
RESUMEN.....	7
ABREVIATURAS	13
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	19
1.1 AMPK	21
1.1.1 Expresión, estructura y regulación	22
1.1.2 Función metabólica, autofagia y biogénesis mitocondrial	26
1.1.3 AMPK y función vascular	31
1.1.4 AMPK y especies reactivas de oxígeno (ROS) en la vasculatura	38
1.1.5 AMPK e inflamación vascular	43
1.1.6 AMPK, hipoxia e isquemia/reperfusión (I/R).....	48
1.2 AMPK Y RIÑÓN	52
1.2.1 Expresión de la AMPK en el riñón.....	55
1.2.2 Papel de la AMPK en la regulación de procesos fisiológicos en el riñón	56
1.3 AMPK, OBESIDAD Y ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.....	60
1.3.1 Obesidad y enfermedad renal crónica: fisiopatología	61
1.3.2 Alteración de la AMPK en la enfermedad renal crónica asociada a obesidad.....	64
1.3.3 Perspectivas terapéuticas de los activadores de la AMPK: enfermedades metabólicas y enfermedad renal crónica	76
2. REVIEW	83
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	111
4. RESULTADOS	115
4.1 Activation of the AMP-related kinase (AMPK) induces renal vasodilatation and downregulates Nox-derived reactive oxygen species (ROS) generation.....	117
4.2 AMPK activation ameliorates kidney vascular dysfunction, oxidative stress and inflammation in obesity	135
5. DISCUSIÓN.....	187
5.1 PAPEL DE LA AMPK EN LA FUNCIÓN VASCULAR RENAL	189
5.1.1 Papel de la AMPK en la vasodilatación renal	189
5.1.2 Mecanismos de las acciones vasculares de la AMPK a nivel endotelial	190
5.1.3 Mecanismos de las acciones vasculares de la AMPK a nivel de MLV	191
5.1.4 AMPK y NADPH oxidasas	194
5.2 PAPEL DE LA AMPK EN LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL RENAL Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LA OBESIDAD.....	195
5.2.1 AMPK y disfunción vascular renal.....	195
5.2.2 Efectos beneficiosos de la activación de la AMPK sobre la disfunción vascular renal.....	197
5.2.3 Efectos beneficiosos de la activación de la AMPK sobre la inflamación.....	199
5.2.4 Efectos beneficiosos de la activación de la AMPK sobre el estrés oxidativo	200
6. CONCLUSIONES.....	203
7. BIBLIOGRAFÍA.....	209



SUMMARY

**Renal endothelial dysfunction and oxidative stress in obesity:
role of AMP-related kinase (AMPK)**

AMPK is a key cellular energy sensor that is activated in energy deficiency states to stimulate catabolic pathways such as glycolysis and β -oxidation of fatty acids and thus obtain ATP that ensures homeostasis and cell survival (Hardie et al., 2016). In addition to its role in metabolism, AMPK participates in the regulation of autophagy (Akers et al., 2012), mitochondrial biogenesis (Zong et al., 2002) and vascular function (Salt & Hardie, 2017). AMPK is also involved in the regulation of ROS production derived from NADPH oxidases and mitochondria in the vasculature (Wang et al., 2012), as well as in the modulation of vascular inflammation (Katerelos et al., 2010).

The kidney is an organ with a high metabolic rate and energy consumption. AMPK is abundantly expressed in the kidney and is implicated in the regulation of tubular transport, lipids and glucose metabolism and podocyte function, among many other functions (Hallows KR, 2010). However, its role in the renal vasculature is unknown.

Obesity is a public health problem of increasing prevalence worldwide and represents a risk factor for the development of chronic kidney disease independently of diabetes, hypertension and other comorbidities (De Vries et al., 2014). AMPK activity in the kidney has been reported to be altered or decreased in metabolic diseases and has been linked to diabetic and obesity- associated nephropathy. AMPK dysfunction in the kidney is implicated in the processes leading to progressive and irreversible loss of renal function in obesity, including alteration of lipid metabolism and lipotoxicity, alteration in tubular transport, mitochondrial dysfunction, autophagy reduction, oxidative stress, inflammation and renal fibrosis (Juszczak F, 2020). However, the role of AMPK in renal vascular dysfunction has not yet been. Finally, activation of AMPK induces renoprotective effects, becoming an interesting therapeutic target for the prevention of metabolic diseases- related kidney injuries (Allouch & Munusamy, 2018).

SUMMARY

AIMS

This study sought to assess the role of AMPK in renal vascular function under both physiological conditions and in obesity. The specific aims of the study were the following:

1. To determine the effects of AMPK activation on renal vascular function of human intrarenal arteries and arteries from Wistar rats.
2. To characterize the mechanisms of vascular action of AMPK in both renal endothelium and vascular smooth muscle (VSM).
3. To analyze the interactions between AMPK and NADPH oxidases, enzymes that generate reactive oxygen species in the vascular tissues of the kidney.
4. To assess the variations in the activity of AMPK in obesity and its relationship with renal endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in renal arteries
5. To determine both the *ex vivo* and *in vivo* effects of a selective AMPK activator on endothelial function, vascular oxidative stress and inflammation in models of genetic obesity

METHODS

Functional responses to the selective AMPK activator A769662 were assessed in intrarenal small arteries isolated from the kidney of Wistar rats, obese Zucker rats and *ob/ob* mice, and human patients. The arteries were mounted in microvascular myographs and intracellular calcium of VSM was simultaneously measured along with tension by fluorometry-FURA-2 ratio. *In vivo* studies were performed in *ob/ob* mice, which were treated with A769662 via i.p. for 4 days. Superoxide ($O_2^{\cdot-}$) and H_2O_2 production derived from NADPH oxidase were measured by chemiluminescence and fluorescence in renal arteries and cortex. Expression of different proteins from endothelium, and inflammation and oxidative stress markers were measured by Western Blot in renal arteries and cortex.

RESULTS

Activation of AMPK with A769662 induced a potent relaxation in isolated rat renal arteries through endothelium-dependent mechanisms involving activation of eNOS and the release of nitric oxide (NO) and activation of intermediate-conductance calcium-

SUMMARY

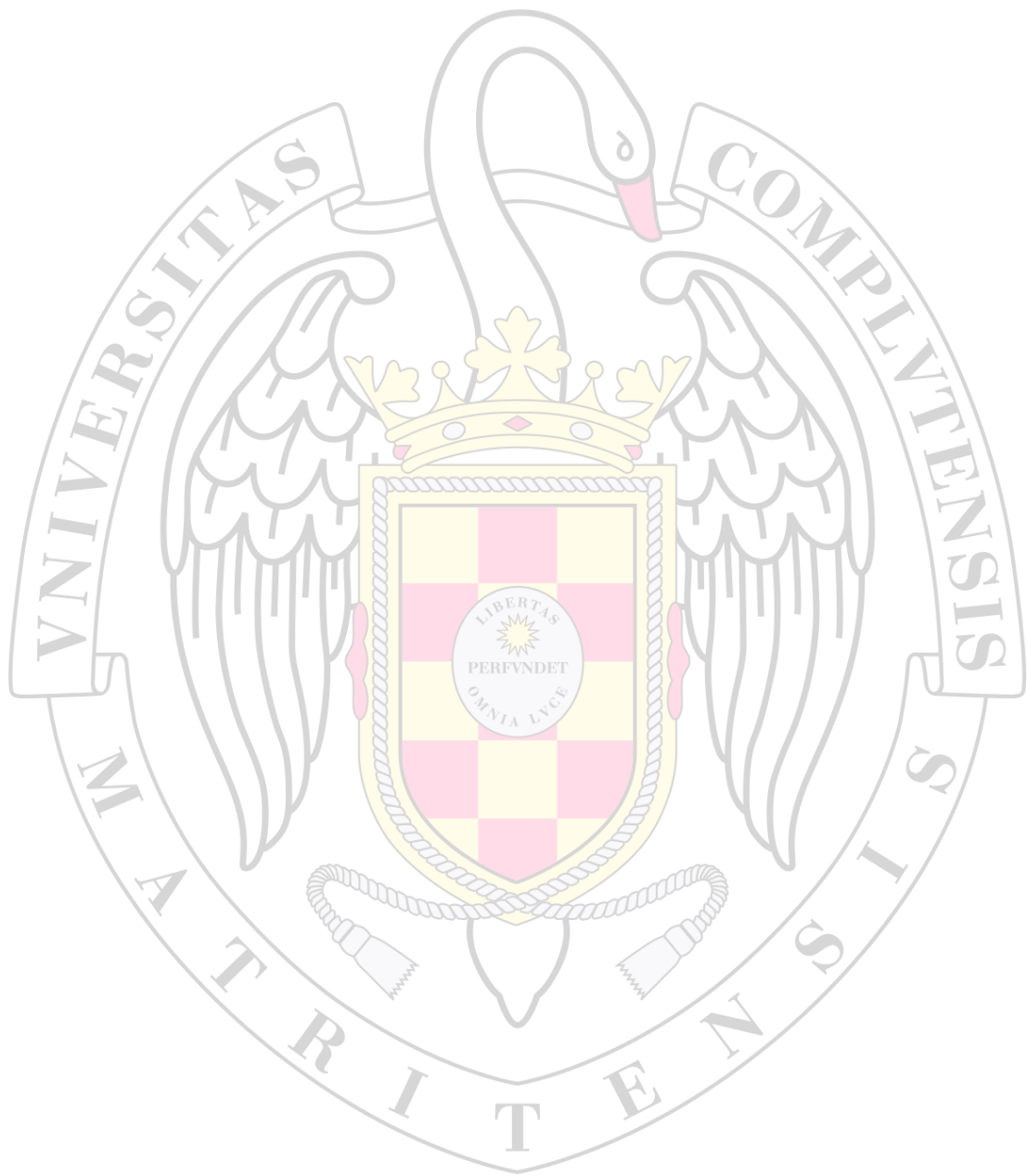
activated potassium (IK_{Ca}) channels, which produces hyperpolarization of endothelial cells that expands through myoendothelial gap junctions to vascular smooth muscle (VSM) to reduce calcium levels and produce vasodilation. To a lesser extent, activation of AMPK produced renal vasodilation by Ca^{2+} independent mechanisms by decreasing the sensitivity to Ca^{2+} of the VSM contractile machinery. Regarding the endothelium-independent mechanisms, A769662 induced a potent vasodilation through activation of ATP-sensitive (K_{ATP}) channels and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) in VSM. Relaxations induced by A769662 were associated with increased AMPK α phosphorylation at Thr¹⁷² and acetyl-CoA carboxylase (ACC) phosphorylation, evidence that support the linking of AMPK vasoactive and metabolic actions in the arterial wall. Mechanisms of A769662 action at the endothelium and VSM obtained from animal models were reproducible in human renal arteries. In relation to the interactions between AMPK and NADPH oxidases in the vascular wall, A769662 significantly inhibited the production of $O_2^{\cdot-}$ stimulated by phorbol esters, downregulated Nox4 and reduced Nox2 and Nox4-derived generation of both H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$, indicating that AMPK is a regulator of Nox2 and Nox4 activity under physiological conditions.

On the other hand, endothelium-dependent relaxations induced by ACh and isoprenaline and the activity and expression of eNOS and Akt in renal arteries were reduced in obese animals compared to controls, along with impaired arterial p-AMPK and p-ACC activity and blunted relaxations induced by the AMPK activator A769662. Both mechanical endothelium removal and PI3K/Akt/eNOS blockade markedly reduced the relaxations induced by AMPK activator in control rats but not in obese *Zucker* rats, suggesting that the endothelium-dependent vasodilator mechanism of AMPK is impaired in obesity, while endothelium-independent relaxations are preserved. *In vivo* treatment with A769662 improved acetylcholine-mediated vasodilation and endothelial function of *ob/ob* mice and reduced the activity and expression of inflammatory markers (p-IKK, $NF\kappa\beta$ and $TNF\alpha$). With regard to oxidative stress in renal preglomerular arteries, NADPH-stimulated superoxide levels were higher in obese *Zucker* rats compared to controls, while H_2O_2 levels were decreased. Activation of AMPK both *in vitro* and *in vivo* inhibited vascular Nox-derived ROS production. Moreover, *ob/ob* mice showed lower NADPH-stimulated superoxide levels compared to their controls in renal cortex samples and *in vivo* treatment with A769662 increased and restored ROS levels in obese animals being similar to controls.

SUMMARY

CONCLUSIONS

1. Activation of AMPK induces vasodilation in both human and rat intrarenal arteries.
2. Renal vasodilation induced by AMPK activation is produced by endothelium-dependent mechanisms through the activation of eNOS and IK_{Ca} channels as well as activation of K_{ATP} channels and SERCA in VSM.
3. AMPK activation produces relaxations that is accompanied by simultaneous decreases in VSM $[Ca^{2+}]_i$ but also by calcium-independent desensitization mechanisms.
4. Activation of AMPK reduces ROS generation through inhibition of NADPH oxidase 4 and NADPH oxidase 2.
5. Endothelial dysfunction in intrarenal arteries of obese animals is associated with AMPK dysfunction and impaired PI3K/Akt/eNOS endothelial pathway, while AMPK vasodilator actions in the VSM are preserved in obesity.
6. *In vivo* treatment with selective activator of AMPK improves vascular function and reduces oxidative stress and inflammation in renal arteries of obese animals.
7. Abnormal cortical redox balance in obesity is restored after *in vivo* treatment with selective activator of AMPK.



RESUMEN

Disfunción endotelial renal y estrés oxidativo en la obesidad: papel de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK)

La AMPK es un sensor clave del estado energético de la célula, activándose en situaciones de déficit de energía para promover rutas catabólicas como la glucólisis y la β -oxidación de ácidos grasos y obtener así ATP que asegure la homeostasis y la supervivencia celular (Hardie et al., 2016). Además de su papel en el metabolismo, la AMPK participa en la regulación de la autofagia (Alers et al., 2012), la biogénesis mitocondrial (Zong et al., 2002) y la función vascular (Salt & Hardie, 2017). Asimismo, se ha descrito que la AMPK está implicada en la regulación de la producción de ROS derivadas de las NADPH oxidasas y de las mitocondrias en la vasculatura (Wang et al., 2012), así como también en la modulación de la inflamación vascular (Katerelos et al., 2010).

El riñón es un órgano con una alta tasa metabólica y un gran consumo de energía. La AMPK se expresa de forma ubicua y abundante en el riñón e interviene en la regulación del transporte tubular, el metabolismo renal de lípidos y glucosa y la función de los podocitos, entre otras muchas funciones (Hallows KR, 2010). Sin embargo, sus funciones en la vasculatura renal no se conocen con exactitud.

La obesidad es un problema de salud pública a nivel mundial, cuya prevalencia está en continuo aumento, y representa un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad renal crónica independiente de la presencia de diabetes, hipertensión y otras comorbilidades (De Vries et al., 2014). Se ha descrito que la actividad de la AMPK en el riñón se encuentra alterada o disminuida y se ha relacionado con la nefropatía diabética y la lesión renal asociada a la obesidad. La alteración de la AMPK en el riñón está implicada en todos aquellos procesos que contribuyen a producir la pérdida progresiva e irreversible de las funciones renales en la obesidad, entre los que destacan la alteración del metabolismo de lípidos, su acumulación y lipotoxicidad, la alteración en el transporte tubular, la disfunción mitocondrial, la disminución de la autofagia, el estrés oxidativo, la inflamación y la fibrosis renal (Juszczak F, 2020). Sin embargo, su relación con la disfunción vascular renal no se ha estudiado. Por último, se ha descrito que la activación de la AMPK presenta efectos renoprotectores, convirtiéndose en una diana terapéutica interesante para la prevención de las lesiones renales derivadas de las enfermedades metabólicas (Allouch & Munusamy, 2018).

RESUMEN

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue investigar el papel de la AMPK sobre la función vascular renal en condiciones fisiológicas y en la obesidad y de forma específica:

1. Determinar los efectos de la activación de AMPK en la función vascular renal en arterias intrarrenales de ratas Wistar y en arterias humanas
2. Caracterizar los mecanismos de acción vascular de la AMPK a nivel del endotelio y del MLV renal
3. Analizar las interacciones entre la AMPK y las NADPH oxidasas, enzimas que generan especies reactivas de oxígeno en los tejidos vasculares del riñón.
4. Valorar las variaciones en la actividad de la AMPK en la obesidad y su relación con la disfunción endotelial renal, el estrés oxidativo y la inflamación en arterias renales
5. Determinar los efectos de un activador selectivo de la AMPK sobre la función endotelial, el estrés oxidativo y la inflamación en modelos de obesidad genética

MÉTODOS

El efecto *in vitro* de un activador selectivo de la AMPK, el A769662, se evaluó en arterias interlobares del riñón de ratas Wistar, de ratas Zucker obesas y de ratones *ob/ob*, junto con sus respectivos controles y de pacientes con tumor renal. Las arterias se montaron en miógrafos microvasculares y el calcio intracelular del MLV se midió de forma simultánea con la tensión mediante fluorometría-relación FURA-2. Los estudios *in vivo* se realizaron en ratones *ob/ob*, a los que se les administró el A769662 por vía i.p durante 4 días. La producción de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y H_2O_2 derivados de la NADPH oxidasa se midieron mediante técnicas de quimioluminiscencia y fluorescencia en arterias y corteza renales. La expresión de diferentes proteínas del lecho vascular y de proteínas que intervienen en los procesos de inflamación y estrés oxidativo se midieron mediante Western Blot en arterias intrarrenales y corteza renal.

RESULTADOS

La activación de la AMPK inducida por el A769662 produjo una potente vasodilatación en arterias renales de resistencia a través de dos mecanismos dependientes

RESUMEN

del endotelio, la activación de la eNOS y la activación de canales de K^+ activados por calcio (K_{Ca}) de conductancia intermedia (IK_{Ca}), lo que conduciría a la hiperpolarización de las células endoteliales, que se expande a través de las uniones gap mioendoteliales hasta el músculo liso vascular (VSM), reduciendo los niveles de calcio y produciendo relajación. En menor medida, la activación de la AMPK produjo vasodilatación renal mediante mecanismos independientes de Ca^{2+} al disminuir la sensibilidad al Ca^{2+} de la maquinaria contráctil en el MLV. Con respecto a la hiperpolarización del MLV independiente del endotelio, la activación de la AMPK vascular mediante el A769662 indujo una potente vasodilatación a través de la activación de canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}) en MLV de arterias renales de resistencia. Además, el A769662 incrementó la actividad de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarco/endoplásmico (SERCA) del MLV, induciendo el movimiento del Ca^{2+} hacia el retículo sarcoplásmico (RS) y produciendo de esta manera relajaciones independientes del endotelio. Los efectos vasorelajantes inducidos por el A769662 se asociaron a un aumento en la fosforilación del residuo Thr¹⁷² de la subunidad AMPK α 1 y a la fosforilación de la acetil-CoA carboxilasa (ACC), evidencias que apoyan la especificidad de la acción vascular del A769662 y la asociación de las acciones vasoactivas y metabólicas de la AMPK en la pared arterial. Los mecanismos de acción del A769662 a nivel endotelial y del MLV obtenidos de modelos animales fueron reproducibles en arterias renales humanas. Respecto a la interacción de la AMPK y las NADPH oxidasas de la pared vascular, se observó que el A769662 inhibió significativamente la producción de $O_2^{\cdot-}$ estimulada por los ésteres de forbol, la expresión de Nox4 y la generación de $O_2^{\cdot-}$ y de H_2O_2 dependiente de Nox2 y Nox4 en la pared vascular, indicando que la AMPK es un regulador de la actividad de la Nox2 y la Nox4 en condiciones fisiológicas.

Por otro lado, las relajaciones dependientes de endotelio derivadas de la ACh e isoprenalina y la actividad y la expresión de eNOS y Akt en arterias renales fueron menores en los animales obesos comparadas con sus controles y mostraron una menor vasodilatación inducida por el A769662, que se asoció a una menor actividad de p-AMPK α y p-ACC en la obesidad. Tanto la retirada del endotelio como el bloqueo de la eNOS y la PI3K/Akt redujeron las relajaciones estimuladas por la AMPK en las ratas control, pero no en las ratas *Zucker* obesas, lo que sugiere que el mecanismo vasodilatador dependiente de endotelio de la AMPK está afectado en la obesidad, aunque sus acciones a nivel del músculo liso vascular están preservadas. Con respecto a los estudios *in vivo*,

RESUMEN

la administración del A769662 mejoró la vasodilatación mediada por la acetilcolina y por la isoprenalina y la función endotelial de los ratones *ob/ob* y redujo la actividad y la expresión de marcadores inflamatorios (p-IKK, NF- κ B y TNF α). En cuanto al estrés oxidativo en arterias preglomerulares renales, las ratas *Zucker* obesas presentaron unos niveles de superóxido derivados de la NADPH significativamente mayores que sus controles, mientras que los niveles de H₂O₂, se encontraron disminuidos. La activación de la AMPK redujo la producción vascular de ROS derivada de la NADPH oxidasa tanto *ex vivo* como *in vivo*. Por otro lado, los ratones *ob/ob* mostraron unos niveles de superóxido derivados de la NADPH menores respecto a sus controles en muestras de corteza renal y el tratamiento *in vivo* con A769662 aumentó los niveles de ROS en el cortex de animales obesos, siendo similares a los que presentaban sus controles.

CONCLUSIONES

1. La activación de la AMPK produce una potente vasodilatación en arterias renales preglomerulares humanas y de ratas Wistar.
2. La vasodilatación renal inducida por la activación de la AMPK se produce a través de mecanismos dependientes del endotelio mediante la activación de la eNOS y de los canales IK_{ca} y también a través de la activación de canales K_{ATP} y la SERCA en el MLV.
3. La relajación inducida por la AMPK en el MLV de arterias renales preglomerulares se acompaña de descensos simultáneos en la [Ca²⁺]_i y por otra parte intervienen mecanismos de desensibilización al calcio.
4. La activación de la AMPK reduce la producción de ROS derivadas de la NADPH oxidasa 4 y la NADPH oxidasa 2.
5. Las arterias renales preglomerulares de animales obesos presentan disfunción endotelial asociada a una alteración en la actividad de la AMPK y de la vía endotelial PI3K/eNOS/NO, mientras que las acciones vasodilatadoras de la AMPK a nivel de MLV están preservadas en animales obesos.
6. El tratamiento *in vivo* con A769662, activador selectivo de la AMPK, mejora la función vascular de arterias renales y reduce el estrés oxidativo vascular y la inflamación en arterias renales de animales obesos.
7. El equilibrio redox cortical anormal observado en el riñón de modelos genéticos de obesidad, se restaura tras el tratamiento *in vivo* con el A769662.



ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ACC, acetil-CoA carboxilasa

ACh, acetilcolina

ADP, adenosín difosfato

AG, ácidos grasos

AGL, ácidos grasos libres

AICAR, ribonucleótido de 5-aminoimidazol-4-carboxamida

Akt, proteína quinasa B

AMP, adenosín monofosfato

AMPc, adenosín monofosfato cíclico

ARE, elemento de respuesta antioxidante

ATP, adenosín trifosfato

AMPK, proteína quinasa activada por AMP

AMPKK, quinasas de AMPK

APC, proteína activada C

BH₄, tetrahidrobiopterina

BK_{Ca}, canales de potasio activados por calcio de alta conductancia

Ca²⁺, ión calcio

[Ca²⁺]_i, concentración de calcio intracelular

CaMKII, Ca²⁺/calmodulina quinasa II

CCL5, quimiocina ligando 5

CE, célula endotelial

CFTR, regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística

CIDEA, cell death-inducing DNA fragmentation factor α -like effector

CMLV, células del MLV

COX, ciclooxigenasa

CO₂, dióxido de carbono

CPA, ácido ciclopiazónico

CPT1, carnitina palmitoil transferasa 1

DAG, diacilglicerol

EDH, hiperpolarización derivada del endotelio

EDHF, factor hiperpolarizante derivado del endotelio

ABREVIATURAS

EDRF, factor relajante derivado del endotelio
eEF2K, quinasa del factor 2 de elongación eucariota
ENaC, canal de Na⁺ epitelial
eNOS, sintasa de óxido nítrico endotelial
ETC, cadena de transporte de electrones
ET-1, endotelina-1
ERC, enfermedad renal crónica
FAS, ácido graso sintasa
FOXO, Forkhead box O
FSR, flujo sanguíneo renal
GLUT, transportador de glucosa
GMPc, guanosín monofosfato cíclico
GP, glucógeno fosforilasa
GPx, glutatión peroxidasa
GS, glucógeno sintasa
GTPCH, GTP-ciclohidrolasa
HMG-CoA reductasa, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
HO-1, hemo oxigenasa 1
Hsp90, proteína de shock térmico de 90 kDa
H₂O₂, peróxido de hidrógeno
ICAM, molécula de adhesión intracelular
IFN γ , interferón gamma
IK_{Ca}, canales de potasio activados por calcio de intermedia conductancia
IKK, I κ B quinasa
IL, interleucina
IMC, índice de masa corporal
iNOS, sintasa de óxido nítrico inducible
i.p, intraperitoneal
IP₃, inositol trifosfato
I/R, isquemia/reperfusión
JAK, quinasa Janus
JNK, quinasa c-Jun N-terminal
K_{ATP}, canales de potasio sensibles a ATP
K_{Ca}, canales de potasio activados por calcio

ABREVIATURAS

LKB1, quinasa hepática supresora de tumores B1
LPS, lipopolisacárido
LZR, rata Zucker lean
MCP-1, proteína quimiotáctica de monocitos 1
MKP-1, quinasa fosfatasa-1 activada por mitógenos
MLC, cadena ligera de miosina
MLCK, quinasa de la cadena ligera de miosina
MLV, músculo liso vascular
MnSOD, superóxido dismutasa de manganeso
mTORC1, complejo de diana de rapamicina 1 de mamíferos
MYPT1, subunidad 1 de la miosina fosfatasa
NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAMPT, nicotinamida fosforribosiltransferasa
NF- κ B, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NKCC, cotransportador de Na^+ - K^+ - 2Cl^-
NO, óxido nítrico
NOS, enzima de síntesis de óxido nítrico
Nox, NADPH oxidasa
Nrf2, factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
 OH^- , anión hidroxilo
 O_2^- , anión superóxido
 ONOO^- , anion peroxinitrito
OZR, ratas Zucker obesas
PGs, prostaglandinas
PGC1 α , coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas
Phe, fenilefrina
Prx, peroxiredoxinas
Phe, fenilefrina
PI3K, fosfoinositol 3-quinasa
PKA, proteína quinasa A
PKB, proteína quinasa B or Akt
PKC, proteína quinasa C
PKC ζ , proteína quinasa C ζ

ABREVIATURAS

PP, proteína fosfatasa
PP2A, proteína fosfatasa 2A
PP2C α , proteína fosfatasa 2C α
PSS, solución salina fisiológica
PTEN, homólogo de fosfatasa y tensina
RE, retículo endoplásmico
ROS, especies reactivas de oxígeno
RS, retículo sarcoplásmico
RNS, especies reactivas de nitrógeno
SERCA, Ca²⁺-ATPasa del retículo endoplásmico-sarcoplásmico
SIRT1, sirtuína-1 desacetilasa dependiente de NAD
SK_{Ca}, canales de potasio activados por calcio de pequeña conductancia
SNS, sistema nervioso simpático
SOC, canales de Ca²⁺ operados por almacén
SOD, superóxido dismutasa
SRAA, sistema renina-angiotensina-aldosterona
SREBP1c, proteína de unión al elemento regulador de esteroles 1c
TAG, triacilglicérido
TFG, tasa de filtración glomerular
TGF- β , factor de crecimiento transformante beta
TLR4, receptor de tipo Toll 4
TNF α , factor de necrosis tumoral alfa
Trx, tiorredoxina
TSC, complejo de esclerosis tuberosa
TXA₂, tromboxano A₂
UCP2, proteína de desacoplamiento mitocondrial 2
VCAM-1, molécula 1 de adhesión celular vascular
VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular
VOC, canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje
WT, wild type



1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 AMPK

Todas las células de los organismos vivos utilizan la energía del medio ambiente para realizar sus procesos vitales. Las células animales extraen energía de las biomoléculas (carbohidratos, lípidos y proteínas) a través de la respiración celular, consumiendo O₂ y produciendo CO₂, H₂O y energía en forma de ATP. Cuando toman más energía de la que requieren para su uso inmediato, el exceso de energía se almacena principalmente como glucógeno y lípidos (Suarez, 2012; Yang et al., 2019). Por el contrario, cuando el almacén de energía (ATP) se va agotando como por ejemplo en situaciones de hipoxia o de inanición, los niveles de ADP y AMP intracelulares aumentan cada vez más (Hardie, 2014a). La adenilato quinasa es una enzima altamente activa, expresada en todas las células eucariotas y encargada de catalizar la reacción reversible $2ADP \leftrightarrow AMP+ATP$. La presión por mantener este equilibrio entre el consumo y el gasto energético ha promovido el desarrollo de complejos enzimáticos para garantizar la homeostasis y la supervivencia a lo largo de la evolución.

La AMPK o proteína quinasa activada por AMP es una serina/treonina quinasa altamente conservada evolutivamente que se expresa de forma ubicua en todas las células eucariotas, lo que indica el papel clave que juega la AMPK en la biología celular. La AMPK actúa como sensor principal de la energía celular, cuando detecta que el ratio AMP: ATP aumenta, es decir, que los niveles de AMP en la célula son altos y por lo tanto que hay un déficit de energía, la AMPK activa las vías catabólicas para incrementar los niveles de ATP y por el contrario inhibe las vías anabólicas que consumen ATP, todo ello con el objeto de restaurar la homeostasis energética de la célula y su supervivencia (Hardie, 2014a, 2014b).

En 1973 la AMPK fue descubierta por dos grupos de investigación de forma independiente, uno de ellos la identificó por su capacidad de fosforilar e inhibir a la acetil-CoA carboxilasa (ACC), enzima responsable de la síntesis de ácidos grasos (AG), (Carlson Ca Fau - Kim & Kim, 1973) y el otro grupo por la inhibición que ejercía sobre la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reductasa, enzima implicada en la síntesis de colesterol (Beg ZH, 1973); además, ambos grupos observaron que esta quinasa se activaba en respuesta a elevados niveles de AMP. Durante muchos años se consideró que las quinasas responsables de la inhibición reversible de estas enzimas eran diferentes, sin

embargo, en 1987 *Carling y Hardie* concluyeron que era la misma quinasa, la AMPK (Carling et al., 1987).

En los últimos años han aumentado de forma exponencial el número de estudios enfocados en investigar el papel de la AMPK, no sólo como sensor de energía sino también su participación en la regulación de numerosos procesos celulares como la apoptosis, el crecimiento, la diferenciación celular, la autofagia, la función inmunitaria, la inflamación o el cáncer (Carling & Viollet, 2015; Domenech et al., 2015; Hardie, 2014a, 2014b). Por otro lado, se ha estudiado la función de la AMPK en diferentes patologías y se ha observado que algunos fármacos antidiabéticos, las estatinas y otros compuestos naturales y sintéticos ejercen sus acciones beneficiosas gracias a la activación directa o indirecta de la AMPK (Grahame Hardie, 2016; Lu et al., 2019), convirtiéndose en una potencial diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y metabólicas y el cáncer (Jiang et al., 2018; Umezawa et al., 2017; Wong et al., 2009).

1.1.1 Expresión, estructura y regulación

La AMPK es un complejo enzimático heterotrimérico formado por una subunidad catalítica α (α_1 and α_2) y dos subunidades reguladoras, la β (β_1 and β_2) y la γ (γ_1 , γ_2 , γ_3) (Figura 1). Cada isoforma está codificada por un gen diferente y existen múltiples combinaciones posibles de isoformas de AMPK, que forman una gran variedad de heterotrimeros $\alpha\beta\gamma$, en concreto 12, que se expresan y se regulan de manera diferente según el tejido y la organización subcelular donde se encuentren (Kim et al., 2012). Esta especificidad es interesante desde el punto de vista del futuro desarrollo de posibles fármacos que tengan como diana a la AMPK, pudiendo dirigir el tratamiento en función de la expresión y la regulación del heterotrimerio de cada tejido u órgano.

La subunidad catalítica α presenta un residuo de Thr¹⁷² que tiene que ser fosforilado por diferentes quinatas *upstream* para tener actividad catalítica. La isoforma α_1 se encuentra principalmente en el citoplasma y la α_2 se localiza también en el núcleo (Salt I, 1998). El extremo C-terminal de la subunidad β es el dominio de unión de las subunidades $\alpha\beta\gamma$ y es fundamental para formar el heterotrimerio. En la subunidad β se encuentra el sitio de unión del glucógeno, CBM (carbohydrate-binding module, por sus siglas en inglés), que contribuye a la regulación de la actividad de la AMPK. Además, la

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

subunidad β presenta varios residuos de serina que pueden ser fosforilados, está descrito que la fosforilación de la Ser¹⁰⁸ aumenta la actividad de la AMPK (Sanz, 2008). La isoforma β_1 se expresa principalmente en hígado, páncreas, riñón, cerebro y tejido adiposo marrón mientras que la isoforma β_2 se ha detectado en músculo cardiaco y esquelético (Sanz et al., 2013). Por último, la subunidad γ presenta un sitio de unión para el AMP, llamado el dominio Bateman formado por dos repeticiones de CBS (cystatione- β -synthase). La isoforma γ_3 es específica del músculo esquelético, siendo la predominante y por lo tanto sugiriendo un papel importante en este tejido (Mahlapuu et al., 2004)

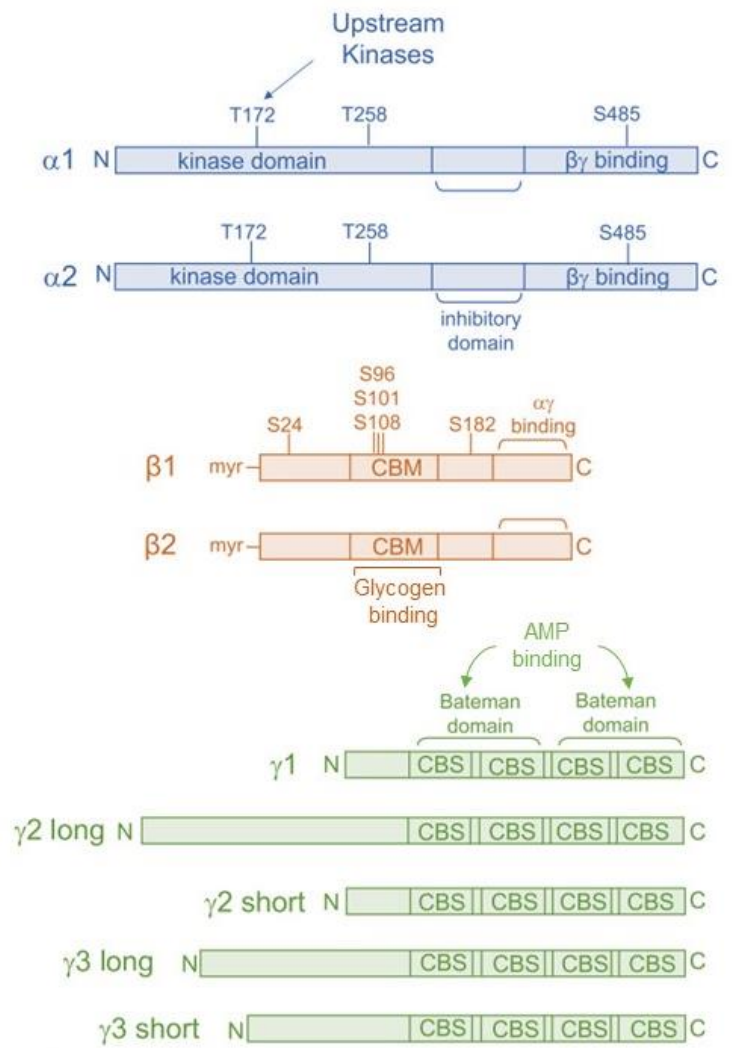


Figura 1. Estructura de las diferentes subunidades e isoformas de la AMPK. Adaptado de Hallows, KR (2010)

Como se ha comentado anteriormente, la AMPK es muy sensible a los cambios en la energía celular y es capaz de detectar rápidamente cualquier cambio en las concentraciones del AMP intracelular. El AMP y las moléculas pequeñas miméticas de

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

AMP son activadores directos de la AMPK y al unirse a la subunidad γ desencadenan un cambio conformacional en el complejo AMPK, alejando el dominio inhibitorio de la subunidad α del dominio quinasa, lo que conduce al aumento de la actividad de la AMPK (Calabrese et al., 2014; Chen et al., 2012; Ross et al., 2016).

Por lo tanto, la actividad de la AMPK está regulada por tres mecanismos sensibles a pequeños cambios en la relación AMP/ATP:

- 1) Activación alostérica directa por AMP y/o ADP
- 2) Aumento de la tasa de fosforilación en el residuo Thr¹⁷² de la subunidad catalítica AMPK α por proteínas quinasas *upstream* de la AMPK
- 3) Inhibición de la desfosforilación del residuo Thr¹⁷² de AMPK α por proteínas fosfatasas (PP)

En resumen, la AMPK se activa por la unión de AMP a la subunidad γ y por tres mecanismos que son complementarios y que son antagonizados por altas concentraciones de ATP (Figura 2) (Carling et al., 2008; Hardie, 2018; Hawley et al., 2005; Ross et al., 2016; Woods et al., 2005).

En condiciones de déficit energético, el residuo Thr¹⁷² de la subunidad AMPK α se fosforila principalmente por dos quinasas *upstream*: la quinasa hepática supresora de tumores B1 (LKB1) y la Ca²⁺/calmodulina quinasa II (CaMKK2 o CaMKK β) (Hawley et al., 2003; Hawley et al., 2005; Hurley et al., 2005; Shaw et al., 2004; Woods et al., 2005; Woods et al., 2003). La LKB1 es constitutivamente activa y se expresa en todos los tejidos siendo un elemento clave en el mecanismo por el cual la AMPK detecta el estado energético de la célula. La LKB1 fosforila y activa a la AMPK en respuesta al agotamiento de energía que es modulado por la unión de AMP o ADP a la subunidad AMPK γ , especialmente en tejidos con alta implicación en el metabolismo energético como músculo, tejido adiposo e hígado (Hurley et al., 2005; Woods et al., 2003). La CaMKK β se activa por el aumento de los niveles de Ca²⁺ intracelular que se produce en respuesta a muchas hormonas en tipos celulares específicos, como en las neuronas o las células endoteliales (Carling et al., 2008; Hardie, 2018; Hawley et al., 2005; Sanders et al., 2007; Woods et al., 2005). La actividad de la AMPK también se puede regular de una forma independiente de AMP, mediante su inhibición a través de un mecanismo de

ubiquitinación mediado por la formación de un complejo entre la subunidad β de AMPK y varios factores, como CIDEA (cell death-inducing DNA fragmentation factor α -like effector, por sus siglas en inglés), que induce la muerte celular o las ligasas de ubiquitina E3 como MG53, CRBN/ CRL, entre otros, que inducen la degradación de la AMPK (Lee et al., 2018; Qi et al., 2008)

La actividad de la AMPK también puede estar regulada por señales extracelulares como las adipoquinas (adiponectina y leptina) y por fármacos activadores de la AMPK sintéticos (AICAR, A769662, entre otros) y compuestos naturales (polifenoles, salicilatos...), como se comentará más adelante. El A769662 es el fármaco activador sintético utilizado en la parte experimental de esta Tesis Doctoral por lo que se comentará de forma más detallada. Este compuesto tiene varios mecanismos de acción (Figura 2); primero se une de forma selectiva a la subunidad β_1 de la AMPK aumentando la actividad de la AMPK de forma alostérica y segundo inhibe la desfosforilación por PP, aumentando así la fosforilación de Thr¹⁷² de AMPK α . Además, la autofosforilación del residuo Ser¹⁰⁸ produce un aumento en la unión del A769662 a la AMPK y por lo tanto en su actividad, constituyendo una importante oportunidad terapéutica de aumentar la estimulación de la AMPK sin fosforilación en Thr¹⁷² (Carling, 2017).

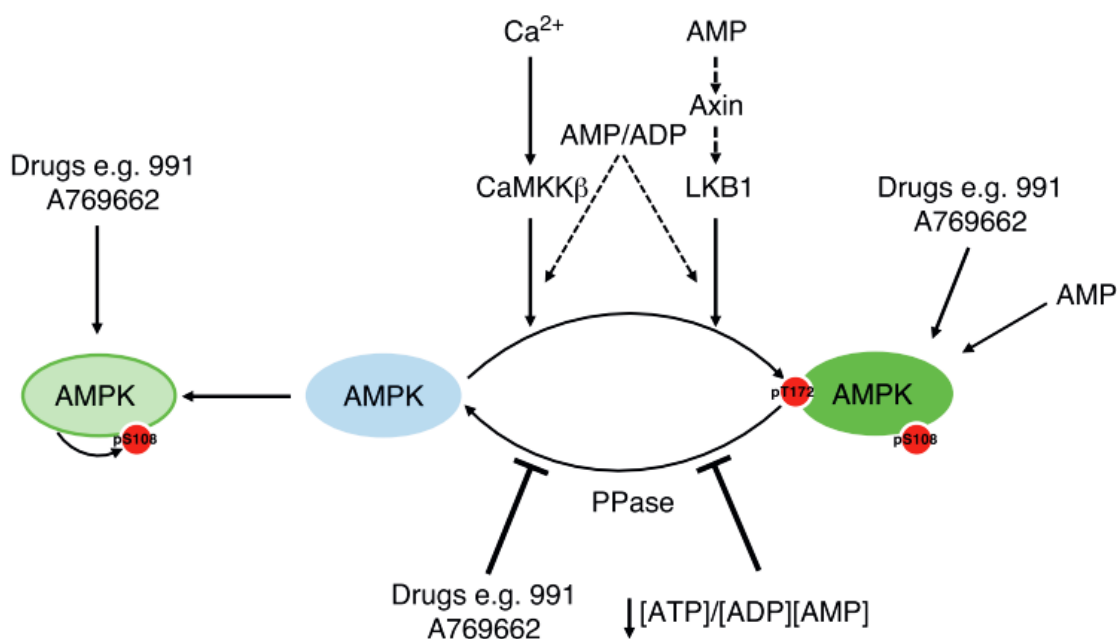


Figura 2: Mecanismos de regulación de la AMPK. Tomado de Carling (2017)

1.1.2 Función metabólica, autofagia y biogénesis mitocondrial

El papel de la AMPK en la regulación del metabolismo está muy estudiado y en general se podría resumir como que la AMPK actúa como un modulador positivo de la energía celular favoreciendo vías catabólicas (glucólisis, β -oxidación de AG, autofagia, biogénesis mitocondrial...) para la generación de ATP y por el contrario, negativo, inhibiendo vías anabólicas y otros procesos (síntesis de AG, triglicéridos (TAG), proteínas, gluconeogénesis...) que consumen ATP y que no son esenciales para la supervivencia celular a corto plazo. Actualmente, se conocen al menos 60 proteínas que son fosforiladas en sus residuos de serina/treonina por la AMPK y se cree que este número seguirá aumentando (Figura 3) (Hardie et al., 2016).

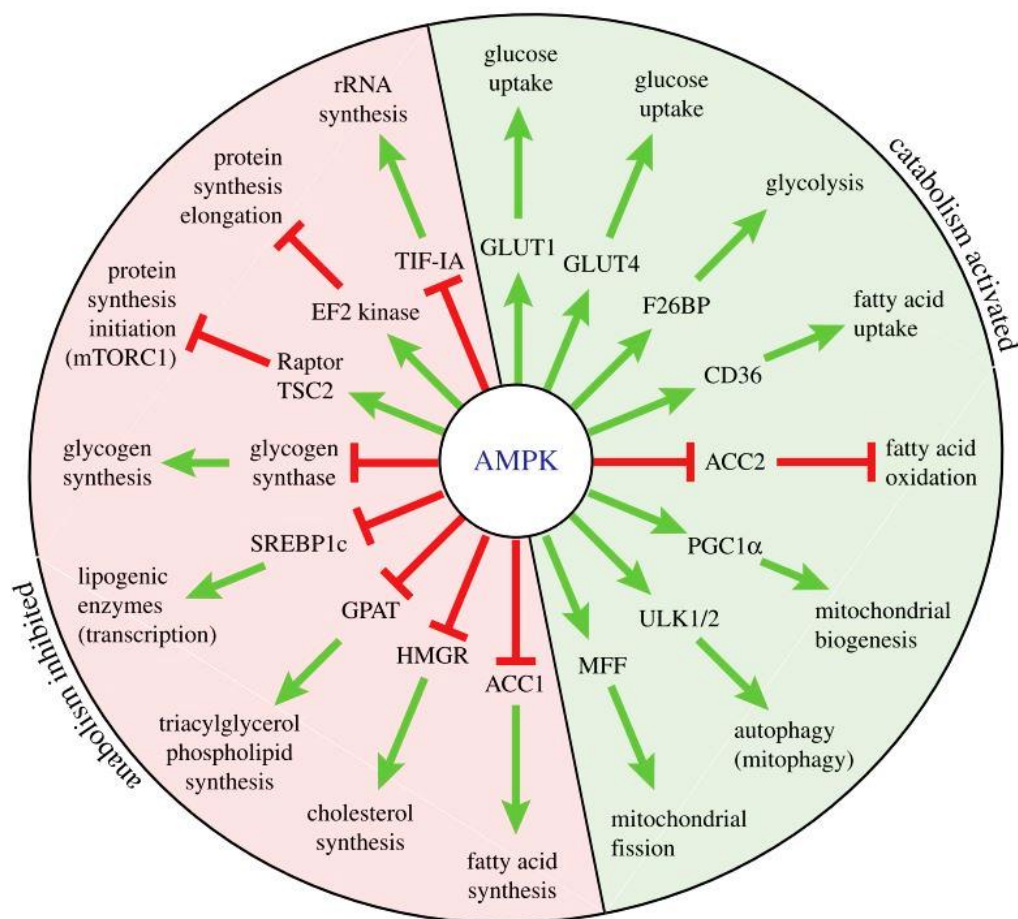


Figura 3: Resumen de las vías catabólicas y anabólicas reguladas por la AMPK. Tomado de Hardie (2018)

- **Metabolismo lipídico**

La regulación del metabolismo de los lípidos es la primera función conocida de la AMPK. La activación de la AMPK inhibe la síntesis de AG, colesterol y TAG, mientras que activa la captación de AG y las vías de oxidación de lípidos (Figura 4). Por tanto, en respuesta a varios factores de estrés celular, la AMPK se activa y produce la fosforilación e inactivación de la acetil CoA-carboxilasa (ACC), enzima que cataliza la conversión de acetil-CoA en malonil-CoA, primer paso para la síntesis de AG. Un segundo mecanismo por el cual la AMPK inhibe la síntesis de lípidos es mediante la inhibición de la proteína de unión al elemento regulador de esterol 1c (SREBP1c), un factor de transcripción de enzimas involucradas en la síntesis de lípidos como la ACC y la ácido graso sintasa (FAS) (Carling et al., 2008; Li et al., 2011). Además, la AMPK también inhibe la fosforilación de la enzima limitante de la velocidad de la síntesis de colesterol, la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa (Carling et al., 1989), reduciendo así la síntesis de colesterol. Finalmente, la AMPK inhibe la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa, involucrada en la síntesis de TAGs, evitando así el almacenamiento de lípidos (Muoio et al., 1999).

Además de inhibir el anabolismo lipídico, la AMPK estimula las vías catabólicas de los lípidos, facilitando la captación de AG y su β -oxidación mitocondrial. Al inducir la actividad del transportador de AG, CD36, la AMPK facilita la captación de AG a través de la membrana celular hacia el citosol (Habets et al., 2009). Además, al fosforilar e inhibir a la ACC, la AMPK reduce los niveles de malonil-CoA; este a su vez actúa inhibiendo la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1), que favorece el movimiento de los AG desde el citosol hacia el espacio intermembrana de la mitocondria, por lo tanto, la AMPK facilita indirectamente la captación de AG y su β -oxidación (Kahn et al., 2005; Obici et al., 2003).

- **Metabolismo glucídico**

Como sensor de energía, la AMPK favorece las vías catabólicas glucídicas en diferentes órganos. La activación de la AMPK facilita la captación de glucosa en el músculo esquelético al aumentar la expresión del transportador de glucosa GLUT4, así como su translocación a la membrana plasmática (Taylor et al., 2008; Zheng et al., 2001). Una vez que la glucosa está dentro de las células, la AMPK facilita su uso como fuente

de energía estimulando las enzimas involucradas en la glucólisis (Figura 4), como se demuestra en cardiomiocitos, macrófagos y células tumorales (Marsin et al., 2000; Marsin et al., 2002). La AMPK también favorece la glucogenólisis activando la glucógeno fosforilasa (GP) mientras que inhibe la glucógeno sintasa (GS), evitando así la síntesis de glucógeno en las células musculares. Las mutaciones en las subunidades γ_2 y γ_3 de la AMPK conducen a un almacenamiento anormal de glucógeno y se ha asociado a arritmias y a miocardiopatía hipertrófica en el corazón humano (Arad et al., 2002; Blair et al., 2001; Gollob, Green, et al., 2001; Gollob, Seger, et al., 2001), y también producen niveles elevados de glucógeno en el músculo esquelético (Milan et al., 2000). Además, la AMPK inhibe la gluconeogénesis hepática, esencial para el mantenimiento de los niveles de glucosa plasmática durante el ayuno, al disminuir la expresión de enzimas como la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y la glucosa-6-fosfatasa (Zhang et al., 2019). Por otro lado, la AMPK asegura tanto la detección normal de glucosa por las células β como la secreción de insulina estimulada por glucosa, por lo que la actividad reducida de la AMPK se ha asociado con disfunción de las células β en roedores con obesidad inducida por dieta; por ello en los últimos años ha aumentado el interés en los activadores de AMPK como fármacos antidiabéticos (Sun et al., 2010).

- **Metabolismo proteico**

La AMPK también promueve el catabolismo de proteínas. El complejo de esclerosis tuberosa (TSC) 1/2 integra todas las señales ambientales entre las que se incluyen factores estresantes del estado energético. Así, en condiciones de déficit energético, la AMPK se activa y es responsable de la inhibición de la síntesis de proteínas (Figura 4) para mantener los niveles de ATP de la célula a través de la fosforilación y activación de TSC2, que inhibe el complejo de diana de rapamicina 1 de mamíferos (mTORC1), y posteriormente la proteína ribosómica S6 quinasa beta-1 (p70S6K), lo que impide la traducción de proteínas ribosómicas (Hoppe et al., 2009). También se ha descrito que la AMPK inhibe mTORC1 mediante la fosforilación de RAPTOR (acrónimo de Regulatory-Associated Protein of mTOR) (Van Nostrand et al., 2020). Otros estudios han demostrado que la AMPK fosforila y activa a la quinasa del factor 2 de elongación eucariota (eEF2K), lo que da como resultado la inhibición de la fase de elongación de la síntesis de proteínas (Leprivier et al., 2013).

- **Autofagia**

La autofagia es un mecanismo celular regulado fisiológicamente que elimina y reutiliza componentes celulares innecesarios/disfuncionales a través de su degradación y reciclaje. Así, la autofagia consiste en la autodigestión de las estructuras celulares, a través de procesos dependientes de lisosomas para mantener la integridad celular principalmente durante la inanición (Kobayashi, 2015; Mizrachy-Schwartz et al., 2011). Los genes relacionados con la autofagia codifican las proteínas responsables de la autofagia, principalmente la ULK1 en mamíferos, una proteína quinasa considerada como iniciadora de la cascada autofágica, que activa a la fosfoinositol 3-quinasa fosforilada (pPI3K) para regular la formación de autofagosomas. La AMPK puede activar directamente la autofagia a través de la fosforilación de ULK1, e indirectamente a través de la inhibición de mTORC1, ya que este ejerce una fosforilación inhibitoria sobre ULK1 y la autofagia (Figura 4) (Alers et al., 2012). La AMPK también puede activar la familia de factores de transcripción FOXO (Forkhead box O, por sus siglas en inglés), favoreciendo así la regulación positiva de varios inductores de autofagia (Figura 4) (Greer et al., 2007). La autofagia está regulada principalmente por bucles reguladores de retroalimentación. Por tanto, mTORC1 inhibe la actividad de ULK1 y ULK1 regula negativamente mTORC1 (Egan et al., 2011; J. Kim et al., 2011). Asimismo, la AMPK activa ULK1 favoreciendo la autofagia, mientras que ULK1 regula negativamente a la AMPK (Loffler et al., 2011). Los efectos coordinados de mTORC1 y ULK1 previenen el daño mitocondrial, preservando así la integridad de las mitocondrias durante estados de deficiencia de nutrientes en los que la AMPK está estrechamente involucrada (Egan et al., 2011; J. Kim et al., 2011).

- **Biogénesis mitocondrial**

Los procesos de autofagia son fundamentales para el buen funcionamiento de las mitocondrias, el principal orgánulo encargado de la producción de energía (ATP) a través de la respiración mitocondrial. La integridad mitocondrial requiere la eliminación de las mitocondrias disfuncionales y sus componentes dañados a través de la autofagia y la producción de mitocondrias nuevas. Por lo tanto, la biogénesis mitocondrial es un proceso crucial de producción de energía y de respuesta celular en situaciones de privación de nutrientes. Varios estudios han demostrado que el tratamiento crónico con activadores de la AMPK como el AICAR o el ácido β -guanidinopropiónico (β -GPA), pueden estimular

la biogénesis mitocondrial, desapareciendo este efecto en ratones que carecen de AMPK (Jorgensen et al., 2007; Jorgensen et al., 2005; Thomson et al., 2007; Zong et al., 2002), lo que sugiere que la AMPK juega un papel clave en la regulación de la biogénesis mitocondrial. La AMPK activa a PGC1 α (coactivador del receptor gamma 1-alfa activado por el proliferador de peroxisomas), un cofactor importante que favorece la expresión de proteínas de la mitocondria, así como la replicación del DNA mitocondrial (Lin et al., 2005). Por consiguiente, este efecto estimulante de la AMPK sobre PGC1 α se reduce en ratones que carecen de AMPK (Zong et al., 2002). Se han propuesto varios mecanismos a través de los cuales la AMPK puede regular al alza a PGC1 α . Primero, mediante la activación de SIRT1 (sirtuína-1 desacetilasa dependiente de NAD) que a su vez activa a la AMPK, desacetilando a LKB1, lo que sugiere un ciclo de retroalimentación positiva entre AMPK y SIRT1 (Cantó et al., 2009; Lan F, 2008; Ruderman et al., 2010; Sun et al., 2014). Además, la AMPK puede activar a PGC1 α aumentando la nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT) que favorece la relación NAD⁺/NADH o mediante la activación de p38-MAPK (Chaube et al., 2015).

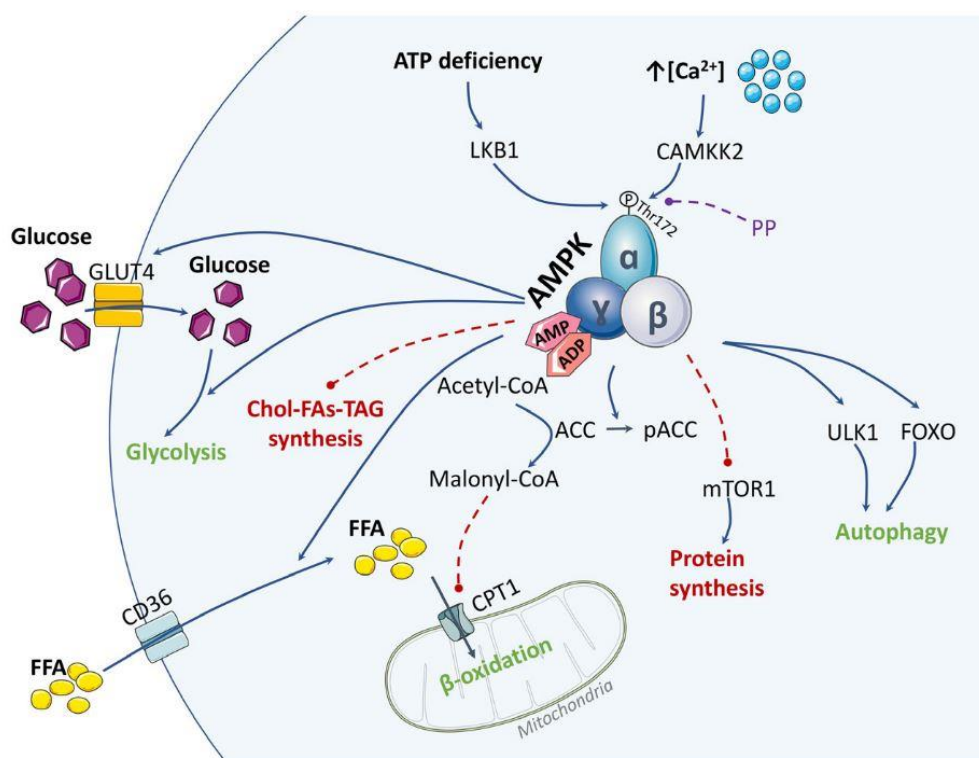


Figura 4: Principales vías de activación e inhibición de la AMPK sobre el metabolismo y la autofagia. Tomado de (Rodríguez et al., 2021).

1.1.3 AMPK y función vascular

El sistema cardiovascular tiene mecanismos de regulación encargados de acoplar el flujo sanguíneo y la perfusión a los órganos dependiendo de la demanda metabólica de cada tejido. El flujo sanguíneo a un órgano viene determinado por la presión de perfusión y la resistencia vascular. Las arteriolas y las arterias pequeñas son los vasos sanguíneos que ofrecen mayor resistencia al paso de la sangre a los tejidos; las paredes de estas arterias de resistencia tienen un componente mayoritario de músculo liso vascular (MLV), que se contrae o se relaja en función de diferentes factores, regulando así el calibre de estos vasos y por lo tanto la perfusión de cada tejido. El endotelio vascular es la monocapa de células que tapiza la cara interna de los vasos sanguíneos, considerado un órgano paracrino y endocrino, sintetiza y libera sustancias vasoactivas con el objeto de regular el tono del MLV adyacente, además de presentar una actividad antitrombótica, anticoagulante y antiagregante plaquetaria importantes para mantener la homeostasis vascular (Vanhoutte, 2009).

En respuesta a varios factores (hormonas, fuerzas de cizallamiento o *shear stress*, hipoxia, etc), el endotelio libera sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras. El factor relajante derivado del endotelio (EDRF) mejor caracterizado es el óxido nítrico (NO), sintetizado a partir de L-arginina por acción de la eNOS (sintasa de óxido nítrico endotelial), que es liberado en respuesta al *shear stress*, la acetilcolina, la bradicinina y la histamina, entre otros factores y activa la guanilato ciclasa, produciendo guanósín monofosfato cíclico (GMPc) y la relajación del MLV. Otro factor endotelial relajante es la prostaciclina (PGI₂), que se forma a partir del ácido araquidónico por la acción de la ciclooxigenasa (COX), síntesis que es estimulada por la adenosina y el NO; la PGI₂ activa a la adenilato ciclasa, produciendo adenosín monofosfato cíclico (AMPc) y la vasodilatación del MLV. Por otro lado, la hiperpolarización derivada del endotelio (EDH), se produce por la hiperpolarización de las células endoteliales (CE) y su posterior propagación a través de uniones gap mioendoteliales al MLV, induciendo su hiperpolarización y relajación (Vanhoutte, 2009). Entre los candidatos a ser los factores hiperpolarizantes derivados del endotelio (EDHFs) se encuentran los iones potasio, el H₂O₂ y los epóxidos EETs derivados del citocromo P450 (CYP) epoxigenasas (Muñoz et al., 2017; Muñoz et al., 2018). Entre las sustancias vasoconstrictoras derivadas del endotelio encontramos el tromboxano A₂ (TXA₂), derivado de la COX y promotor de la

agregación plaquetaria y la endotelina-1 (ET-1), cuya síntesis es estimulada por la angiotensina II, la trombina, las citoquinas y las especies reactivas de oxígeno (ROS).

Se ha descrito que la AMPK es capaz de regular la función vascular y que, tras su activación por estímulos lesivos como el estrés oxidativo, la isquemia o la hipoxia, es capaz de restaurar la homeostasis vascular (Almabrouk et al., 2014; Bradley et al., 2010; Chen et al., 2009; Morrow et al., 2003; Salt & Hardie, 2017). La expresión de las isoformas de la AMPK es diferente en el endotelio y el MLV siendo predominante la subunidad α_1 en el endotelio y la β_1 en el MLV (Ewart & Kennedy, 2011; Fisslthaler & Fleming, 2009; Goirand et al., 2007; Rubin et al., 2005; Zou MH, 2008). Se ha propuesto que la AMPK vascular actúa como un sensor metabólico, ajustando el flujo sanguíneo según la demanda metabólica de cada tejido. A continuación, se presentan los diferentes mecanismos descritos de regulación y activación de la AMPK y sus principales dianas y acciones fisiológicas a nivel del endotelio y MLV (Figura 5) (Rodríguez et al., 2021).

1.1.3.1 AMPK en células endoteliales: mecanismos de regulación y activación

La actividad de la AMPK en las células endoteliales puede ser regulada por los siguientes estímulos: bajos niveles de ATP como ocurre en situaciones de hipoxia, isquemia o privación de nutrientes, el *shear stress*, el ejercicio físico, el incremento de los niveles intracelulares de calcio por la acción de agonistas y hormonas como la adiponectina, la angiotensina II y la grelina y por último por activadores farmacológicos de la AMPK (Figura 5) (Ewart & Kennedy, 2011).

La AMPK endotelial es activada por LKB1, que a su vez es regulada por un aumento en los niveles de AMP en condiciones fisiológicas y patológicas (Hawley et al., 2003; Shaw et al., 2004; Woods et al., 2003); también por la quinasa CaMKK2, independientemente de los niveles de AMP, en respuesta a incrementos en los niveles intracelulares de calcio producidos por agonistas como la trombina, la bradiquinina o la histamina, (Stahmann N, 2006; Thors B, 2004) y por último por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Stahmann et al., 2010). Por otro lado, se ha descrito que la actividad física induce la vía SIRT1-LKB1, aumentando así la actividad de la AMPK y de la eNOS (Cacicedo, Gauthier, et al., 2011).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Con respecto a la regulación de la AMPK por fosfatasa (PP) en las células endoteliales (Figura 5), la PP2C α es la isoforma más aceptada en la literatura científica para producir la desfosforilación en el residuo Thr¹⁷² de la subunidad catalítica AMPK α en la mayoría de los tejidos, sin embargo, se ha descrito que la expresión de esta isoforma en células endoteliales y en CMLV humanas es muy baja (Lifschitz-Mercer B, 2001). Por otro lado, la isoforma PP2A se expresa ampliamente en el endotelio vascular y produce la desfosforilación de Ser¹¹⁷⁷, inactivando a la eNOS (Michell BJ, 2001; Zou MH, 2008). La activación crónica de la PP2A en condiciones patológicas conduce a la inactivación de la AMPK y por consiguiente a la disfunción endotelial (Zou MH, 2008).

El endotelio está continuamente expuesto al *shear stress*, un estímulo fisiológico importante que mantiene y modula el tono vascular. El flujo sanguíneo laminar incrementa la fosforilación de la eNOS y la producción de NO y se ha descrito que la AMPK es una de las proteínas quinasas implicadas en este proceso junto a la vía PI3K/PKB (Akt) (Dimmeler S, 1999; Fisslthaler et al., 2007; Zhang et al., 2009). El *shear stress* activa la vía de señalización LKB1-AMPK en el endotelio, fosforilando los residuos Ser¹¹⁷⁷ de la eNOS e incrementando la biodisponibilidad del NO y la vasodilatación (Zhang et al., 2006). Otros estudios sugieren que la SIRT1 es activada por el *shear stress* independiente de la AMPK, sin embargo, ambas actúan de forma sinérgica sobre la eNOS aumentando la producción de NO (Chen et al., 2010). Además, hay evidencias que indican que el propio NO puede activar a la AMPK α_2 en células endoteliales (Bess E, 2011).

La adiponectina es un importante activador fisiológico de la AMPK en células endoteliales. Es una adipoquina que ejerce acciones cardioprotectoras en parte debido a la activación de la AMPK y el aumento de la fosforilación de la eNOS en el residuo Ser¹¹⁷⁷. La hipoadiponectinemia se asocia con la disfunción endotelial y la resistencia a la insulina en enfermedades cardiovasculares y metabólicas (Zhao et al., 2015). El mecanismo por el cual la adiponectina estimula a la AMPK ha sido estudiado por diferentes grupos de investigación, y se ha sugerido que la adiponectina se une a su receptor (adipoR1) y activa a la proteína adaptadora fosfotirosina que interactúa con el dominio PH y la cremallera de leucina 1 (APPL1), activando la vía de señalización (APPL1)–LKB1-AMPK–eNOS (Achari & Jain, 2017; Cheng et al., 2007; Deepa et al., 2011). Otros autores sugieren que la adiponectina estimula la eNOS a través de la vía AMPK-PI3K-Akt (Chen H, 2003; Ouchi et al., 2004).

Otro mecanismo de activación de la AMPK endotelial es a través de la formación de peroxinitrito (ONOO^-) por la reacción del anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el NO, que a su vez produce la activación de la proteína quinasa C ζ (PKC ζ), estimulando a la LKB1 y por consiguiente la fosforilación de la AMPK (Xie Z, 2006).

Por último, se ha descrito que los estrógenos son activadores de la AMPK y de la eNOS en células endoteliales humanas a través de la vía CaMKK2 (Yang & Wang, 2015) y la vía SIRT1, ya que el tratamiento con 17β -estradiol aumentó la expresión de SIRT1 e incrementó la producción de NO, produciendo efectos protectores contra la disfunción endotelial en ratas ovariectomizadas (Bendale et al., 2013; Leung & Vanhoutte, 2017).

1.1.3.2 AMPK en células endoteliales: principales dianas y acciones fisiológicas

Como se ha comentado anteriormente, el endotelio es clave en la regulación del tono vascular y la perfusión a los tejidos, para lo cual libera factores vasoactivos en respuesta a diferentes estímulos. Las arterias de conductancia son más dependientes del NO que las arterias de resistencia. A medida que el diámetro de la arteria se reduce, la hiperpolarización derivada del endotelio se convierte en el mecanismo vasodilatador predominante, regulando la resistencia vascular periférica y la presión arterial (Godo & Shimokawa, 2017; Leung & Vanhoutte, 2017; Muñoz et al., 2017).

La eNOS es la principal fuente de producción de NO y es activada por la AMPK mediante diferentes mecanismos (Figura 5):

1) Fosforilación de la eNOS en los residuos de Ser¹¹⁷⁷ o Ser⁶³³; el aumento de la fosforilación de la eNOS junto con el aumento de la fosforilación en los residuos de Thr¹⁷² de la AMPK se observó en células endoteliales humanas y arterias en respuesta a *shear stress*, atorvastatina, adiponectina y activadores farmacológicos de la AMPK (Bradley et al., 2010; Chen et al., 2009; Morrow et al., 2003; Rodríguez et al., 2020; Salt & Hardie, 2017).

2) Supresión de la degradación de la GTP-ciclohidrolasa I (GTPCH) y el posterior incremento de los niveles de tetrahidrobiopterina (BH4), como se demostró en aortas de ratones AMPK α_2 (-/-) que presentaban niveles reducidos de GTPCH I y BH4 (Wang et al., 2009).

3) Aumento de la unión de la proteína de shock térmico de 90 kDa (Hsp90) a la eNOS; se demostró que el tratamiento con AICAR y metformina en ratones wild-type C57BL6 incrementó la fosforilación en el residuo de Ser¹¹⁷⁹ de la eNOS, la biodisponibilidad de NO y la coimmunoprecipitación de la eNOS y la Hsp90, al contrario, que en ratones knock out de AMPK α 1 (Davis BJ, 2006).

Por otro lado, varios estudios han mostrado que la activación de la AMPK puede fosforilar también a la eNOS en el residuo Thr⁴⁹⁵, produciendo la inactivación de la eNOS y la disminución en la producción de NO, siendo estos efectos disminuidos significativamente cuando se elimina de forma específica la AMPK α ₁ endotelial (Chen et al., 2019; Zippel et al., 2018). Los efectos cardiovasculares derivados de la fosforilación de la eNOS por AMPK fueron descritos por primera vez por Chen et al (Chen ZP, 1999). En este estudio, se observó que la AMPK fosforila en el residuo de Ser¹¹⁷⁷ y activa a la eNOS a concentraciones altas de calcio en presencia de la Ca²⁺-calmodulina, por el contrario, la eNOS se inhibe cuando la AMPK fosforila el residuo Thr⁴⁹⁵ en condiciones de bajas concentraciones de calcio. Como se ha mencionado anteriormente, estímulos fisiológicos como la adiponectina (Deng et al., 2010), la leptina (Procopio et al., 2009), el ejercicio físico (Cacicedo, Gauthier, et al., 2011), el *shear stress* (Zhang et al., 2006), y fármacos antidiabéticos como la metformina (Zhonglin Xie et al., 2008) y la rosiglitazona (Boyle JG, 2008) incrementan la producción de NO gracias a la activación de la AMPK y la fosforilación del residuo de Ser¹¹⁷⁷ de la eNOS.

Se ha demostrado que la activación de la AMPK está implicada también en las relajaciones mediadas por hiperpolarización dependiente del endotelio (EDH) en arterias de resistencia (Figura 5) y en la regulación de la presión arterial en ratones *in vivo*, ya que esta respuesta vasodilatadora de tipo EDH se pierde en ratones a los que se les ha eliminado la subunidad AMPK α ₁ del endotelio (Enkhjargal et al., 2014). Sin embargo, por el contrario, otros estudios han demostrado que los activadores de AMPK (AICAR y A769662) inhiben esta hiperpolarización dependiente de endotelio, bloqueando preferentemente a los canales de K⁺ activados por calcio (K_{Ca}) de pequeña conductancia (SK_{Ca}) en arterias mesentéricas (Chen et al., 2019). En futuros estudios, es necesario investigar el potencial terapéutico que tiene la AMPK en las respuestas relajantes tipo EDH en arterias de resistencia bajo condiciones patológicas de presión arterial elevada y/o disfunción endotelial en las que existe una disminución en la síntesis y biodisponibilidad de NO.

Además de su papel beneficioso en la vasodilatación dependiente del endotelio, la activación de la AMPK endotelial se ha visto implicada en la regulación de otras funciones fisiológicas importantes (Figura 5) como la reducción del estrés oxidativo y la inflamación (Colombo & Moncada, 2009; Jansen et al., 2020), la promoción de la angiogénesis, (Nagata D, 2003), la inhibición de la apoptosis (Kim et al., 2010), la supresión del estrés del retículo endoplásmico (RE) (Dong et al., 2010; Dong Y, 2010) y la regulación del metabolismo endotelial, aumentando la β -oxidación de ácidos grasos libres, la mayor fuente de energía para las células endoteliales a través de la vía AMPK–ACC–malonyl CoA–CPT1 (Dagher et al., 2001; Fisslthaler & Fleming, 2009; McCarty, 2005).

1.1.3.3 AMPK en el músculo liso vascular: mecanismos de regulación y principales dianas

Las células del MLV producen vasoconstricción o vasodilatación en respuesta a estímulos fisiológicos y fisiopatológicos. Cuando los vasos sanguíneos sufren una lesión, el MLV cambia de un fenotipo contráctil a un fenotipo sintético, incrementando los procesos de proliferación y migración, pasos críticos para el desarrollo de aterosclerosis (Xu Q, 2010). Al igual que en el endotelio, las subunidades AMPK α_1 y α_2 se localizan en el MLV, siendo la isoforma α_1 la más abundante (Rubin et al., 2005). Las subunidades β_1 y β_2 también se expresan en el MLV y de forma mayoritaria la β_1 (Goirand et al., 2007; Rubin et al., 2005).

Además de las acciones vasculares a nivel endotelial, está descrito en la literatura científica que la AMPK produce vasodilatación mediante diferentes mecanismos independientes del endotelio en arterias de conductancia y de resistencia (Goirand et al., 2007; Rubin et al., 2005; Schneider et al., 2015) así como también está implicada en la regulación de la proliferación del MLV y en la inflamación (Igata et al., 2005). Al principio se describió que la AMPK se activaba en el músculo liso arterial bajo situaciones de estrés metabólico (Rubin et al., 2005). La acetilcolina (Lee & Choi, 2013) y las especies reactivas de oxígeno (ROS) como el H₂O₂ (Zhang et al., 2008) activan la vía LKB1-AMPK en el MLV. Por otro lado, se ha demostrado que un heterotrímero de PP2A, PP2A^{pp2r2d}, inhibe la actividad de la AMPK al producir la desfosforilación en

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

el residuo Thr¹⁷² de AMPK α en células de MLV de ratas y humanos (Joseph et al., 2015; Salminen et al., 2016).

Se ha demostrado que la activación de la AMPK α_1 inducida por el AICAR producía una potente relajación en aorta de ratones mediante un mecanismo independiente del endotelio y de la eNOS (Goirand et al., 2007). Se ha descrito que la AMPK produce la relajación directa del MLV mediante mecanismos de disminución del Ca²⁺ intracelular (Figura 5). En arterias de resistencia mesentéricas, el activador de AMPK, A769662, produjo relajación mediante la activación de la SERCA a través de la fosforilación del fosfolambán dependiente de AMPK (Schneider et al., 2015). Otros autores han demostrado también que el A769662 induce la hiperpolarización y vasodilatación mediante la activación de canales de K⁺ activados por calcio (K_{Ca}) de alta conductancia (BK_{Ca}) en el MLV de arterias mesentéricas de resistencia (Schneider et al., 2015).

Por otro lado, la activación de la AMPK puede interferir directamente con la maquinaria contráctil del MLV e inducir relajaciones a través de mecanismos independientes del Ca²⁺, que disminuyen la sensibilidad al Ca²⁺ de la maquinaria contráctil (Figura 5) (Schubert et al., 2017; Sung & Choi, 2012; S. Wang et al., 2011). Este mecanismo juega un papel clave cuando la vasodilatación se tiene que mantener durante periodos prolongados de tiempo sin que haya una reducción de la concentración del Ca²⁺ citosólico, como ocurre durante la hipoxia. La activación de la AMPK inducida por metformina disminuyó la contracción producida por fenilefrina (Phe) en aorta de rata e inhibió la quinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) y la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina (p-MLC) en cultivos de células de MLV de rata (Sung & Choi, 2012). Otros estudios han descrito que la activación de la AMPK por AICAR en cultivos de células humanas de MLV suprimió la fosforilación inducida por Phe de la subunidad 1 de la miosina fosfatasa (MYPT1) e inhibió la p-MLC (S. Wang et al., 2011). Además, la activación de la AMPK por A769662 o PT-1 produjo la desensibilización al Ca²⁺ de la maquinaria contráctil y la relajación del MLV a través de la despolimerización del citoesqueleto de actina (Schubert et al., 2017).

Además de su papel en la relajación del MLV, la AMPK ejerce acciones antiproliferativas y antimigratorias en las células del MLV (Ferri, 2012; Nagata D, 2004; Salt & Hardie, 2017) e inhibe la calcificación vascular (Cai et al., 2016; Cao et al., 2013) (Figura 5). El hecho de que la AMPK presente acciones vasculares, produciendo la relajación del MLV mediante mecanismos independientes del endotelio y acciones antiproliferativas, confiere un potencial terapéutico adicional a los activadores de la AMPK para el tratamiento de las complicaciones vasculares asociadas a enfermedades metabólicas, en las que la disfunción endotelial y las alteraciones de las vías de señalización de eNOS/NO comprometen las acciones beneficiosas vasodilatadoras, antiinflamatorias y antiproliferativas mediadas por el NO (Prieto et al., 2014).

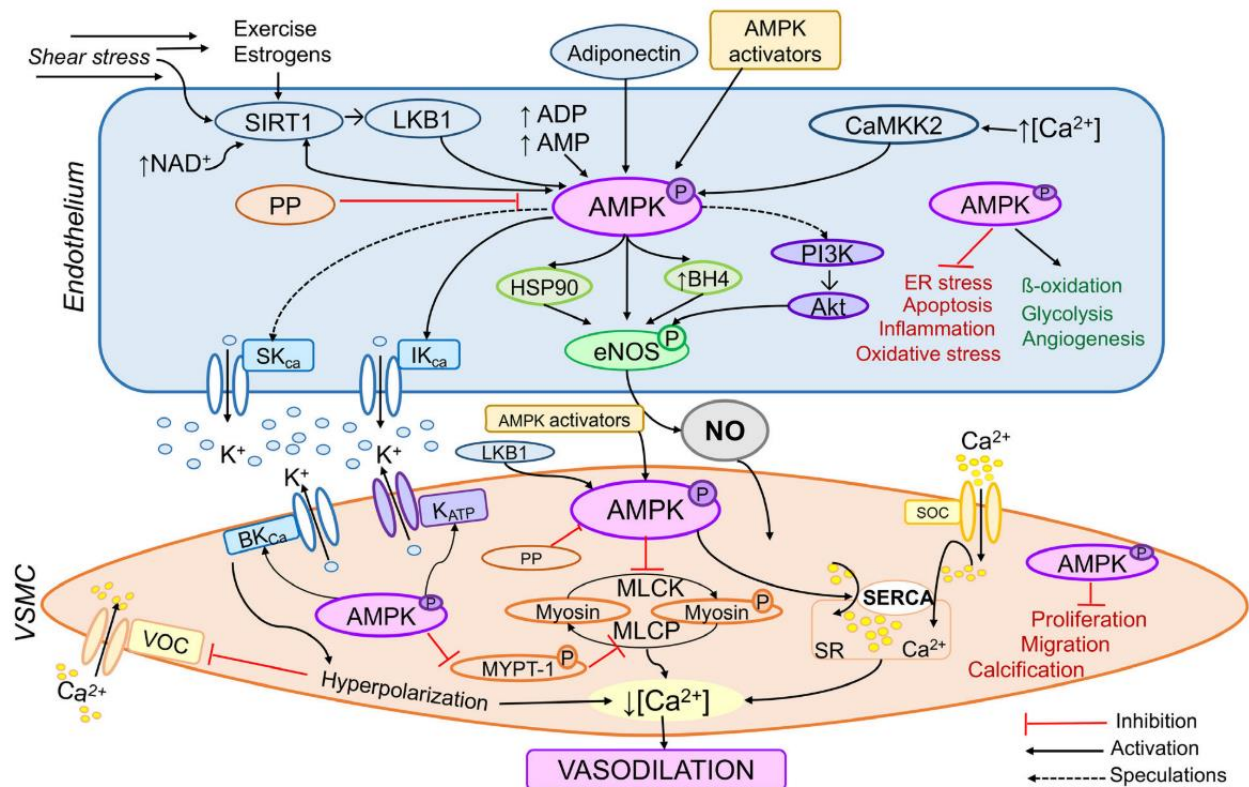


Figura 5: AMPK en la vasculatura, mecanismos de activación y principales dianas en el endotelio y el MLV. Tomado de (Rodríguez et al., 2021).

1.1.4 AMPK y especies reactivas de oxígeno (ROS) en la vasculatura

El estrés oxidativo o la producción excesiva de ROS es un factor patogénico clave subyacente en la disfunción endotelial y del MLV en las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, la señalización redox juega un papel fundamental en la homeostasis y la

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

supervivencia celular, y las ROS como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) o el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), se producen en pequeñas cantidades durante la función celular normal. Las principales fuentes de ROS en la pared vascular incluyen el complejo I y III de las mitocondrias, las NADPH oxidasas (Nox), la xantina oxidasa y la eNOS desacoplada. La reducción del O_2 molecular por las Noxs en los complejos I y III de las mitocondrias durante los procesos metabólicos, produce $O_2^{\cdot-}$ siendo la respiración mitocondrial una fuente importante de generación de ROS en condiciones fisiológicas basales. La producción de ROS está compensada y modulada por los sistemas antioxidantes de las células, incluidos la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPx) y las peroxiredoxinas (Prx), enzimas que bloquean los efectos nocivos de las ROS (Lambeth, 2004; Montezano & Touyz, 2014; Muñoz et al., 2017; Muñoz et al., 2019; Muñoz et al., 2018).

El papel de la AMPK en la homeostasis redox está bien establecido. Mientras que las ROS pueden regular la actividad de la AMPK, ésta a su vez modula la expresión de genes de defensa antioxidante y la producción de ROS en la pared vascular. Además de su activación por cambios en las vías metabólicas y la relación AMP/ATP, la AMPK puede estar directa o indirectamente influenciada por el estado redox celular. La AMPK se puede activar directamente por oxidación reversible de los residuos de cisteína (Cys²⁹⁹/Cys³⁰³) de la subunidad catalítica AMPK α_1 , sin gasto de ATP (Zmijewski et al., 2010). Sin embargo, los cambios en la actividad de la AMPK en respuesta a las variaciones redox son indirectos y secundarios a los efectos del estado redox en la producción de ATP mitocondrial (Hinchey et al., 2018). En la pared vascular, la AMPK responde a numerosas señales de estrés oxidativo e isquémicas, como por ejemplo el NO, el peroxinitrito, un potente oxidante formado por la reacción del NO y el $O_2^{\cdot-}$ y la hipoxia. En células endoteliales aórticas bovinas, el peroxinitrito activó la AMPK a través de la fosforilación en Thr¹⁷² (Zou MH, 2002) y la producción de ROS mitocondriales por berberina activó a la AMPK a través de la formación de peroxinitrito y la fosforilación de AMPK α (Han et al., 2010). En células de MLV de arterias pulmonares, la hipoxia produjo un aumento en la producción de ROS, que aumentó la actividad de la AMPK independientemente de los cambios en el ratio de AMP/ATP, a través de la liberación del Ca^{2+} intracelular del RE, la activación de la CaMKK β y la fosforilación del residuo Thr¹⁷² de la AMPK α (Mungai et al., 2011). Las ROS generadas en la cadena de transporte de

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

electrones (ETC) mitocondrial y no así durante la fosforilación oxidativa, están involucradas en la activación de la AMPK por hipoxia (Emerling et al., 2009).

Los niveles elevados de ROS producen estrés energético y fallo metabólico al oxidar enzimas de la ETC, el ciclo de Krebs y la glucólisis (Wu & Zou, 2020). La AMPK funciona como un sensor redox y su activación mantiene el estado redox inhibiendo la producción de ROS o aumentando las defensas antioxidantes. En las células endoteliales humanas, la activación de la AMPK por AICAR inhibe la elevación de ROS inducida por palmitato mediante el aumento de la expresión de tiorredoxina (Trx) a través de FOXO3 (Li XN, 2009), y reduce el aumento de las ROS mitocondriales inducido por hiperglucemia al aumentar la expresión de la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD), promoviendo la biogénesis mitocondrial a través de la activación de la AMPK-PGC1 α (Kukidome et al., 2006). El silenciamiento de la AMPK α_1 en cultivos de células endoteliales umbilicales humanas reduce la expresión de la MnSOD, la catalasa, la γ -glutamylcisteína sintasa y la Trx (Colombo & Moncada, 2009). El factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) es un factor de transcripción antioxidante activado por ROS tanto en condiciones fisiológicas como de estrés y estimula la expresión de genes antioxidantes como una respuesta adaptativa al estrés oxidativo (Cullinan & Diehl, 2004). La AMPK fosforila directamente a Nrf2 en el residuo Ser⁵⁵⁰, lo que promueve la acumulación nuclear de Nrf2 para la transactivación genética impulsada por el elemento de respuesta antioxidante (ARE) (Joo et al., 2016).

La reducción de la producción de ROS por AMPK se logra principalmente a través de la inhibición de las NADPH oxidasas, la eNOS desacoplada y las ROS derivadas de las mitocondrias (Salt & Hardie, 2017; Wang et al., 2012). Se ha descrito que la activación *in vivo* de la AMPK en ratas diabéticas, o la sobreexpresión de la AMPK en células endoteliales, normalizó la función endotelial y aumentó los niveles de GTPCH I y la síntesis del cofactor de la eNOS, el BH₄, evitando así el desacoplamiento de la eNOS y la generación de superóxido (Wang et al., 2009).

Las NADPH oxidasas (Noxs) generan principalmente ROS y catalizan la reacción de reducción del O₂ a O₂⁻ utilizando NADPH como donador de electrones. Se han identificado siete isoformas de Nox en el genoma humano (Brandes et al., 2014), aunque solamente la Nox1, Nox2, Nox4 and Nox5 se expresan en el endotelio vascular, las CMLV, los fibroblastos de la capa adventicia vascular y diversos leucocitos presentes en la pared vascular en condiciones patológicas (Figura 6) (Drummond & Sobey, 2014;

Drummond GR, 2011). La primera vez que se demostró que la AMPK inhibía la actividad de Nox fue en neutrófilos humanos, donde la activación de la AMPK con AICAR suprimió la generación de $O_2^{\cdot-}$ producida por ésteres de forbol y la explosión respiratoria al reducir la translocación a la membrana celular y la fosforilación de p47phox, subunidad de Nox citosólica, proteína crucial para la activación de Nox2 (Alba et al., 2004). En células endoteliales de la vena umbilical humana, la activación de la AMPK con rosiglitazona redujo significativamente el estrés oxidativo derivado de la Nox2 inducido por altas concentraciones de glucosa mediante la inhibición de la expresión de la proteína p22phox y también la inhibición de la translocación dependiente de PKC de p47phox y Rac1 a la membrana (Ceolotto et al., 2007). En miocitos cardíacos, el péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) activó la $AMPK\alpha_2$, isoforma mayoritariamente expresada en cardiomiocitos, que bloqueó la fosforilación de p47phox dependiente de PKC inducida por niveles altos de glucosa y por consiguiente su translocación a la membrana plasmática y el estrés oxidativo derivado de Nox2 y la glucotoxicidad (Balteau et al., 2014).

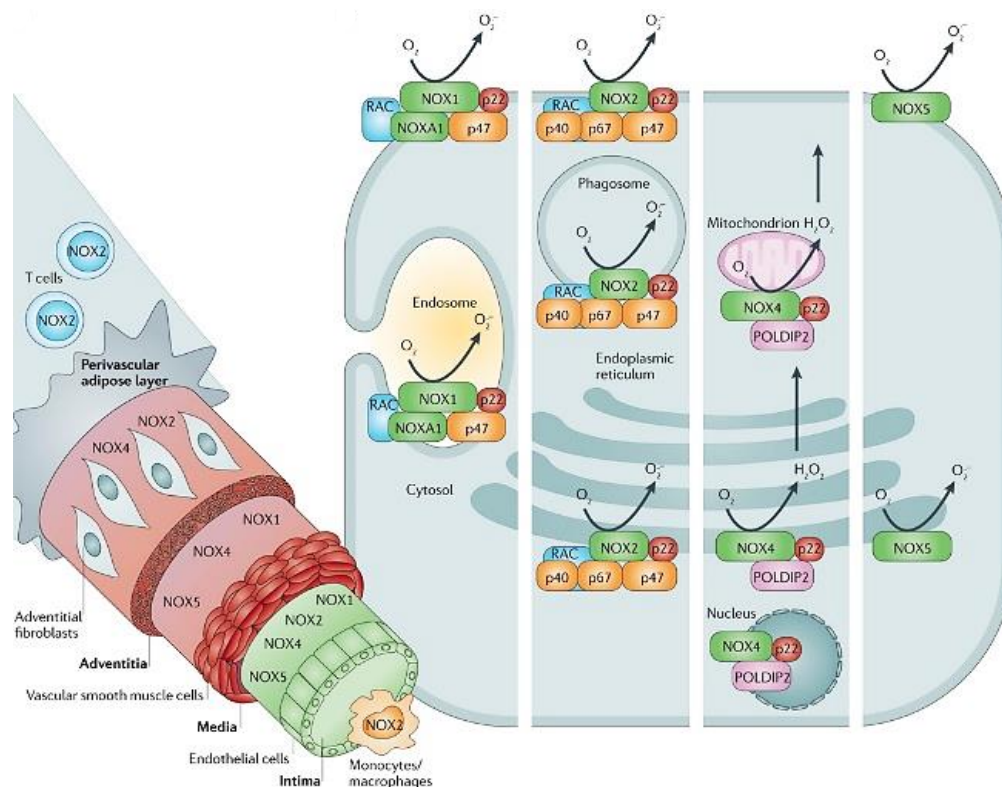


Figura 6: Expresión y localización de las diferentes isoformas de la NADPH oxidasa en la pared vascular. Tomado de Drummond et al. (2011).

La isoforma Nox2 endotelial también puede ser una fuente fisiológicamente relevante de generación de H_2O_2 que contribuye a la vasodilatación dependiente del endotelio en el corazón y el riñón (Larsen et al., 2009; Muñoz et al., 2017; Muñoz et al.,

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2018). Los ratones *knockout* para AMPK α_1 mostraron una regulación al alza de Nox2, disfunción endotelial y un aumento del estrés oxidativo vascular en respuesta a la angiotensina II (Schuhmacher et al., 2011). Aunque la principal isoforma de la AMPK en las células endoteliales es AMPK $\alpha_1\beta_1\gamma_1$, tanto AMPK α_1 como AMPK α_2 son igualmente importantes para mantener la función endotelial. Los primeros estudios de Wang y colaboradores (Wang et al., 2010) demostraron que la AMPK α_2 funciona como un supresor fisiológico de la actividad de Nox2, y que la delección de AMPK α_2 producía disfunción endotelial y un aumento en la expresión de p47phox, p67phox y gp91phox, mientras que la activación de AMPK con AICAR inhibía la expresión endotelial de Nox2 y la producción de ROS de una manera dependiente de AMPK α_2 (Song & Zou, 2012; Wang et al., 2010).

La isoforma Nox4 es la enzima Nox que se expresa con mayor abundancia en las células endoteliales, es constitutivamente activa, se localiza en las mitocondrias y el RE y genera H₂O₂ al contrario de Nox1 y Nox2 que principalmente producen O₂⁻ (Brandes et al., 2014; Drummond & Sobey, 2014). Además, se demostró, por primera vez que la AMPK regulaba negativamente el estrés oxidativo dependiente de Nox4 y la apoptosis en los podocitos renales y las células tubulares en la diabetes y la obesidad (Decleves, Zolkipli, et al., 2014; Eid et al., 2010).

Las mitocondrias son fuentes importantes de generación de ROS y la AMPK regula la producción de ROS mitocondrial a través de varios mecanismos, entre los que se incluyen la regulación al alza de la proteína desacoplante mitocondrial 2 (UCP2), la modulación de la autofagia y la eliminación de mitocondrias disfuncionales (Wang et al., 2012). La UCP2 es una proteína integral de la membrana interna mitocondrial, implicada en el transporte de protones desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial y cumple un papel protector frente al estrés oxidativo. La exposición de las células endoteliales humanas al AICAR o la metformina produjo una regulación al alza dependiente de la AMPK tanto del ARNm de UCP2 como de la proteína UCP2, mientras que la sobreexpresión de UCP2 suprimió el estrés oxidativo y la nitración de la prostaciclina sintasa inducida por niveles altos de glucosa (Z. Xie et al., 2008). Las proteínas y el ADN dañados o las mitocondrias disfuncionales provocan una mayor producción de ROS. Las mitocondrias disfuncionales se eliminan de las células mediante la autofagia y la deficiencia de este mecanismo de reciclaje celular conduce a un aumento de ROS (Wu et al., 2009). La AMPK regula la producción de ROS mitocondriales

mediante la regulación de la autofagia a través de la inactivación de la vía mTORC1 (por fosforilación y activación de TSC2) (Inoki et al., 2003) o por fosforilación directa de ULK1 favoreciendo así la autofagia (Roach, 2011).

La disfunción mitocondrial está involucrada en la patogénesis de las complicaciones vasculares de las enfermedades metabólicas, generalmente asociada a una mayor producción de ROS inducida por estímulos ateroscleróticos como la hiperglucemia, la hiperlipidemia y las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL_{ox}) (Cho YE, 2013; Matsumoto et al., 2014; Z. Xie et al., 2008; Zmijewski et al., 2005). Se ha demostrado que la activación farmacológica de AMPK en células endoteliales atenúa el estrés oxidativo provocado por la hiperglucemia (Z. Xie et al., 2008) y mejora la disfunción endotelial inducida por palmitato mediante la supresión de ROS mitocondrial asociado al estrés del RE y la posterior activación del inflamasoma NLRP3 (Li et al., 2015). La activación de la AMPK también puede proteger contra el daño que sufren las células endoteliales bajo condiciones de estrés oxidativo mediante la inhibición de la apoptosis de estas células y la producción de superóxido mitocondrial mediada por la fosforilación de la eNOS (Aoki et al., 2012).

1.1.5 AMPK e inflamación vascular

La inflamación y el estrés oxidativo son dos procesos subyacentes en la patogénesis de muchas enfermedades y se encuentran en una interacción constante en la pared del vaso. La inflamación de bajo grado en la pared vascular se asocia con disfunción endotelial y participa en la patogénesis de la aterosclerosis. La activación de la AMPK puede ejercer efectos vasoprotectores no sólo al aumentar la biodisponibilidad del NO endotelial, al reducir la producción de ROS en el lecho vascular, sino también a través de sus efectos antiinflamatorios sobre las células endoteliales (Figura 8), al suprimir la vía de señalización de NF- κ B y así reducir los niveles de citocinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y las moléculas de adhesión como la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y la E-selectina (Hattori Y, 2006; Krasner et al., 2014). El NF- κ B es un factor de transcripción sensible al estado redox, que regula la expresión de un gran número de genes inflamatorios. El NF- κ B es inactivo en el citoplasma y se encuentra unido a la proteína I κ B en condiciones basales; sin embargo, tras la estimulación con citocinas, la I κ B es fosforilada por la I κ B

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

quinasa (IKK), produciendo la degradación de I κ B y permitiendo la translocación de NF- κ B al núcleo, su activación y la expresión de genes proinflamatorios (Hinz et al., 2012; Liu et al., 2017). La AMPK actúa como un modulador de las respuestas inflamatorias (Figura 7), ya que se ha demostrado que los activadores de la AMPK suprimen la actividad del lipopolisacárido (LPS) bacteriano, el TNF α y la actividad del NF- κ B inducida por palmitato y la expresión de citocinas proinflamatorias en varios tipos de células, incluidas las células endoteliales y mesangiales (Cacicedo et al., 2004; Katerelos et al., 2010), pero también en células gliales (Giri et al., 2004), retinianas (Cacicedo, Benjachareonwong, et al., 2011) y en miocitos de pacientes obesos y diabéticos tipo 2 (Green, Pedersen, et al., 2011).

La AMPK contribuye a los efectos antiinflamatorios vasculares del NO, ya que el NO activa a la AMPK α_2 en las células endoteliales, que a su vez inactiva a la IKK, disminuyendo así la activación de la señalización de NF- κ B y la expresión de genes inflamatorios (Figura 7) (Bess E, 2011). Se ha demostrado que los efectos antiinflamatorios vasculares de la AMPK están relacionados con el metabolismo de las ROS, ya que la AMPK regula negativamente la activación de NF- κ B a través de la inhibición de la degradación de I κ B α dependiente del proteasoma 26S y la posterior expresión de Nox2. Por lo tanto, en células endoteliales aórticas de ratones AMPK $\alpha_2^{-/-}$ y células endoteliales de vena umbilical humana que expresaban siARN específico de AMPK α_2 , se demostró, que la pérdida de actividad de la AMPK causó disfunción endotelial, un aumento de la expresión de gp91phox, p47phox, p67phox (subunidades de la Nox2) y de la producción de superóxido, así como también un aumento de la actividad del proteasoma 26S, la degradación del I κ B α y de la translocación nuclear de NF- κ B (p50 y p65), mientras que la activación de AMPK por AICAR o su sobreexpresión revirtieron estos efectos, lo que sugiere que la AMPK mantiene el fenotipo no aterogénico y no inflamatorio del endotelio (Wang et al., 2010). Además, la delección de AMPK α_1 *in vivo* aumenta la expresión de la Nox2 y el estrés oxidativo, junto con un aumento de la expresión de ARNm de mediadores proinflamatorios como la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la VCAM-1, lo que da como resultado la disfunción e inflamación vascular, lo que apoya la evidencia de que la actividad de AMPK basal es un elemento protector y regulador redox de la homeostasis vascular (Schuhmacher et al., 2011).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

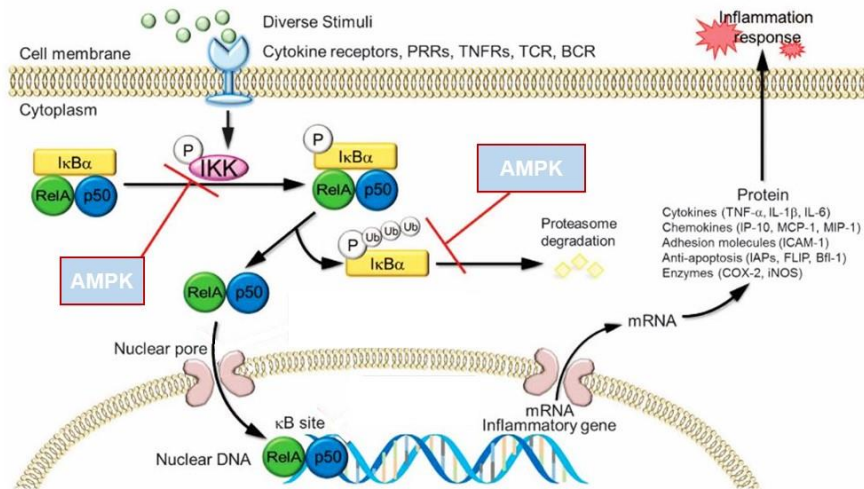


Figura 7: Mecanismos de inhibición de la AMPK sobre la vía inflamatoria NF-κB. Adaptado de Liu Zhang et al (2017)

Estudios recientes han dilucidado el mecanismo por el cual la AMPK α_1 endotelial modula la inflamación vascular y el estrés oxidativo y lo han relacionado con la infiltración vascular de células fagocíticas. La delección endotelial específica del gen que codifica para AMPK α_1 agravó la disfunción endotelial inducida por la infusión crónica de angiotensina II y aumentó el reclutamiento de leucocitos infiltrantes que contribuyeron a aumentar el estrés oxidativo derivado de la Nox2 (NADPH oxidasa fagocítica) mediante la regulación al alza de citocinas y moléculas de adhesión vascular, incluidas la VCAM-1, la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) y la quimiocina ligando 5 (CCL5) (Kröller-Schön et al., 2019). Además, los ratones que carecen de AMPK α_1 endotelial perdieron la defensa antioxidante mediada por la hemo oxigenasa 1 (HO-1) (Kröller-Schön et al., 2019).

Las interacciones entre los monocitos circulantes y las células endoteliales, que están reguladas por moléculas de adhesión como las selectinas, la ICAM-1 y la VCAM-1 expresadas en la superficie de las células endoteliales en respuesta a estímulos inflamatorios, son cruciales para la progresión de la aterogénesis. Se ha descrito en células endoteliales aórticas humanas activadas por TNF- α , que los fármacos activadores de AMPK, como la metformina y el AICAR, atenúan la respuesta aterogénica

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

proinflamatoria de las células endoteliales al inhibir la adhesión de monocitos (Ewart MA, 2008; Zhang et al., 2011) mediante la fosforilación en Ser⁸⁹ del coactivador transcripcional p300; la AMPK bloquea la acetilación de NF- κ B mediada por p300 y su activación, reduciendo así la expresión de las moléculas de adhesión y, en consecuencia, la adhesión de monocitos a las células endoteliales (Zhang et al., 2011).

El papel modulador de la AMPK en la respuesta inflamatoria del endotelio vascular se ha relacionado con sus interacciones con las ROS mitocondriales y el estrés del RE (Li et al., 2015). La activación farmacológica de la AMPK con salicilato o AICAR mejoró la disfunción endotelial inducida por palmitato mediante la supresión del estrés del RE asociado a ROS mitocondriales y la posterior activación y expresión del inflammasoma NLRP3 y la caspasa-1; produciendo la inhibición de la inflamación y la apoptosis, el aumento de la fosforilación de la eNOS y la mejora de la vasodilatación dependiente del endotelio (Li et al., 2015). También se ha demostrado que la AMPK suprime la vía proinflamatoria de señalización de la quinasa Janus (JAK) y el activador de la transcripción (STAT), mediante la fosforilación de JAK en las células endoteliales (Rutherford et al., 2016).

Además de en el endotelio, la AMPK puede modular la respuesta inflamatoria en las células del MLV a través de varios mecanismos, entre los que se incluye el homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), un gen supresor de tumores que actúa como regulador negativo de la PI3K, y modula la proliferación, la supervivencia y el crecimiento celular (Kim & Choi, 2012). Además, la AMPK también puede modular la cascada STAT-1 en el MLV (He et al., 2015). Se ha descrito en CMLV aórticas humanas que la activación farmacológica o genética de la AMPK inhibió la señalización de STAT-1 y atenuó las acciones proinflamatorias inducidas por activadores de STAT-1 como el interferón- γ y la angiotensina II e inhibió la inflamación vascular a través de la regulación positiva de la proteína quinasa fosfatasa-1 activada por mitógenos (MKP-1). Mientras que la inhibición de la AMPK tuvo los efectos opuestos y la delección de AMPK α_1 o AMPK α_2 dio como resultado la activación de STAT-1 y el aumento de los niveles de mediadores proinflamatorios (He et al., 2015).

En las células del sistema inmunológico, la activación de la AMPK reduce la activación de neutrófilos inducida por el receptor tipo toll 4 (TLR4) y disminuye la señalización de NF- κ B y la liberación de TNF- α e IL-6, lo que mejoró la gravedad de la

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

lesión pulmonar aguda inducida por LPS (Zhao et al., 2008). Las interacciones entre la AMPK y los macrófagos y los linfocitos T del sistema inmunológico han sido revisadas recientemente por Jansen y colaboradores (Jansen et al., 2020). La AMPK α_1 participa en la proliferación y la diferenciación de linfocitos T citotóxicos CD8⁺ y la delección de la AMPK α_1 en estas células produce una capacidad alterada para generar una respuesta de memoria cuando son activadas por estímulos infecciosos (Rolf et al., 2013). También se ha demostrado que la AMPK α_1 es necesaria para acoplar la disponibilidad de nutrientes a la demanda de las células T durante el proceso inflamatorio (Blagih et al., 2015). La AMPK juega un papel clave en la regulación de la activación e infiltración de macrófagos. La AMPK regula negativamente la vía de señalización de la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) proinflamatoria; y se ha descrito que la AMPK inhibe la fosforilación de JNK en macrófagos (Jeong et al., 2009), aumentando esta fosforilación en macrófagos y en células endoteliales de ratones deficientes en AMPK (Galic S, 2011). Por otro lado, la delección de AMPK α_1 en las células mieloides condujo a una disfunción que consiste en una polarización mantenida de macrófagos M1 y una disminución del número de macrófagos antiinflamatorios M2 junto con una liberación alterada de citocinas y una fagocitosis disfuncional en células necróticas y apoptóticas (Mounier et al., 2013). La delección de AMPK α_1 en células mielomonocíticas en el modelo de disfunción endotelial inducida por angiotensina II, indujo un fenotipo proinflamatorio con disfunción endotelial severa y estrés oxidativo, mayor infiltración de macrófagos F4/80 y granulocitos GR1⁺ y una liberación aumentada de interferón- γ (IFN- γ) y TNF- α (Jansen et al., 2018).

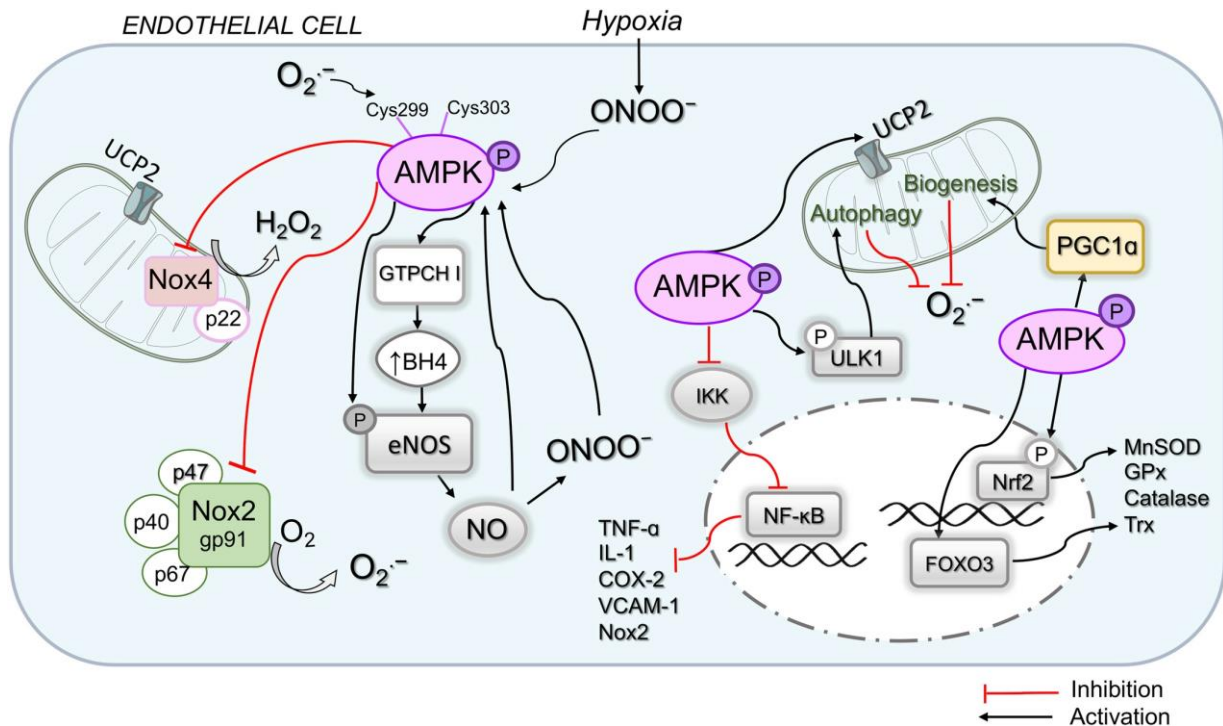


Figura 8: Resumen del papel de la AMPK en la homeostasis redox e inflamación en las células endoteliales. Tomado de (Rodríguez et al., 2021).

1.1.6 AMPK, hipoxia e isquemia/reperfusión (I/R)

La isquemia es la restricción del flujo sanguíneo normal causada por el estrechamiento de la luz de los vasos sanguíneos que disminuye el suministro de O_2 (hipoxia) a los tejidos afectados. La hipoxia es uno de los activadores fisiológicos más potentes de la AMPK en tejidos y órganos, incluido el corazón y el endotelio vascular (Marsin et al., 2000; Wu & Zou, 2020). Los mecanismos subyacentes a la activación de AMPK en situaciones de hipoxia incluyen la disminución en la producción de ATP debido a la inhibición de la β -oxidación de los ácidos grasos libres (AGL) (Hardie & Hawley, 2001), y las ROS de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) como el peroxinitrito, que activan a la AMPK en condiciones de hipoxia no severa (Hamanaka & Chandel, 2009; Laderoute et al., 2006). La hipoxia combinada con la privación de glucosa en las células endoteliales induce la activación de $AMPK\alpha_1$, que protege a estas células al prevenir la apoptosis, mediante la regulación positiva de la expresión dependiente de Nrf2 de genes antiapoptóticos y el mantenimiento del ATP intracelular en las células endoteliales (Liu XM, 2011).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La hipoxia fosforila y activa la AMPK endotelial, específicamente a la subunidad AMPK α_2 , para regular la angiogénesis (Nagata D, 2003). Aunque la AMPK α_2 es la isoforma de la AMPK menos expresada en las células endoteliales, es esencial para la angiogénesis en respuesta al estrés hipóxico. La angiogénesis también puede estar mediada por la activación de la AMPK α_1 a través del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), posiblemente proporcionando energía a través de la inhibición de ACC (Stahmann et al., 2010). La angiogénesis es inducida por la hipoxia derivada de una isquemia y consiste en el crecimiento de nuevos capilares, que forman tubos de células endoteliales sin células del MLV o adventicia de vasos preexistentes, cuyo objetivo es recuperar la perfusión sanguínea en las zonas isquémicas (Carmeliet, 2000; Chen MH, 2020; Heil et al., 2006). La angiogénesis es necesaria para la migración y proliferación de las células endoteliales y su diferenciación morfológica en condiciones de hipoxia. Por lo tanto, la AMPK endotelial puede ser determinante para el reclutamiento de vasos sanguíneos y el mantenimiento de la perfusión sanguínea en tejidos isquémicos (Nagata D, 2003). La inhibición de AMPK, por transfección de ARN de interferencia o silenciamiento (siARN) específico de AMPK α , redujo la formación de nuevos capilares en células endoteliales humanas de la vena umbilical, mientras que en las células endoteliales de aortas de ratones *knock out* AMPK α_1 o AMPK α_2 , hubo una expresión reducida de UCP2, viéndose afectada también la formación de nuevos capilares. La isquemia aumentó la angiogénesis, la fosforilación de Ser¹¹⁷⁷ de eNOS y la UCP2 en músculos isquémicos de ratones *wild type* (WT) pero no de ratones deficientes en AMPK α_1 o AMPK α_2 (Xu MJ, 2011). La disminución de la expresión de AMPK redujo la diferenciación/migración de células endoteliales y la angiogénesis inducida por hipoxia (Nagata D, 2003), VEGF (Stahmann et al., 2010) o adiponectina (Ouchi et al., 2004). La sobreexpresión de UCP2 aumentó la angiogénesis en las células endoteliales de ratones deficientes en AMPK, lo que indica que la disminución de ROS derivados de la mitocondria puede ser crítica (Xu MJ, 2011). El mecanismo propuesto para la angiogénesis mediada por AMPK es que la hipoxia activa la AMPK endotelial que a su vez estimula la vía Akt-eNOS-NO, y se propone que esta vía no está implicada en la migración de células endoteliales ni en la formación de nuevos capilares en condiciones normóxicas (Nagata D, 2003). Sin embargo, la fosforilación directa de la Ser¹¹⁷⁷ de la eNOS, mediada por AMPK, sí se produce en condiciones de hipoxia prolongada o de isquemia-reperfusión (I/R) derivada de peroxinitrito (Nagata D, 2003; Zou MH, 2002).

- **AMPK e isquemia/reperfusión (I/R)**

Cuando un tejido recupera el flujo sanguíneo normal (reperfusión) después de un período hipóxico-isquémico, en lugar de recuperar la función normal, se produce una lesión derivada de la isquemia-reperfusión (I/R). Este daño se produce principalmente por la apoptosis de células endoteliales y la posterior obstrucción de capilares y del flujo sanguíneo microvascular, que finalmente produce una lesión en órganos diana como por ejemplo el cerebro (ictus) (Jiang et al., 2018), el corazón (infarto de miocardio) (Qi & Young, 2015) o riñones (insuficiencia renal) (Decleves, Sharma, et al., 2014), siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. En este contexto, se ha demostrado que la activación de la AMPK tiene efectos protectores durante la I/R, ya que está implicada en la regulación del metabolismo energético, el estrés oxidativo, la inflamación, la función mitocondrial, la autofagia, la apoptosis y el estrés del RE (Ding et al., 2020; Wu & Zou, 2020).

El corazón es altamente sensible a los cambios en el suministro de O₂, siendo la hipoxia o la anoxia muy perjudiciales para la función cardíaca. La activación intrínseca de la AMPK en situaciones de hipoxia protege al corazón contra la lesión isquémica y la apoptosis, aunque también se ha demostrado que la activación farmacológica de la AMPK protege la función de los cardiomiocitos tras una lesión por I/R en el miocardio. (Qi & Young, 2015). Los corazones de ratones con deficiencia de AMPK α_2 no lograron aumentar la captación de glucosa y la glucólisis durante la isquemia ni la oxidación de AGL durante la reperfusión, mostrando más apoptosis de miocitos y menos función contráctil (Russell et al., 2004). Además, los ratones *knockout* para adiponectina presentaban un mayor tamaño de la zona infartada del miocardio y un aumento de la apoptosis en comparación con los WT después de la I/R, y observaron que la posterior administración de adiponectina redujo el daño isquémico a través de la activación de la AMPK, lo que sugiere un potencial terapéutico para el tratamiento agudo de la cardiopatía isquémica relacionada con la obesidad (Shibata R, 2005). Por otro lado, la administración aguda de metformina antes de la I/R, activó a la AMPK miocárdica y aumentó la fosforilación de eNOS en Ser¹¹⁷⁷, disminuyendo el infarto de miocardio en el corazón de ratones diabéticos *db / db* (Calvert et al., 2008). Del mismo modo, el pretratamiento con A769662 también aumentó la activación de eNOS, atenuó el tamaño del infarto y redujo la apoptosis y la necrosis miocárdica (A. S. Kim et al., 2011), lo que confirma que la estimulación farmacológica de AMPK mitiga el daño por I/R. Curiosamente, un estudio

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

mostró que la restricción calórica a largo plazo produce una alta activación de AMPK que protege al corazón envejecido de las lesiones por I/R (Edwards et al., 2010). Por otro lado, ha aumentado el número de estudios que respaldan que los antioxidantes naturales protegen contra la I/R miocárdica al inhibir a las NADPH oxidasas y mejorar la actividad de las enzimas antioxidantes a través de AMPK (Ding M, 2017; Duan et al., 2017). Se ha demostrado que la melatonina es un agente cardioprotector, que activa la vía AMPK-PGC1 α -SIRT3, mejorando la biogénesis mitocondrial y reduciendo la producción de ROS derivadas de las mitocondrias en corazones con I/R de ratas diabéticas (Yu et al., 2017). Además de la acción protectora antioxidante de la activación de AMPK durante las lesiones de I/R, se ha demostrado que la proteína activada C (APC) (J. Wang et al., 2011) y la antitrombina (Chaube et al., 2015) activan a la AMPK y ejercen efectos antiinflamatorios durante la I/R miocárdica, inhibiendo la JNK y las vías de señalización de NF- κ B.

En el riñón, la activación de la AMPK también le confiere protección durante la I/R renal, una de las principales causas de insuficiencia renal aguda (IRA) en la que se produce un daño celular grave y disfunción renal (Wang LT, 2013). Además, existe evidencia de que la activación intrínseca de la AMPK por sí sola durante la isquemia no es capaz de detener la progresión del daño por I/R, sin embargo, la activación de la AMPK por metformina o AICAR ejerce acciones renoprotectoras como la inhibición del estrés oxidativo, de la apoptosis y de los marcadores profibróticos y la activación de la autofagia, que preparan al riñón para responder mejor y poder manejar una lesión (Decleves, Sharma, et al., 2014). Por otro lado, se ha demostrado que el AICAR disminuye la infiltración de monocitos/ macrófagos y mejora la necrosis tubular aguda después de una lesión renal por I/R (Lempiainen et al., 2012). Además, la preactivación de AMPK con metformina preserva la integridad celular y disminuye el daño de las células epiteliales causado por la isquemia renal (Seo-Mayer et al., 2011). Sin embargo, a diferencia de lo observado en el corazón isquémico, parece ser que la activación de AMPK después de la I/R renal no aumenta la fosforilación de la eNOS o la ACC (Mount et al., 2005).

En conclusión, la activación de la AMPK durante la I/R produce un aumento de la glucólisis y de la captación y la oxidación de AGL en las mitocondrias para restaurar los niveles de ATP, y promueve la supervivencia celular al inducir la autofagia e inhibir el estrés del RE, la inflamación y el estrés oxidativo (Qi & Young, 2015; Schneider et al.,

2015). Por tanto, los activadores de AMPK pueden ser fármacos terapéuticos potenciales para la protección contra las lesiones producidas por la isquemia-reperfusión.

1.2 AMPK Y RIÑÓN

Los riñones son órganos pares con una función excretora crucial, filtrando la sangre, reabsorbiendo iones, agua y metabolitos necesarios para el organismo y eliminando sustancias de desecho a través de la orina. Estos órganos también son clave para el mantenimiento de la homeostasis del organismo al regular el volumen y la composición de los líquidos corporales. Los riñones participan en la regulación del balance electrolítico, el equilibrio ácido-base, el control de la osmolalidad y el volumen del líquido extracelular, siendo esta última muy importante para el correcto funcionamiento del sistema cardiovascular. Los riñones se encargan de mantener el equilibrio entre la ingesta y la excreción de la concentración de diferentes electrolitos, entre lo que se incluyen Na^+ , K^+ , Cl^- , bicarbonato (HCO_3^-), hidrogeniones (H^+), Ca^{2+} y fosfato inorgánico (P_i), así como de la eliminación de sustancias derivadas del metabolismo (urea, creatinina, ácido úrico, etc), fármacos y otros compuestos químicos. Además de estas funciones, los riñones son órganos endocrinos que producen y liberan hormonas, entre las que se encuentran el calcitriol (forma activa de la vitamina D_3), la eritropoyetina y la renina, esta última activa el sistema renina-angiotensina-aldosterona, encargado de regular la presión arterial y el equilibrio Na^+ - K^+ (De Castro, 2013).

Los riñones son órganos retroperitoneales situados en la región posterior del abdomen, por debajo del diafragma y a ambos lados de la columna vertebral. En el borde medial de cada riñón se observa una hendidura (hilio) a través de la cual pasan las arterias y las venas renales, los nervios renales, que se originan en el ganglio celíaco perteneciente al sistema nervioso simpático, y la pelvis renal. Al practicar un corte sagital en el riñón se observan dos partes: la parte externa o corteza y la parte interna o médula. La médula a su vez está formada por varias pirámides renales, cuyos vértices (papilas renales) desembocan en los cálices renales, que recogen la orina formada y que confluyen en la pelvis renal y comunican con el uréter. Si ampliáramos una pequeña zona de la parte interna del riñón, se observaría que éste está formado por nefronas, aproximadamente por 1 millón de nefronas, unidades funcionales del riñón. Las nefronas están formadas por el corpúsculo renal, unidad filtradora formada por el glomérulo y la cápsula de Bowman, y

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

los túbulos renales, donde se producen los procesos de reabsorción y secreción, se dividen en túbulo proximal, asa de Henle (formada por rama descendente y ascendente delgadas y rama ascendente gruesa), túbulo distal y túbulo colector. Según la localización del corpúsculo renal y la longitud del asa de Henle, se diferencian nefronas corticales, en la corteza y cortas, y nefronas yuxtamedulares, en la médula y largas (De Castro, 2013).

La sangre que recibe el riñón va a ser filtrada en el corpúsculo renal, donde se produce el paso de la sangre desde el glomérulo a la cápsula de Bowman pasando por la barrera de filtración glomerular que constituye una limitación mecánica y eléctrica al paso de solutos de gran tamaño y con carga negativa. La barrera de filtración está formada por 3 elementos: el endotelio vascular renal que es fenestrado, con poros con un límite de tamaño de 70-100 μ m; la membrana basal glomerular formada por proteínas con carga negativa; por último, los podocitos del epitelio de la cápsula de Bowman que entre ellos forman una barrera con límite de tamaño y carga. La sangre ultrafiltrada va a dar lugar a la formación de la orina primaria formada por agua y pequeños solutos con carga positiva. A lo largo del túbulo, se va a producir la reabsorción tubular, en el cual el 90% del líquido filtrado vuelve a la sangre, y la secreción tubular, proceso de eliminación de sustancias que no han podido ser filtradas que pasan de la sangre al túbulo, con este proceso se forma la orina definitiva (De Castro, 2013).

En relación con la vasculatura renal, los riñones reciben el aporte sanguíneo desde la arteria aorta abdominal a través de la arteria renal que se ramifica posteriormente en arterias segmentarias, interlobares, arcuatas, interlobulillares y por último, en arteriolas aferentes (Figura 9). Estas últimas entran en el glomérulo donde va a tener lugar la ultrafiltración de la sangre desde los capilares glomerulares a la cápsula de Bowman, primer paso para la formación de la orina. Una vez que la sangre ha sido filtrada, sale del glomérulo a través de las arteriolas eferentes que se continúan con los capilares peritubulares que irrigan los túbulos, donde se lleva a cabo la reabsorción de agua y solutos esenciales desde los túbulos a los capilares, y la secreción de iones y solutos que no han sido filtrados anteriormente y necesitan ser eliminados por la orina, desde los capilares a los túbulos renales. Las arteriolas eferentes de las nefronas yuxtamedulares dan lugar a los vasos rectos que se sitúan en paralelo al asa de Henle, participando en el intercambio por contracorriente, necesario para la concentración de orina. Los capilares peritubulares y los vasos rectos se fusionan en la unión corticomedular para formar el sistema venoso, formado por las venas interlobulillares, arcuatas, interlobares y

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

finalmente la vena renal que desemboca en la vena cava inferior. Los vasos linfáticos se encuentran principalmente en la corteza y su función principal es eliminar el líquido y las macromoléculas (como la albúmina) del espacio intersticial entre los túbulos y los capilares, así como de la infiltración de células inmunes (Figura 9) (Dumas et al., 2021).

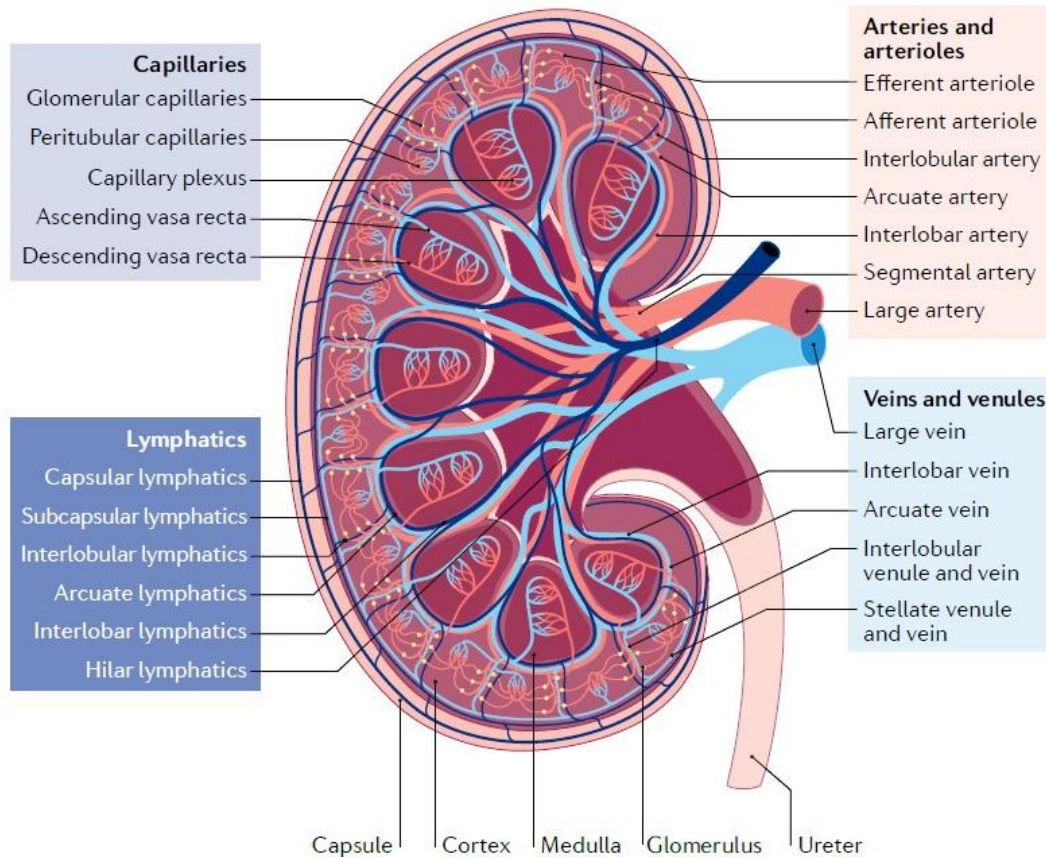


Figura 9: Anatomía de la vasculatura del riñón. Tomado de Dumas (2021)

Los riñones filtran entre 150-180l/día de sangre y se excretan entre 0,5-1,5l/día de orina. El flujo sanguíneo renal (FSR) es muy elevado, el 25% del gasto cardiaco se utiliza para unos órganos que representan el 0,4% del peso corporal y el 7% del consumo total de O₂ (Hallows KR, 2010). De hecho, los riñones solo son superados por el corazón en consumo de oxígeno y abundancia mitocondrial (Galvan et al., 2017).

La tasa de filtración glomerular (TFG) se mantiene constante gracias a los mecanismos de autorregulación que permiten que el FSR sea el mismo independientemente de los cambios sistémicos de presión, lo que se consigue variando la resistencia de las arteriolas, principalmente la arteriola aferente del riñón. Así la presión

capilar glomerular no varía a pesar de que la presión arterial sí lo haga. El primer mecanismo de autorregulación se produce cuando aumenta la presión arterial, aumenta el flujo y se produce el estiramiento de las paredes de la arteriola aferente, lo que activa los canales de Ca^{2+} y la contracción del MLV, aumentando la resistencia para que el flujo se mantenga constante; el segundo mecanismo la retroalimentación tubuloglomerular, se activa cuando aumenta el FSR y la TFG, con ello aumenta la concentración de Na^+ que es detectada por la mácula densa del aparato yuxtaglomerular, que se encuentra entre la porción ascendente gruesa del asa de Henle y el túbulo contorneado distal, y se produce la vasoconstricción de la arteriola aferente por liberación de adenosina y TXA_2 . Por otro lado, otra forma de regulación del FSR es mediante la inervación simpática adyacente al MLV de la arterial renal y a la parte tubular de las nefronas; el aumento de la actividad simpática, por ejemplo, en situaciones de mayor demanda en otros órganos vitales como el corazón o el cerebro, aumenta la secreción de renina por parte de las células yuxtglomerulares y la liberación de noradrenalina y dopamina por los nervios simpáticos y de adrenalina por parte de la médula adrenal. La adrenalina y la noradrenalina producen vasoconstricción al unirse a los receptores α_1 de la arteriola aferente, reduciendo el FSR y la TFG y aumentando la presión sanguínea. La renina a su vez estimula la vía renina-angiotensina-aldosterona; altas concentraciones de angiotensina II producen la vasoconstricción de la arteriola aferente y eferente y un aumento de la presión sanguínea, reducen la TFG y además aumenta la reabsorción tubular de Na^+ y la retención de H_2O por lo que favorece una elevación del volumen del líquido extracelular. Por último, el endotelio renal libera sustancias vasoconstrictoras (angiotensina II, ET-1, adenosina), que disminuyen el FSR y la TFG, y sustancias vasodilatadoras (NO, PGI_2), que aumentan el FSR y la TFG, constituyendo todo ello un mecanismo de regulación local del FSR al modificar la resistencia de las arteriolas del riñón (De Castro, 2013).

1.2.1 Expresión de la AMPK en el riñón

Como se ha comentado anteriormente, los riñones tienen una alta tasa metabólica, necesaria para filtrar la sangre y para el transporte en los procesos de reabsorción y secreción en el túbulo. La AMPK se encuentra altamente expresada en el riñón, un órgano con un gran consumo energético (Stapleton et al., 1996). Estudios de inmunohistoquímica en ratones, donde utilizaron un anticuerpo específico para detectar la fosforilación en

Thr¹⁷²-AMPK α , han detectado a la AMPK en células epiteliales tubulares corticales, especialmente en la superficie apical de los túbulos distales (Juszczak F, 2020; Seo-Mayer et al., 2011), así como en el túbulo contorneado proximal y la rama ascendente gruesa del asa de Henle. En estas células tubulares hay una gran cantidad de mitocondrias y son muy dependientes del metabolismo oxidativo de lípidos, por lo que era previsible una mayor expresión de AMPK (Hallows KR, 2010). La AMPK se ha detectado en otras células renales como los podocitos, células mesangiales y células endoteliales glomerulares, poniendo de manifiesto que la AMPK se expresa de forma ubicua en el riñón (Kume et al., 2012). En cuanto a la expresión de las subunidades de la AMPK, se ha identificado que la subunidad α_1 es la isoforma predominante en el riñón de rata, aunque la subunidad α_2 también es detectable pero en menor medida (Fraser et al., 2005). La isoforma β_1 está altamente expresada en riñón de roedores y humanos mientras que las isoformas γ_1 y γ_2 se expresan de forma similar (Fraser et al., 2005; Hallows KR, 2010).

1.2.2 Papel de la AMPK en la regulación de procesos fisiológicos en el riñón

El papel de la AMPK ha sido estudiado de forma extensa en muchos órganos como en el músculo esquelético (Kjøbsted et al., 2018) y el corazón (Shirwany & Zou, 2010), sin embargo, el papel de la AMPK en la fisiología y la fisiopatología renal no está tan extensamente estudiado. Se ha descrito que la AMPK renal interviene en la regulación del transporte de sodio y otros iones, la función de los podocitos y el metabolismo de lípidos y glucosa, además de estar implicada en procesos patológicos como la inflamación, el estrés oxidativo y la isquemia, como se ha comentado anteriormente y la nefropatía diabética y la enfermedad renal crónica asociada a la obesidad, como se comentará más adelante.

- **AMPK y la regulación del transporte tubular**

La detección de energía por AMPK a nivel renal es particularmente importante, ya que las células renales dependen en gran medida de la regulación del metabolismo energético para el transporte tubular. Por lo tanto, la AMPK es el sensor de energía que acoplaría el metabolismo del riñón y el transporte de iones a lo largo del túbulo según la demanda energética celular (Figura 10) (Hallows, 2005).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se ha descrito que la AMPK regula el transporte de iones a través del canal de Na^+ epitelial (ENaC), el cotransportador de $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-2Cl}^-$ (NKCC) y el CFTR (regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística), canal de Cl^- . El canal CFTR está implicado en la secreción de Cl^- en el túbulo distal y se ha demostrado que la AMPK fosforila el dominio regulador del canal en el residuo de Ser^{768} , inhibiendo así su actividad (Takiar et al., 2011). El canal ENaC se encarga de la reabsorción de Na^+ , junto con la bomba $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPasa}$, y se expresa en el túbulo distal final y el túbulo colector. La reabsorción de Na^+ es un proceso que implica un alto consumo de ATP; los riñones se encargan de mantener la excreción de Na^+ en equilibrio con la ingesta, con el objetivo de mantener constante la concentración Na^+ en el líquido extracelular, el volumen y la presión arterial. Se ha descrito que la AMPK inhibe este canal no mediante la fosforilación directa sino mediante la disminución en el número de canales activos en la membrana plasmática, lo que ayudaría a la prevención de una sobrecarga de Na^+ en condiciones de hipoxia/isquemia (Carattino MD, 2005). El cotransportador NKCC se expresa en la rama ascendente gruesa del asa de Henle y se ha descrito en líneas celulares de la mácula densa de ratones que la activación de la AMPK aumentó la fosforilación en la Ser^{126} de NKCC y su posterior inhibición (Fraser SA, 2007). La bomba $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-ATPasa}$ basolateral es el principal mecanismo de transporte activo responsable de la reabsorción de Na^+ en toda la nefrona, sin embargo, actualmente no hay evidencia directa del papel de la AMPK en su regulación en el riñón.

Por otro lado, se ha descrito el papel que juega la AMPK en respuesta a cambios en la osmolalidad renal. En un estudio *in vivo* se ha demostrado que una dieta alta en sal aumentaba en un 25% la fosforilación en el residuo de Thr^{172} de $\text{AMPK}\alpha$ renal y debido a que la activación de la AMPK produce la inhibición de diferentes transportadores de Na^+ y su posterior reabsorción, sugiere un mecanismo nuevo de regulación de la homeostasis del Na^+ (Fraser et al., 2005).

Por último, se ha descrito que la isquemia renal aguda es un potente activador de la AMPK, principalmente en los túbulos corticales (Mount et al., 2005). Como se ha visto anteriormente, la activación de la AMPK renal inhibe el transporte de iones a través del túbulo, por lo que durante la isquemia renal, la AMPK podría estar limitando el consumo de ATP necesario para el transporte tubular activo de estos iones y así aumentar la supervivencia celular (Hallows, 2005)

- **AMPK y regulación del metabolismo renal**

Los lípidos son una de las fuentes principales de energía del riñón, junto con la glucosa que también es un sustrato energético importante (Hallows KR, 2010). La β -oxidación de AG en la mitocondria consume dos tercios del oxígeno total del riñón y es la fuente principal de ATP en los túbulos proximales (Sharma, 2016), mientras que los podocitos, las células endoteliales y mesangiales exhiben más flexibilidad en su capacidad glucolítica para generar energía (Galvan et al., 2017). Como se ha comentado anteriormente, la activación de la AMPK inhibe las vías anabólicas que consumen ATP y favorece las vías catabólicas de producción de ATP, por lo que la lipólisis y la glucólisis van a incrementarse tras la activación de la AMPK en el riñón (Figura 10). Por el contrario, cuando la actividad de la AMPK está inhibida o alterada como se ha descrito en ratones con una dieta alta en grasas (Decleves et al., 2011; Decleves, Zolkipli, et al., 2014) se produce un aumento de la lipogénesis y la acumulación de AG, colesterol y TAG en el riñón, junto con una disminución de la oxidación de AG en la mitocondria.

En cuanto al metabolismo glucídico en el riñón, los podocitos que forman parte de la barrera de filtración, presentan pocas mitocondrias, por lo que son muy dependientes de la glucólisis anaeróbica como fuente de energía predominante, lo que los hace especialmente sensibles a la insulina (Brinkkoetter et al., 2019). La AMPK regula positivamente la captación de glucosa por insulina y su cascada de señalización (Jakobsen et al., 2001; Ouchi et al., 2004) y su alteración se ha asociado con resistencia a la insulina en humanos y roedores (Ruderman et al., 2013). Se ha demostrado que la actividad de AMPK es esencial para la sensibilidad a la insulina en los podocitos ya que altas concentraciones de glucosa produjeron resistencia a la insulina en cultivos de podocitos debido a una disminución en la actividad de la AMPK y un aumento de los niveles de la proteína PTEN, inhibidor de la vía PI3K/Akt (Rogacka et al., 2014). Por lo tanto, una alteración en la actividad de la AMPK afectaría al correcto metabolismo y función de los podocitos, un daño en la barrera de filtración glomerular y por lo tanto a un mayor riesgo de desarrollo de nefropatía diabética. Por otro lado, se ha descrito que la disminución de la actividad de la AMPK en el riñón de ratas diabéticas produjo la acumulación de glucógeno en el túbulo renal (Cammisotto et al., 2008).

En referencia al metabolismo proteico, se ha demostrado que la reducción de la actividad de la AMPK en ratas diabéticas incrementa la síntesis de proteínas a través de

la activación de mTORC1, produciendo el engrosamiento de la membrana basal, la acumulación de matriz extracelular en las células mesangiales e hipertrofia renal (Lee MJ, 2007; Lieberthal & Levine, 2009).

- **AMPK renal y adiponectina**

La adiponectina es una hormona producida en los adipocitos que presenta un papel clave en la regulación de la función de los podocitos, con efectos protectores sobre la función renal. Los niveles de adiponectina en sangre se encuentran disminuidos en individuos con obesidad y resistencia a la insulina y se ha relacionado con un aumento de la albuminuria (Christou & Kiortsis, 2014). Se ha descrito en cultivos de podocitos que la administración de adiponectina incrementa la actividad de la AMPK (Figura 10) y disminuye la actividad de la Nox4 denominada *renox* por su alta expresión en el riñón, reduciendo de esta manera el estrés oxidativo y la permeabilidad de los podocitos a la albúmina y su disfunción (Sharma et al., 2008). Por lo tanto, la medida de los niveles de adiponectina circulantes, podría ser un buen indicador para identificar individuos obesos con alto riesgo de desarrollar enfermedades renales y cardiovasculares y prevenir así la disfunción de los podocitos y la albuminuria en las primeras etapas. Mediante un estudio de microscopía electrónica se localizó el receptor ADIPOR1 de la adiponectina junto con la AMPK α en el glomérulo renal, en las células endoteliales, mesangiales y podocitos. Se observó que la incubación *in vitro* de los glomérulos aislados con adiponectina aumentaba la actividad de la AMPK, lo que sugiere que la activación de la AMPK por adiponectina está implicada en la regulación del estrés oxidativo, la inflamación, la fibrosis y la apoptosis en el glomérulo (Cammisotto & Bendayan, 2008; Christou & Kiortsis, 2014).

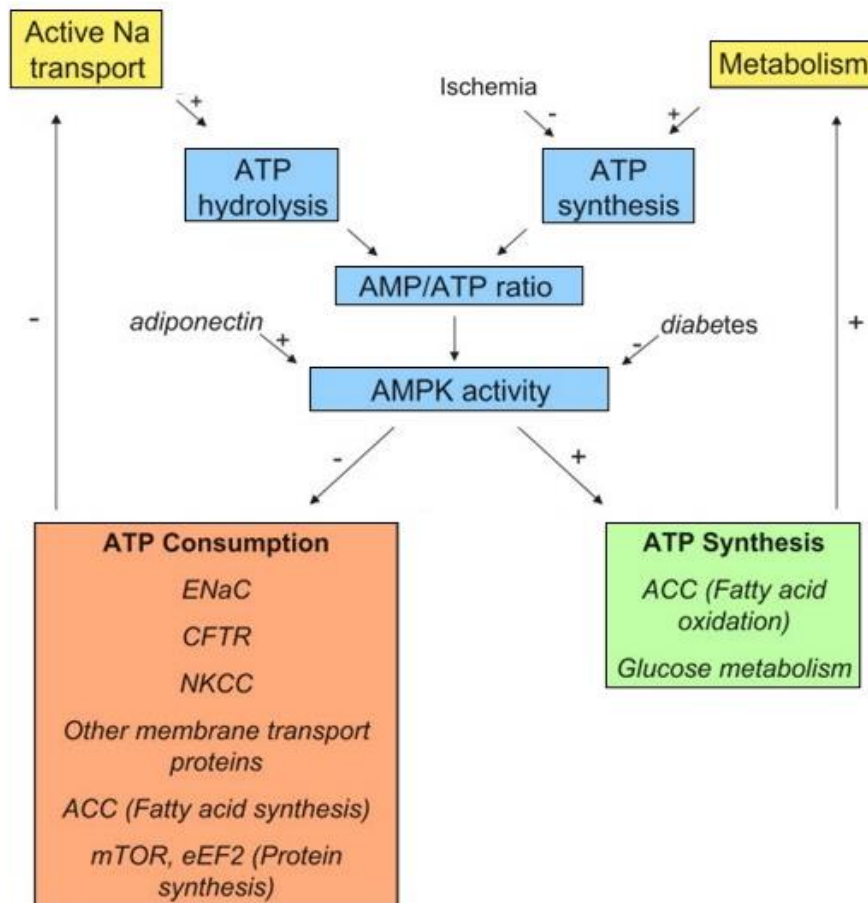


Figura 10: Papel de la AMPK en la regulación del transporte tubular y el metabolismo renal.
Adaptado de Hallows, KR (2010).

1.3 AMPK, OBESIDAD Y ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

La enfermedad renal crónica (ERC) es un problema de salud pública a nivel mundial, siendo causa directa de morbilidad y mortalidad, así como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. En la ERC se produce un fallo progresivo, mantenido e irreversible de las funciones renales, que cursa inicialmente de manera asintomática, solo apareciendo síntomas en las últimas etapas y requiriendo diálisis o trasplante renal (Hill NR, 2016). Para considerar una insuficiencia renal como crónica, la tasa filtración glomerular tiene que ser menor o igual a 60 ml/min durante al menos 3 meses (De Castro, 2013). En 2017, la prevalencia de esta enfermedad se encontraba en el 9,1% (697,5 millones de casos) a nivel mundial, lo que supone un incremento del 30% desde el 1990. El 5% se encontraba en el estadio 1 y 2 de la enfermedad, el 3,9% en el estadio 3, el 0,16% en el estadio 4, el 0,07% en el estadio 5, el 0,041% en diálisis y el 0,011% para trasplante renal. La ERC afecta 1,3 veces más a

mujeres que a hombres, sin embargo, la incidencia de diálisis, trasplante renal y mortalidad es mayor en hombres. Además, 1,2 millones de personas fallecieron en 2017 en el mundo debido a la ERC y 1,4 millones de muertes se produjeron por enfermedad cardiovascular atribuibles a una función renal alterada, clasificándose como la 12ª causa principal de muerte en 2017 (Collaboration, 2020). La hipertensión, la resistencia a la insulina y la diabetes son los factores de riesgos que más influyen en la patogénesis y la progresión de la ERC, junto con la obesidad, el síndrome metabólico, las enfermedades cardiovasculares y el envejecimiento (Juszczak F, 2020).

La obesidad es una enfermedad metabólica que juega un papel clave en el desarrollo de resistencia a la insulina, síndrome metabólico y diabetes mellitus, factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares. La obesidad se define como una acumulación anormal o excesiva de grasa corporal, superando un índice de masa corporal (IMC) de 30 (OMS, 2020). Los cambios en la sensibilidad a la insulina, la dislipemia, la disfunción vascular, la inflamación y el estrés oxidativo son los mecanismos fisiopatológicos subyacentes en la obesidad (Prieto et al., 2014). Por otro lado, el síndrome metabólico es una enfermedad caracterizada por un conjunto de alteraciones metabólicas en las que se incluyen principalmente obesidad visceral y resistencia a la insulina, junto con hipertensión y dislipemia, alteraciones que incrementan significativamente el riesgo de desarrollar otras patologías como la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (Cornier et al., 2008; Rochlani et al., 2017). Según la Organización Mundial de la Salud, la prevalencia de la obesidad en el mundo en 2016 se había triplicado con respecto a los datos del año 1975. En 2016, más de 1900 millones de adultos de 18 o más años tenían sobrepeso, de los cuales, más de 650 millones eran obesos, es decir, que alrededor del 40% de la población mundial presentaba sobrepeso y el 13% obesidad (OMS, 2020). Con respecto a la prevalencia del síndrome metabólico, la Federación Internacional de Diabetes estima que el 20-25% de la población adulta en todo el mundo presenta esta enfermedad (IDF, 2020).

1.3.1 Obesidad y enfermedad renal crónica: fisiopatología

El aumento global de la ERC crece de forma sorprendente en paralelo al número de casos de obesidad. La diabetes y la hipertensión son las principales causas de ERC, sin embargo, estudios demuestran que la obesidad es un factor de riesgo de ERC independiente de la presencia de diabetes, hipertensión y otras comorbilidades. Varias

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

revisiones sistemáticas y metaanálisis señalan que la obesidad incrementa el riesgo de presentar albuminuria y una TFG menor de 60 ml/min (De Vries et al., 2014; Garofalo et al., 2017; Thomas et al., 2011).

La principal causa de la obesidad y el síndrome metabólico es el desequilibrio energético crónico entre las calorías ingeridas y las utilizadas, debido a la falta de actividad física y/o a un aumento de la ingesta de alimentos hipercalóricos con un alto contenido de grasas y azúcares, son factores de riesgo responsables de la elevada adiposidad visceral (O'Neill & O'Driscoll, 2015). Además, la obesidad tiene un origen multifactorial y en los últimos años se han descrito factores genéticos y epigenéticos implicados en esta patología (Rohde et al., 2019). La acumulación excesiva de lípidos en el tejido adiposo produce una liberación de altos niveles de citoquinas como IL-6, TNF α y MCP-1 y de AGL no esterificados, que favorecen un estado de inflamación sistémica crónica. El tejido adiposo de fenotipo proinflamatorio se caracteriza por un aumento en la producción de ROS, un aumento en la secreción de adipoquinas proinflamatorias como la leptina y la resistina y una disminución de adipoquinas antiinflamatorias como la adiponectina. Por lo tanto, el tejido adiposo en la obesidad se convierte en un órgano endocrino muy activo, que secreta una elevada cantidad de citoquinas inflamatorias, AGL y ROS, lo que a su vez produce resistencia a la insulina no solo en hígado y músculo, sino también a nivel vascular en las células endoteliales desencadenando disfunción endotelial y vascular (Prieto et al., 2014). La lipotoxicidad, la inflamación y el estrés oxidativo son los mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo de disfunción vascular asociada a la obesidad, y es considerada la primera manifestación que precede a la pérdida de la sensibilidad a la insulina y a las complicaciones cardiometabólicas como la nefropatía diabética y la ERC asociada a obesidad.

En este contexto de inflamación sistémica y estrés oxidativo, cuando afecta al riñón se produce inflamación renal de bajo grado y fibrosis (Figura 11) (Juszczak F, 2020). Además, durante la obesidad y la diabetes se produce un aumento en la producción de angiotensina II y de la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), y la activación del sistema nervioso simpático (SNS) por aumento de los niveles de leptina, lo que produce a su vez un aumento en la reabsorción tubular del sodio, una elevación del volumen e hipertensión. Este aumento en la actividad tubular en la corteza renal produce un incremento del consumo de oxígeno, que junto a un aumento en el flujo sanguíneo, contribuye a la inducción de hipoxia en el tejido renal (Figura 11). La

hipertensión acelera la hiperfiltración glomerular, lo que da lugar a una glomerulopatía asociada a la obesidad que se caracteriza por glomerulomegalia y glomerulosclerosis (Figura 11) (Juszczak F, 2020). Por otra parte, se ha demostrado que la acumulación ectópica de lípidos en tejidos no adiposos como el riñón está asociada con cambios estructurales y funcionales en podocitos, células mesangiales y células tubulares proximales, que se asocia con hiperfiltración y albuminuria (De Vries et al., 2014). La lesión renal asociada a obesidad se ha relacionado con disfunción endotelial, alteración en la función de los podocitos, engrosamiento de la membrana basal glomerular y expansión mesangial, atrofia tubular, fibrosis intersticial y disminución progresiva de la función renal como consecuencia de un aumento de la albuminuria y una disminución de la TFG, que en última instancia produciría la pérdida de nefronas y enfermedad renal en etapa terminal (Declèves & Sharma, 2015; Juszczak F, 2020).

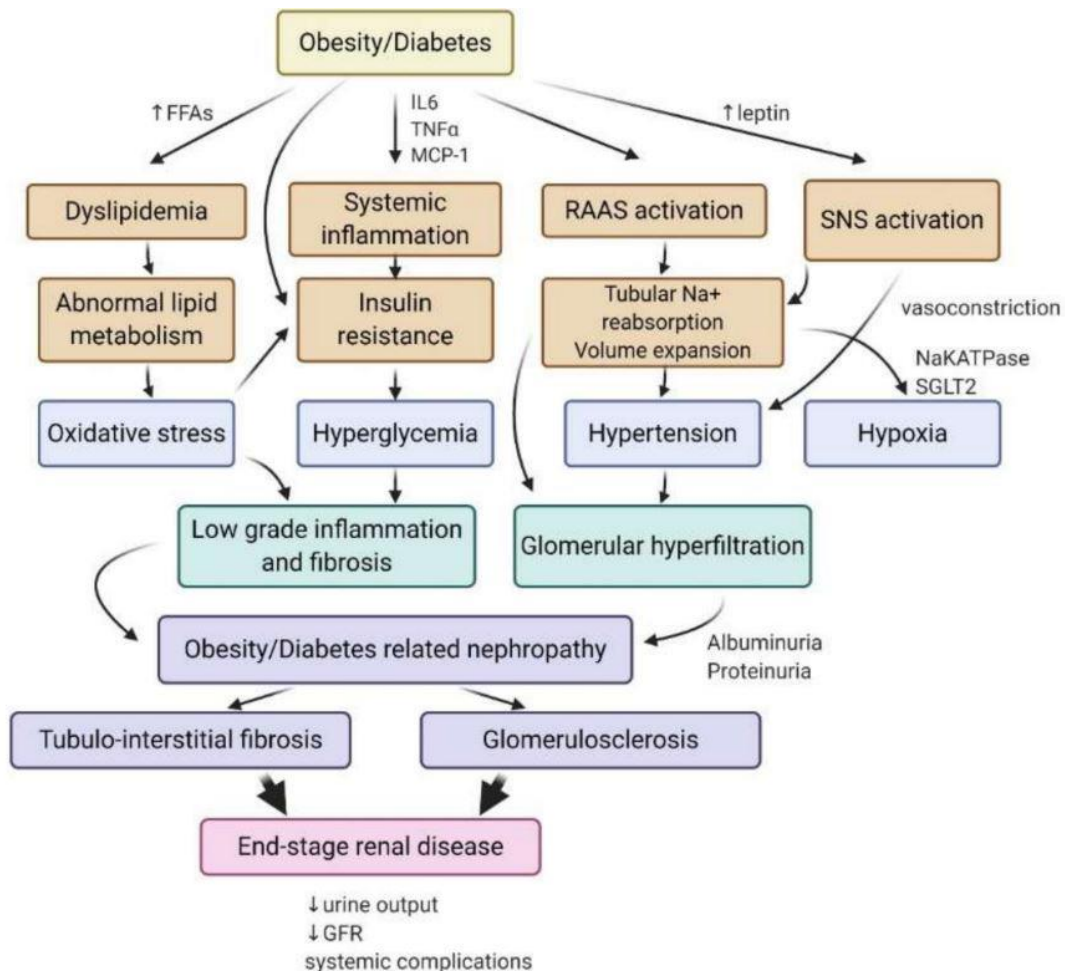


Figura 11: Mecanismos implicados en la patogénesis de la enfermedad renal crónica asociada con obesidad/diabetes. Adaptado de Juszczak (2020).

1.3.2 Alteración de la AMPK en la enfermedad renal crónica asociada a obesidad

El exceso energético en la célula producido por el exceso de nutrientes debido a la hiperglucemia, la dislipemia y la acumulación de lípidos, producen la inhibición de la AMPK en patologías como la obesidad y la diabetes. Diversos estudios demuestran que la actividad de la AMPK se encuentra disminuida o alterada en el riñón de ratones alimentados con una dieta alta en grasas, produciendo un aumento en los marcadores de inflamación, estrés oxidativo y fibrosis renal que se revierten tras la administración de activadores de la AMPK (Decleves et al., 2011). La actividad de la AMPK renal también se encuentra alterada en ratones y humanos diabéticos y la activación de la AMPK con AICAR aumenta la función mitocondrial y mejora los parámetros de la nefropatía diabética (Dugan et al., 2013). Además, la vía adiponectina-AMPK se encuentra disminuida en la obesidad y la diabetes y recientemente se ha demostrado que la administración oral de un agonista sintético de adiponectina previene la lipotoxicidad inducida por palmitato en células endoteliales glomerulares y podocitos del riñón de ratones *db/db*, mejorando la función endotelial y reduciendo el estrés oxidativo, la apoptosis y el daño renal (Choi et al., 2018). Como se ha comentado anteriormente, la AMPK se encuentra altamente expresada en el riñón, un órgano con una de las demandas de energía más altas después del corazón, por lo tanto, cualquier alteración entre la demanda y el suministro de energía va a causar un daño renal. Se ha demostrado en modelos de ratones con ERC que la actividad de la AMPK para detectar los cambios en el ratio AMP/ATP está alterada y que la activación de la AMPK protege al riñón de los cambios fibróticos (Kikuchi et al., 2018). Como se ha descrito anteriormente, la AMPK en el riñón juega un papel clave en la regulación del transporte activo tubular, el metabolismo glucídico y lipídico, así como también en la inflamación, el estrés oxidativo, la homeostasis mitocondrial y la autofagia, por lo tanto, la alteración de su actividad está implicada en la ERC asociada a obesidad/diabetes y se ha demostrado que su activación mejora estas patologías (Juszczak F, 2020).

1.3.2.1 AMPK y disfunción vascular

La pérdida de la función normal del endotelio o disfunción endotelial es un evento patogénico temprano en el desarrollo de una disfunción vascular y se caracteriza por un cambio en el fenotipo endotelial. Este cambio es producido por una mayor exposición del

endotelio a estímulos dañinos mecánicos, metabólicos, oxidativos o hipóxicos, que conducen a una alteración en la vasodilatación mediada por endotelio, un deterioro de la función de barrera y una mayor expresión de factores proinflamatorios y protrombóticos (Prieto et al., 2014; Vanhoutte et al., 2017). En las enfermedades metabólicas como la diabetes y la obesidad la disfunción endotelial es el principal factor predictor y el primer paso para el desarrollo de aterosclerosis y complicaciones cardiovasculares, en las que se incluyen infarto de miocardio, ictus y fallo renal (ERC, insuficiencia renal) (Vanhoutte, 2009; Vanhoutte et al., 2017). La alteración de la AMPK vascular podría estar implicada en estas complicaciones cardiovasculares asociadas a las enfermedades metabólicas (Dugan et al., 2013; C. F. García-Prieto et al., 2015; Ruderman & Prentki, 2004; Ruderman et al., 2013; Steinberg & Kemp, 2009).

Como se ha comentado anteriormente, no es sorprendente que los niveles altos de glucosa, triglicéridos o AGL en la obesidad y la resistencia a la insulina conduzcan a la inhibición de la actividad vascular de la AMPK (Ido et al., 2002; Weikel et al., 2015). Los mecanismos implicados en esta inhibición no están claros, pero se ha propuesto que la activación de la proteína quinasa C (PKC), aumentada en muchos trastornos metabólicos, puede fosforilar el residuo de Ser⁴⁸⁷ de la AMPK α_1 , inhibiendo y reduciendo así su actividad (Heathcote et al., 2016). Además, la activación de la PKC, inducida por altos niveles de glucosa y AGL, activa la producción de ROS derivada de la NADPH oxidasa en las células endoteliales y MLV, disminuyendo así la biodisponibilidad de NO (Inoguchi et al., 2000). Por otro lado, otro posible mecanismo descrito es que el aumento de la expresión de la proteína PP2A en aortas de ratones alimentados con una dieta alta en grasas disminuye la fosforilación de la AMPK (Joseph et al., 2015; Salminen et al., 2016). Además, la hiperglucemia y la hiperinsulinemia propias de la diabetes suprimen la activación de la AMPK en el MLV, a través de la fosforilación de la Ser⁴⁸⁵ de AMPK α_1 , mecanismo inhibitorio dependiente de la Akt (Ning et al., 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, la AMPK ejerce acciones beneficiosas sobre el lecho vascular, aumentando la producción del NO endotelial y la relajación del MLV, disminuyendo la inflamación y la producción de ROS y aumentando las defensas antioxidantes. Por tanto, la inhibición de la actividad de la AMPK va a tener consecuencias perjudiciales para el sistema cardiovascular. En un modelo de obesidad inducida por dieta alta en grasa en ratas, se ha descrito que se produce una regulación a la baja de la vía AMPK-PI3K-Akt-eNOS, lo que induce disfunción endotelial (Concha F. García-Prieto et al., 2015). Además, otros estudios sugieren que los niveles altos de AGL

producen una acumulación de lípidos en las células endoteliales y disfunción endotelial en la obesidad debido a la alteración de la actividad de la AMPK y de ACC, inhibiendo la oxidación de AGL y promoviendo la lipotoxicidad (Lee et al., 2005). Otros estudios han mostrado evidencias de que la pérdida de AMPK α_1 en células del MLV promueve la calcificación aterosclerótica *in vivo* (Cai et al., 2016) y estrés de RE en células endoteliales de aortas de ratones knockout para AMPK α_2 (Dong Y, 2010).

1.3.2.2 AMPK y alteración en el transporte tubular

En las enfermedades metabólicas, como la obesidad y la diabetes, se producen cambios significativos en el transporte tubular y alteraciones hidroelectrolíticas como hipomagnesemia, hiper/hiponatremia, hiper/hipopotasemia e hiper/hipocalciuria. Las alteraciones en el transporte de iones en el riñón pueden exacerbar la hipertensión y acelerar la lesión renal. Los transportadores de iones renales y la homeostasis de electrolitos juegan un papel fundamental en los cambios funcionales y la lesión renal durante la nefropatía diabética y la ERC asociada a la obesidad (Spires et al., 2019). Se ha descrito que la AMPK regula el transporte de iones a lo largo del túbulo y su activación lleva a la inhibición de diferentes canales como el ENaC, NKCC y el CFTR, por tanto, la alteración de la AMPK renal en enfermedades metabólicas podría modificar la expresión y la actividad de estos transportadores de iones en el riñón y estar implicada en el desequilibrio electrolítico de la ERC asociada a diabetes/obesidad (Juszczak F, 2020). En condiciones de hiperglucemia e hiperinsulinemia, se produce un aumento del SRAA, que aumenta a su vez la actividad de ENaC y la reabsorción de Na⁺, produciéndose la elevación de la presión intraglomerular e hipertensión, paso previo para el desarrollo de glomeruloesclerosis e hipertrofia (Spires et al., 2019). Por otro lado, en riñones de ratones obesos con una dieta alta en grasas se ha demostrado que la actividad de la AMPK se encuentra reducida en la corteza renal, mientras que la actividad del transportador NKCC está incrementada, lo que produce un aumento en la reabsorción de Na⁺ e hipertensión en la obesidad (Davies et al., 2014).

1.3.2.3 AMPK y alteración del metabolismo renal

Como se ha descrito anteriormente, la AMPK regula el metabolismo de lípidos, glúcidos y proteínas en el riñón y una alteración en su actividad produce acumulación de lípidos y glucógeno en el túbulo renal, resistencia a la insulina en podocitos, daño en la barrera de filtración e hipertrofia renal.

Cuando la ingesta de lípidos supera la capacidad del tejido adiposo de almacenar grasa, se produce la acumulación de lípidos en el riñón; esta lipotoxicidad va a desencadenar lesiones renales y está estrechamente relacionada con una alteración en la actividad de la AMPK renal (Decleves, Zolkipli, et al., 2014). La nefropatía diabética y la ERC asociada a obesidad comparten la alteración en el metabolismo de los lípidos y su acumulación dañina en el riñón (Kume et al., 2007). La alteración de la AMPK en el riñón en estas patologías produce la activación de la ACC, la estimulación de la lipogénesis y la inhibición de la entrada de AG por la CPT1 para su oxidación en la mitocondria, lo que contribuye a la acumulación de AG en el riñón (Juszczak F, 2020). Por otro lado, la disminución de la actividad de la AMPK aumenta la activación del factor de transcripción, SREBP 1/2, produciendo el depósito de colesterol y AG en cultivos celulares de riñones de ratas control (Lin YC, 2019). La acumulación de colesterol en las células de los túbulos proximales de ratones alimentados con dieta alta en grasa se revierte tras la activación de la AMPK con AICAR, al inhibir a la HMG-CoA reductasa y con ello la síntesis de colesterol (Decleves, Zolkipli, et al., 2014). En las células de los túbulos proximales se lleva a cabo la reabsorción del Na⁺ filtrado, proceso que requiere elevadas cantidades de ATP que se obtienen a través de la oxidación de AG en la mitocondria. Estos AG entran en las células a través del transportador CD36; se ha demostrado que la sobreexpresión de CD36 en el riñón produce la inhibición de la AMPK y la consiguiente lipotoxicidad (Lin YC, 2019). La acumulación intracelular de AG produce el depósito de metabolitos lipídicos tóxicos como las ceramidas y el diacilglicerol (DAG), activadores endógenos de la PKC y la PP2A, involucrados en la resistencia a la insulina y como se ha descrito anteriormente en la inhibición de la actividad de la AMPK. Por otro lado, la ferroptosis una forma de muerte celular dependiente de hierro causada por la peroxidación de lípidos, especialmente los ácidos grasos poliinsaturados, es crucial en el desarrollo de la enfermedad renal aguda o crónica (Tang & Xiao, 2020). Recientemente se ha demostrado que la AMPK es imprescindible para la inhibición de la ferroptosis (Lee et

al., 2020) aunque se necesitan más investigación para esclarecer estos mecanismos de la AMPK en el riñón.

Por otra parte, los podocitos son altamente dependientes del metabolismo de la glucosa y una alteración en la función de estos da lugar a un aumento en la permeabilidad de la barrera de filtración glomerular y proteinuria. Los canales TRPC6 se encuentran en la membrana plasmática de los podocitos y regulan los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} y diferentes proteínas del citoesqueleto. Recientemente se ha demostrado en riñones de ratón y en cultivos celulares que la sobreexpresión de TRPC6 en los podocitos produce una elevación en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , induciendo apoptosis y proteinuria; además mutaciones en el gen de TRCP6 en humanos se relacionan con la glomeruloesclerosis focal y segmentaria (Dryer & Reiser, 2010; Krall et al., 2010). Un estudio ha demostrado que, en condiciones de hiperglucemia, la disminución de la actividad de la AMPK se relaciona con una sobreexpresión de los canales TRCP6 en los podocitos y un aumento de la permeabilidad de la barrera de filtración; por otro lado, el tratamiento con metformina aumenta la activación de la AMPK, normalizando la expresión de TRCP6 y la dinámica del citoesqueleto de los podocitos, poniendo de manifiesto el papel protector de la AMPK sobre la función renal (Szrejder et al., 2020). Como se ha mencionado anteriormente, la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia contribuyen de forma significativa al desarrollo de la ERC. En el riñón, la insulina se une a sus receptores IRS 1/2 que activan vías de señalización que promueven la captación de glucosa, el crecimiento celular o la producción de NO; la señalización de la insulina tiene una función clave en mantener la función renal normal especialmente en los podocitos como demuestra el estudio en ratones con carencia del receptor de la insulina que mostraron un aumento de la matriz glomerular y albuminuria (Welsh et al., 2010). Además, la exposición de ceramidas y palmitato en podocitos humanos produce resistencia a la insulina y disminución de la captación de glucosa (Lennon et al., 2009). La alteración de la AMPK en la obesidad se ha relacionado con la resistencia a la insulina y su activación en el riñón desempeña un papel beneficioso protegiendo la función renal (Decleves, Zolkipli, et al., 2014; Ruderman et al., 2013).

1.3.2.4 AMPK, disfunción mitocondrial y alteración de la autofagia en el riñón

Debido a la alta demanda energética de los riñones, una correcta función mitocondrial es primordial para la producción de ATP necesaria para realizar todas las funciones renales. Como ya se ha mencionado, la SIRT1, sensor energético que se activa ante el aumento de NAD^+/NADH , activa a la AMPK que a su vez activa a $\text{PGC1}\alpha$, factor de transcripción que regula la biogénesis mitocondrial. La actividad de la SIRT1 y la AMPK se encuentran alteradas en las enfermedades metabólicas y la disfunción mitocondrial está implicada en la patogénesis de la ERC inducida por diabetes/obesidad (Galvan et al., 2017; Tang et al., 2016).

La cardiolipina es el lípido de la membrana interna mitocondrial encargado de la estabilización y ensamblaje de los complejos de la cadena respiratoria y está implicado por su interacción con el citocromo c en la apoptosis mitocondrial. El exceso de lípidos en el riñón produce un aumento en la producción de ROS en la mitocondria y la peroxidación de la cardiolipina lo que va a afectar a la estructura y organización de la mitocondria, produciéndose la pérdida de las crestas mitocondriales (Figura 12). Esto limita la oxidación de AG en la mitocondria y una mayor acumulación de lípidos en el riñón, incrementando aún más la lipotoxicidad, la producción de ROS y la expresión de citoquinas proinflamatorias, lo que contribuye a la disminución de la actividad de la AMPK. El aumento de ROS y la menor producción de ATP afecta al correcto plegamiento de las proteínas, induciéndose estrés del RE. Además, la alteración de la AMPK produce la apoptosis de podocitos, células endoteliales glomerulares y células epiteliales del túbulo proximal, lo que resulta en proteinuria, glomeruloesclerosis y fibrosis intersticial, respectivamente (Figura 12) (Tang et al., 2016). Un estudio ha demostrado en riñones de ratones alimentados con una dieta alta en grasas, que el tratamiento con el péptido SS-31, antioxidante dirigido selectivamente a la cardiolipina, protege la estructura y la función de la mitocondria, promueve la respiración celular, restaura la actividad de la AMPK y previene la acumulación intracelular de lípidos y las lesiones glomerulares y tubulares, poniendo de manifiesto que la protección de la mitocondria es una nueva diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos contra el daño renal en la obesidad (Szeto et al., 2016). Otro estudio con células HKC8, línea celular del túbulo proximal renal de origen humano, sometidas a altas concentraciones de glucosa, ha demostrado que la disminución de la actividad de la AMPK y $\text{PGC1}\alpha$, junto con un aumento del estrés oxidativo mitocondrial y apoptosis se revierte tras el tratamiento con AICAR y metformina (Lee

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

SY, 2017), demostrando que la activación de la AMPK es beneficiosa para la correcta función mitocondrial lo que reduciría el daño renal.

Por otro lado, la autofagia es esencial para mantener la homeostasis celular y la función renal. Como ya se ha mencionado, la activación de la AMPK activa a ULK-1 e inhibe a mTORC, incrementando la formación de autofagosomas, que posteriormente se fusionan con lisosomas para eliminar de las células de forma selectiva proteínas, lípidos y orgánulos potencialmente tóxicos. La delección específica de los genes de la autofagia en el riñón de ratones produce mitocondrias dañadas, agregados de proteínas, estrés del RE, pérdida de podocitos y de células tubulares proximales y deterioro progresivo de la función renal (Kaushal et al., 2020). La obesidad y la diabetes producen la alteración de la autofagia en células renales y se asocia con el desarrollo de la ERC (Satriano & Sharma, 2013). Además, se ha demostrado que la obesidad suprime la autofagia en células epiteliales del túbulo proximal, tanto en ratones como en muestras renales de biopsia de humanos. En este estudio, la administración i.p de AGL y albúmina produce daño tubular leve, apoptosis y activación de la AMPK y de la autofagia en ratones control, mientras que en la obesidad la disminución de la actividad de la AMPK junto con un aumento en la activación de mTORC se asocia con una inhibición de la autofagia, perdiéndose así los efectos renoprotectores y aumentando la lesión renal (Yamahara et al., 2013). Por otro lado, la mitofagia o la autofagia de las mitocondrias dañadas, es un proceso dependiente de la AMPK. Recientemente, se ha demostrado en células epiteliales tubulares de rata, que la hiperglucemia disminuye la actividad de la AMPK y aumenta la activación de mTORC, disminuyendo la mitofagia y aumentando la acumulación de mitocondrias dañadas y la producción de ROS; la activación de la AMPK con AICAR, revierte estos efectos y disminuye la lesión tubular renal (Wang et al., 2020). En resumen, la alteración de la AMPK inhibe la autofagia y participa en la patogénesis de la ERC inducida por

enfermedades metabólicas; por ello la activación de AMPK puede ser una forma valiosa de restaurar el proceso de autofagia y prevenir lesiones renales.

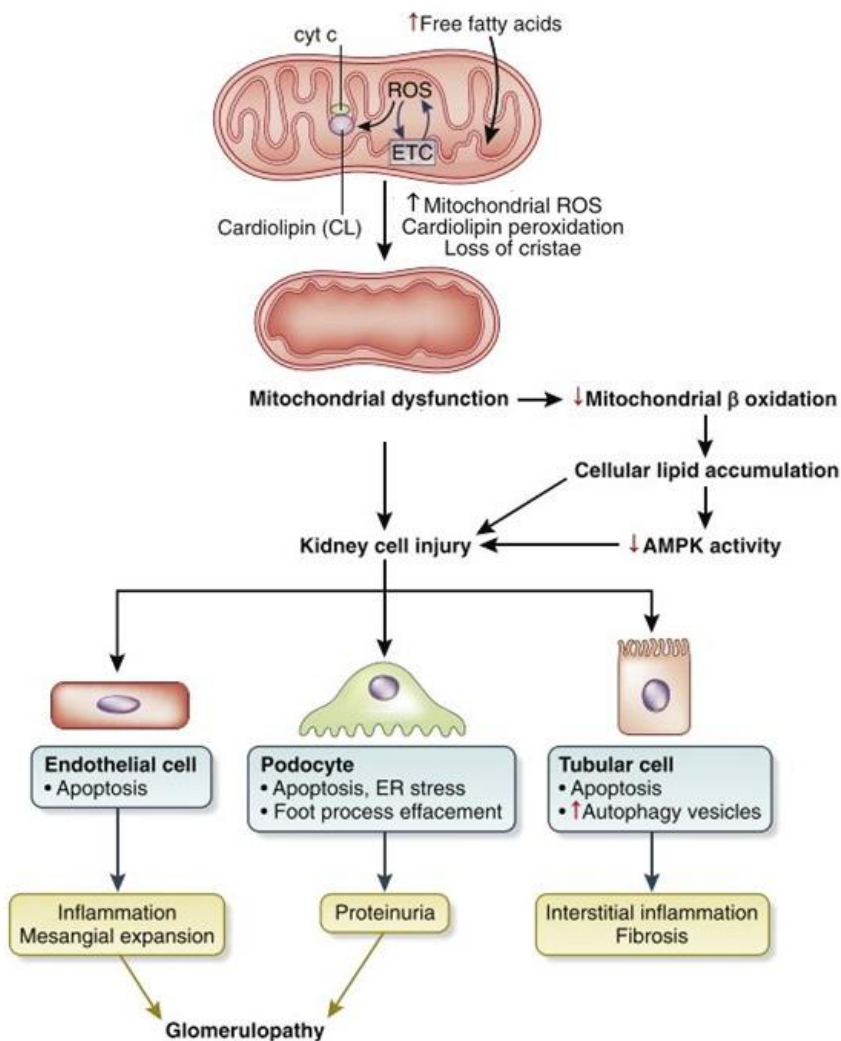


Figura 12: Disfunción mitocondrial, AMPK y ERC asociada a la obesidad. Adaptado de Tang, Cai et al (2016)

1.3.2.5 AMPK, estrés oxidativo e inflamación renal

Las ROS intervienen en la regulación de la hemodinámica renal y el transporte de iones, así como en la regulación del tono vascular, la remodelación vascular, la proliferación y la migración celular, el depósito de la matriz extracelular, la inflamación y la apoptosis (Irazabal & Torres, 2020; Sedeek et al., 2013). La sobreproducción de ROS derivadas de la mitocondria y las NADPH oxidasas están implicadas en el desarrollo del estrés oxidativo, la disfunción vascular y la posterior lesión renal derivadas de las

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

enfermedades metabólicas. El estrés oxidativo juega un papel clave en la patogénesis de la ERC asociada a obesidad/diabetes (Daenen et al., 2019) y la AMPK es un sensor redox esencial capaz de suprimir la producción excesiva de ROS, como se ha descrito anteriormente. Se ha demostrado que la producción de ROS está incrementada en pacientes obesos en las primeras etapas de ERC, existiendo una correlación positiva entre el estrés oxidativo y la progresión del daño renal (Himmelfarb, 2005; Ramos LF, 2008).

Durante la respiración aeróbica celular en las mitocondrias se produce la oxidación de compuestos orgánicos a través del ciclo de Krebs para generar ATP y los donantes de electrones, NADH y FADH₂. Estos últimos transfieren sus electrones a los complejos de la cadena de transporte de electrones para generar ATP hasta que llegan al O₂, que se reduce a H₂O en su mayor parte y solo el 1% se convierte en O₂⁻ en condiciones fisiológicas. Sin embargo, en condiciones patológicas, la hiperglucemia o el exceso de AG produce una fuga excesiva de electrones principalmente en los complejos I y III (Kashihara et al., 2010). Debido a la alta demanda de energía, las células renales contienen muchas mitocondrias, lo que hace que el riñón sea especialmente susceptible al daño oxidativo. Durante la obesidad/diabetes, la producción de ROS supera la capacidad antioxidante de las células, produciéndose alteraciones en la cadena de transporte de electrones y el ADN mitocondrial, disminución en la producción de ATP, disfunción mitocondrial y apoptosis (Che et al., 2013). Numerosos estudios *in vitro* en cultivos celulares han demostrado que altas concentraciones de glucosa producen un incremento en la producción de ROS derivadas de la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias (Brownlee, 2001; Nishikawa et al., 2000). Esta sobreproducción de ROS mitocondriales está asociada a la disfunción mitocondrial, que en último término, produce lesión renal y favorece la progresión de la ERC, como se comentó anteriormente (Galvan et al., 2017). Por el contrario, en un estudio *in vivo* en el que se utilizó una sonda fluorescente de dihidroetidio (DHE) específica de O₂⁻ en ratones diabéticos, se ha demostrado que la producción de O₂⁻ por parte de la mitocondria se encuentra reducida en los glomérulos y los túbulos corticales en comparación con los controles. En este mismo estudio, la disminución de la generación de ROS en el riñón se asocia con una reducción en la capacidad oxidativa de la mitocondria, una disminución de la biogénesis mitocondrial y una alteración en la actividad de la AMPK que empeora aún más la disfunción mitocondrial; la activación de la AMPK con AICAR pudo restablecer la función mitocondrial y la producción de ROS, disminuyendo así la matriz glomerular, los

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

niveles de TGF- β y la albuminuria (Dugan et al., 2013). Estos resultados aparentemente contradictorios podrían explicarse por la progresión de la ERC, mostrando en etapas iniciales un aumento de las ROS mitocondriales que al producir el daño del ADN de la mitocondria y de la cadena de transporte electrónico, en última instancia, conduce a una reducción de ROS (Irazabal & Torres, 2020).

Por otro lado, la SIRT3 es la principal desacetilasa de la mitocondria, cuya función es regular la producción de ROS y mantener la homeostasis mitocondrial. Tiene como diana a los complejos de la cadena respiratoria y a varias enzimas antioxidantes entre las que destacan la isocitrato deshidrogenasa y la manganeso superóxido dismutasa. En la obesidad y la diabetes, la actividad de la SIRT3 disminuye en el riñón produciendo la pérdida de la integridad funcional de la mitocondria y aumentando la producción de ROS, y la inflamación (Koyama et al., 2011). Se ha demostrado que la activación de la AMPK mejora la función renal mediante la restauración de la expresión y la actividad de la SIRT3 en células tubulares renales (Morigi et al., 2015). Por tanto, la activación de la vía AMPK/SIRT3 es beneficiosa para mantener la homeostasis mitocondrial en las enfermedades metabólicas.

Además, las ROS participan en la regulación de los procesos de autofagia para eliminar aquellos orgánulos y macromoléculas dañadas, sin embargo, en condiciones patológicas la alteración de este proceso de reciclaje celular produce un incremento de ROS, favoreciendo la progresión de las lesiones renales (Kaushal et al., 2019). Como se ha mencionado, la activación de la AMPK podría revertir estos efectos.

Por otro lado, otra fuente importante de generación de ROS en el riñón son la Nox1, la Nox2 y la Nox4. La Nox4 es la isoforma predominante en el riñón y en la vasculatura renal, junto con la Nox2, pero en menor proporción. La Nox4 se expresa en los túbulos renales, células mesangiales glomerulares, podocitos, fibroblastos y células endoteliales, se localiza en la membrana interna de la mitocondria y en el RE y genera H_2O_2 , a diferencia de las otras isoformas que producen $O_2^{\cdot-}$. La Nox4 es activa de forma constitutiva por lo que el aumento en la producción de H_2O_2 depende de los niveles de expresión (Irazabal & Torres, 2020). Recientemente, se ha demostrado que una sobreproducción de $O_2^{\cdot-}$ debido a una mayor expresión de la Nox1 y Nox2 en arterias renales, junto con una disminución de la expresión de la Nox4 y una menor producción del vasodilatador H_2O_2 , está implicado en el estrés oxidativo y la disfunción endotelial en el riñón. Por otro lado, en este mismo estudio se observa que la expresión de la Nox1 y

4 en la corteza, que contiene principalmente túbulos renales, está regulada al alza, mientras que la Nox2 se encuentra disminuida (Muñoz et al., 2019). Esto muestra la complejidad y la diferente contribución de las diferentes isoformas de Nox en el estrés oxidativo renal. Además, se ha descrito que la Nox4 está sobreexpresada en el riñón tanto en la nefropatía diabética como en la ERC asociada a obesidad (Decleves et al., 2011; Jiang et al., 2011; Sedeek et al., 2010), lo que produce un aumento en la producción de ROS, que a su vez induce la generación de ROS por parte de la mitocondria (Dikalov, 2011), cuyas consecuencias a nivel renal son la inflamación y la fibrosis. La activación de la AMPK reduce la expresión de la Nox4 y la producción de ROS, inhibiendo la fibrosis en ratones *db/db* (He et al., 2016) y disminuyendo la acumulación de lípidos y el daño renal en ratones alimentados con dieta alta en grasa (Zhang SQ, 2014).

Por último, a nivel vascular niveles elevados anormales de ROS, en particular de O_2^- , producidos por las Noxs, las mitocondrias o la eNOS desacoplada en respuesta a hiperglucemia, hiperlipidemia o citocinas proinflamatorias en diabetes/obesidad, están implicados en el desarrollo de disfunción endotelial y vascular asociada a enfermedad metabólica (Muñoz et al., 2019; Prieto et al., 2014; Santiago et al., 2016). Como se ha descrito anteriormente, la AMPK es un sensor oxidativo y un regulador redox en el sistema cardiovascular. La actividad de la AMPK puede ser regulada por el estrés oxidativo, y a su vez, la AMPK es capaz de modular tanto la generación de ROS mitocondriales como la expresión génica de las enzimas antioxidantes en las células endoteliales. Por ello, la activación farmacológica de AMPK en el endotelio vascular se ha propuesto como beneficiosa en la enfermedad metabólica, no solo por sus efectos bioenergéticos, sino también por su capacidad para contrarrestar el estrés oxidativo (Colombo & Moncada, 2009). Los efectos beneficiosos de la activación de la AMPK sobre el estrés oxidativo vascular son consistentes con las acciones protectoras cardiovasculares de fármacos utilizados en el tratamiento de trastornos metabólicos que activan la AMPK, como el AICAR, la metformina o las tiazolidinedionas (Ewart & Kennedy, 2011).

El estrés oxidativo renal y la inflamación son dos procesos en interacción constante y están implicados en la progresión de la ERC en enfermedades metabólicas. En la obesidad, la disminución de los niveles de adiponectina, junto con un aumento de los niveles de insulina en plasma, se ha asociado una elevación de citoquinas inflamatorias e inflamación renal (Stemmer K, 2012). En este contexto, el aumento de

ROS estimula el reclutamiento y la infiltración de macrófagos, células T y otras células del sistema inmunitario debido a la actividad de la MCP-1, altamente expresada en células endoteliales y mesangiales. En modelos experimentales de diabetes, se ha demostrado que los riñones muestran un aumento de los niveles de NF- κ B y de la expresión de MCP-1, TNF α e IL-6, mostrando una correlación positiva con los niveles de albuminuria (Jha et al., 2016). Estudios *in vitro*, *in vivo* y en humanos han demostrado que la activación persistente del NF- κ B, factor de transcripción sensible a ROS, en células epiteliales tubulares, podocitos, células endoteliales glomerulares y células mesangiales produce inflamación crónica y la progresión de la ERC (Rangan et al., 2009). Las consecuencias de una inflamación persistente son la acumulación de la matriz extracelular y la consiguiente fibrosis renal, característica común en la ERC, siendo el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) el agente fibrogénico implicado en este proceso. La sobreproducción de ROS derivadas de la Nox4 produce la regulación al alza del TGF- β y se induce la diferenciación de fibroblastos y la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (colágeno y fibronectina), mientras se inhibe la degradación de estas (Jiang et al., 2014). Un estudio ha demostrado que la disminución de la AMPK en ratas diabéticas, junto con un aumento de la expresión de la Nox4, produce un aumento del TGF- β y de la acumulación de la matriz extracelular en el riñón; por otro lado, la activación de la AMPK inhibe la vía Nox4/ TGF- β (Papadimitriou et al., 2014), lo que supondría un enfoque terapéutico para prevenir las lesiones fibróticas renales.

Por otro lado, a nivel vascular, la inflamación podría ser el vínculo entre la enfermedad metabólica y la cardiovascular, un estado proinflamatorio de bajo grado en la pared vascular asociado a una disfunción endotelial es subyacente en las complicaciones vasculares que se producen en la obesidad, la diabetes y otros estados de resistencia a la insulina (Prieto et al., 2014). La hiperglucemia, la hiperlipidemia y la resistencia a la insulina activan la vía de señalización JAK/STAT, una importante cascada intracelular que promueve la respuesta inflamatoria y la resistencia a la insulina y acelera el desarrollo de complicaciones cardiovasculares (Recio et al., 2014; Wunderlich et al., 2013). Como se mencionó anteriormente, la AMPK es un represor inflamatorio vascular, y la delección de la AMPK o su inhibición en individuos obesos exacerba la inflamación (Gauthier MS, 2011; Schuhmacher et al., 2011). La reducción de la actividad de la AMPK se ha asociado con inflamación crónica en el síndrome metabólico, la obesidad y la diabetes tipo 2, y también con un desarrollo más rápido de la aterosclerosis (Luo et al.,

2005; Steinberg & Schertzer, 2014), mientras que los activadores de la AMPK como el AICAR o la metformina inhiben la inflamación, atenúan la respuesta aterogénica proinflamatoria de las células endoteliales al inhibir la adhesión de monocitos y tienen efectos protectores cardiovasculares (Akbar, 2003; Ewart & Kennedy, 2011).

1.3.3 Perspectivas terapéuticas de los activadores de la AMPK: enfermedades metabólicas y enfermedad renal crónica

La alteración en el metabolismo de lípidos y su acumulación en el riñón, la alteración en el transporte tubular, la disfunción mitocondrial, la disminución de la autofagia, el estrés oxidativo, la inflamación, la fibrosis y la disfunción vascular son los procesos que contribuyen a producir lesión renal en las enfermedades metabólicas. El daño renal es generalmente irreversible por lo que es necesario establecer terapias tempranas de prevención. Actualmente, la estrategia terapéutica de la ERC derivada de enfermedades metabólicas se basa en el control de la hiperglucemia, la dislipemia y el control de la presión arterial, sin embargo, la progresión de la ERC en individuos con obesidad y diabetes continúa a pesar de los tratamientos recibidos entre los que se incluyen los inhibidores del SRAA, antihipertensivos y antidiabéticos. Por ello, es necesario comprender mejor los mecanismos subyacentes involucrados en el desarrollo de la ERC con el objetivo de desarrollar terapias para prevenir o frenar su progresión, evitando así la diálisis y el trasplante renal (Whaley-Connell & Sowers, 2017).

La activación de la AMPK presenta efectos renoprotectores y se ha convertido en una diana terapéutica atractiva para prevenir la lesión renal derivada de las enfermedades metabólicas (Allouch & Munusamy, 2018; Rajani et al., 2017). Se ha demostrado en modelos preclínicos que hay una gran variedad de compuestos naturales y sintéticos que ejercen efectos protectores sobre la función renal en la obesidad y la diabetes a través de la activación de la AMPK. Los mecanismos de estos compuestos en general se basan en disminuir la acumulación de lípidos en el riñón, promover la autofagia, disminuir el estrés oxidativo, la inflamación y la fibrosis renal (Li et al., 2021). Es necesario determinar si estos efectos renoprotectores de los activadores de la AMPK se reproducen en los ensayos clínicos. En la actualidad, fármacos empleados en el tratamiento de enfermedades metabólicas como los antidiabéticos (metformina, tiazolidinedionas) o las estatinas, han demostrado que muchas de las acciones beneficiosas que ejercen se deben a la activación

de forma indirecta de la AMPK. En los últimos años, se han desarrollado moléculas que activan de forma directa a la AMPK como el A769662 o el AICAR, sin embargo, muestran algunas limitaciones para su uso clínico. Además, se ha identificado que determinados compuestos naturales activan a la AMPK y producen efectos beneficiosos sobre la función renal y las enfermedades metabólicas en estudios preclínicos, así como se ha demostrado que la restricción calórica y el ejercicio mejoran el estado metabólico también a través de la activación de la AMPK (Grahame Hardie, 2016).

1.3.3.1 Modificación del estilo de vida

La acumulación de lípidos ectópicos en el riñón está asociada con la progresión de la ERC, por ello, la reducción de peso y el control de la ingesta de lípidos en la dieta ha mostrado un beneficio claro en la función renal, reduciendo la proteinuria en pacientes obesos y diabéticos con nefropatía (Saiki et al., 2005). La activación de la AMPK reduce la acumulación de colesterol y fosfolípidos en el riñón de ratones con una dieta alta en grasa (Decleves, Zolkipli, et al., 2014). Asimismo, la función protectora de la restricción calórica sobre la función renal se ha estudiado principalmente en modelos de roedores y ejerce sus efectos beneficiosos a través de la activación de la AMPK y la SIRT1, reduciendo la inflamación y el estrés oxidativo y aumentando la autofagia (Wang et al., 2018). Además, a nivel vascular la restricción calórica mejora la función endotelial y reduce la presión arterial debido a la activación de la vía AMPK/PI3K/Akt/eNOS en ratas Zucker obesas (Concha F. García-Prieto et al., 2015). Con respecto a la dieta, un estudio de cohorte observacional muestra como el consumo excesivo de alimentos procesados se asocia con una mayor tasa de mortalidad en pacientes con ERC, mientras que una dieta vegetariana o con mayor consumo de frutas y verduras reduce este riesgo (Gutiérrez et al., 2014). Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 no se sintetizan en el organismo y se aportan a través del consumo de pescado azul o las nueces y han mostrado que su suplementación presenta efectos protectores sobre la función renal en pacientes diabéticos con ERC (Miller et al., 2013). En un reciente estudio, se ha demostrado por primera vez que el ejercicio físico mejora la función renal de ratones alimentados con una dieta rica en grasa, que presentaban enfermedad renal crónica inducida por obesidad. El ejercicio mostró una mejora significativa de la glomerulopatía relacionada con la obesidad, la fibrosis tubulointerstitial, la inflamación y el estrés oxidativo. De la misma forma, el

ejercicio impidió la acumulación y el depósito de lípidos en el túbulo proximal. En este estudio, se muestran evidencias de que estas acciones beneficiosas del ejercicio sobre el riñón están mediadas por la actividad de la AMPK, al incrementar la β -oxidación de ácidos grasos y la autofagia en ratones obesos (Juszczak et al., 2021).

1.3.3.2 Compuestos naturales activadores de la AMPK

En los últimos años, se han identificado 100 productos naturales diferentes que activan a la AMPK, aunque no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de muchos ellos. Entre ellos destaca por su gran uso clínico, el salicilato, un compuesto natural extraído tradicionalmente de la corteza de sauce, y producto metabólico del ácido acetilsalicílico o aspirina, se ha demostrado que es un activador directo de la AMPK que se une a la subunidad $\beta 1$, en el mismo sitio que el compuesto sintético A769662. En un estudio *in vivo* se ha demostrado como la administración de salicilato produce la inactivación de la ACC y la reducción de AG en suero junto con un aumento de la oxidación de AG en la mitocondria, gracias a la activación de la AMPK (Hawley et al., 2012). La galegina de la planta *Galega officinalis*, es el principio activo a través del cual se sintetiza la metformina, que activa a la AMPK al disminuir la producción de ATP tras la inhibición del complejo I (Grahame Hardie, 2016). Otro compuesto natural inhibidor del complejo I es la berberina y se ha demostrado que aumenta la activación de la AMPK y protege frente a la apoptosis de podocitos en condiciones de hiperglucemia (Jin et al., 2017). Además, la berberina aumenta la expresión de los receptores de adiponectina en el riñón, incrementa la actividad de la AMPK, mejora la sensibilidad a la insulina y protege la función renal en ratones alimentados con una dieta alta en grasas (Wu U, 2015). El resveratrol es un polifenol presente en las uvas que inhibe la ATP sintasa o el complejo V de la cadena de transporte electrónico y se ha demostrado, que activa a la AMPK y es capaz de atenuar la fibrosis renal en ratones *db/db* mediante la vía AMPK/Nox4/ROS (He et al., 2016).

1.3.3.3 Activadores indirectos de la AMPK

La metformina es un compuesto sintético derivado de la galegina, fármaco de primera línea para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Este medicamento activa indirectamente a la AMPK mediante la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

mitocondrial y el consiguiente aumento del ratio AMP/ATP (Kim et al., 2016; Lu et al., 2019). El principal sitio de acción de la metformina es el hígado, ya que este expresa altos niveles del transportador de cationes orgánicos OCT1 necesario para la absorción de la metformina. En el hígado, este fármaco inhibe la producción de glucosa hepática por un mecanismo independiente de la AMPK como se ha mostrado en ratones *knock out* para las isoformas α_1 y α_2 de AMPK, sin embargo, sus efectos sobre la mejora de la sensibilidad a la insulina e hipolipemiantes están mediados por la inactivación de la ACC por AMPK en hepatocitos (Fullerton et al., 2013; Zhou et al., 2001). Se ha demostrado que en el corazón, la activación de la AMPK por metformina después de un episodio de isquemia/reperfusión, aumenta la actividad de la AMPK por fosforilación en el residuo Thr¹⁷², incrementando la fosforilación de la eNOS y la biodisponibilidad del NO (Calvert et al., 2008). En el riñón, la metformina ha mostrado efectos protectores sobre la función renal en modelos animales y pacientes con nefropatía diabética o ERC asociada a otras enfermedades metabólicas. La metformina entra en las células renales a través del transportador OCT2 y activa a la AMPK de forma indirecta por el aumento del AMP derivada de la inhibición del complejo I mitocondrial; la activación de la AMPK en el riñón tiene numerosos beneficios como se ha descrito anteriormente (Corremans et al., 2019; Ravindran et al., 2017). Por otro lado, las tiazolidinedionas son una familia de antidiabéticos que ejercen sus acciones hipoglucemiantes mediante la activación de PPAR γ y de la AMPK. La AMPK se activa por la inhibición del complejo I mitocondrial y por acción de la adiponectina, cuya liberación desde los adipocitos aumentan tras la acción de las tiazolidinedionas, aumentando la captación de glucosa y la oxidación de AG en el músculo esquelético y el hígado (LeBrasseur et al., 2006). Otra familia de fármacos, las estatinas, ampliamente utilizadas en el tratamiento de la hipercolesterolemia ejercen parte de sus efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular a través de la inhibición de la HMG-CoA y de la activación de la AMPK. Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado como las estatinas ejercen sus efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular al aumentar la fosforilación de la AMPK, aumentando la activación de la eNOS y la biodisponibilidad del NO (Sun et al., 2006). A nivel renal, las estatinas han mostrado su capacidad para mejorar la función renal en ratas *Zucker* obesas, al reducir el estrés oxidativo, la inflamación, la fibrosis renal y la albuminuria (Reisin et al., 2009), aunque los mecanismos exactos no se han estudiado se especula que la activación de la AMPK esté implicada en efectos renoprotectores de las estatinas.

1.3.3.4 Activadores directos de la AMPK

En los últimos años se han desarrollado activadores directos de AMPK que se unen de forma selectiva a subunidades específicas de la AMPK produciendo un cambio de conformación en el complejo y su activación sin producir cambios significativos en los niveles de AMP o ATP, sin embargo, algunos de estos compuestos pueden tener efectos secundarios y una potencia y una selectividad limitadas. Uno de ellos, el AICAR (ribósido de 5-aminoimidazol-4-carboxamida) es un profármaco que se convierte en un análogo del AMP (ZMP) dentro de las células para unirse a la subunidad AMPK γ (Grahame Hardie, 2016). El ZMP como activador de la AMPK es mucho menos potente que el propio AMP, sin embargo, se acumula en las células en concentraciones milimolares por lo que activa a la AMPK en la mayoría de las células (Kim et al., 2016). El AICAR es uno de los primeros activadores de la AMPK y a pesar de sus efectos en la mejora de la tolerancia a la glucosa y la reducción de AG circulantes, es un fármaco con baja biodisponibilidad oral. Otra limitación de uso es que el AICAR es capaz de activar otras enzimas dependientes de AMP como la fructosa-1,6-bisfosfatasa (Kim et al., 2016). El AICAR produce vasodilatación en la aorta a través de la activación de la subunidad AMPK α_1 (Goirand et al., 2007), reduce de manera significativa la presión arterial y produce relajación en arterias de resistencia mesentéricas de ratas hipertensas (Ford et al., 2012), sin embargo, causa bradicardia cuando se administra por vía intravenosa, lo que lo hace inadecuado para uso clínico (Young et al., 2005). Por otro lado, la tienopiridina o A769662, es un activador alostérico selectivo que se une específicamente a la subunidad β_1 de la AMPK aumentando así la actividad quinasa de la subunidad catalítica α_1 , y también a su vez protegiendo contra la desfosforilación del residuo Thr¹⁷² (Grahame Hardie, 2016; Kim et al., 2016; Ross et al., 2016; Sanders MJ, 2007; Scott JW, 2008). El A769662 tiene poca biodisponibilidad por vía oral, sin embargo, se ha demostrado que su administración por vía intraperitoneal en ratones *ob/ob* reduce los niveles de glucosa y triglicéridos en plasma y reduce el peso corporal (Cool et al., 2006). El A769662 es un activador farmacológico potente y específico de la AMPK y una valiosa herramienta experimental para estudiar las funciones fisiológicas de la AMPK (Göransson et al., 2007). La síntesis de nuevos compuestos como MT63-78 y PF-249 interactúan con el sitio ADaM (allosteric drug and metabolite), ubicado entre el dominio quinasa de la subunidad α y el CBM de la subunidad β , y activan alostéricamente los trímeros de AMPK que contienen las subunidades β_1 and β_2 (Cokorinos et al., 2017; Myers et al.,

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2017); con respecto al potencial terapéutico protector a nivel cardiovascular de estos agentes, se ha descrito que producen efectos secundarios como hipertrofia cardíaca y la acumulación de glucógeno (Myers et al., 2017). El PF-249 tiene una elevada biodisponibilidad por vía oral y se ha demostrado que mejora significativamente la función renal en un modelo de ratas con nefropatía diabética, poniendo de manifiesto el potencial terapéutico de los activadores de la subunidad AMPK β_1 en enfermedades renales (Salatto et al., 2017). Por otro lado, recientemente se ha identificado un nuevo activador pan-AMPK denominado O304 y se ha demostrado que aumenta la actividad de la AMPK al suprimir la desfosforilación del residuo Thr¹⁷² mediada por PP2C (Steneberg et al., 2018). Este compuesto no solo reduce la glucosa plasmática y mejora la resistencia a la insulina, sino que también mejora la perfusión microvascular y la presión arterial tanto en ratones obesos como en pacientes diabéticos tipo II, lo que sugiere un gran potencial terapéutico como fármaco antidiabético debido a sus beneficiosos efectos metabólicos y vasculares. Se necesitan más estudios para dilucidar los mecanismos subyacentes de estos nuevos compuestos y determinar si son prometedores para uso clínico en el futuro.



2. REVIEW

AMPK, metabolism, and vascular function

Claudia Rodríguez , Mercedes Muñoz , Cristina Contreras  and Dolores Prieto 

Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid, Spain

Keywords

AMPK; endothelium; inflammation; ischemia/reperfusion; metabolism; mitochondria; reactive oxygen species; vascular smooth muscle

Correspondence

D. Prieto, Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain

Tel: +00 34 913947193

E-mail: dprieto@ucm.es

Cristina Contreras and Dolores Prieto contributed equally to this article.

(Received 30 November 2020, revised 4

March 2021, accepted 4 April 2021)

doi:10.1111/febs.15863

Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) is a cellular energy sensor activated during energy stress that plays a key role in maintaining energy homeostasis. This ubiquitous signaling pathway has been implicated in multiple functions including mitochondrial biogenesis, redox regulation, cell growth and proliferation, cell autophagy and inflammation. The protective role of AMPK in cardiovascular function and the involvement of dysfunctional AMPK in the pathogenesis of cardiovascular disease have been highlighted in recent years. In this review, we summarize and discuss the role of AMPK in the regulation of blood flow in response to metabolic demand and the basis of the AMPK physiological anticontractile, antioxidant, anti-inflammatory, and antiatherogenic actions in the vascular system. Investigations by others and us have demonstrated the key role of vascular AMPK in the regulation of endothelial function, redox homeostasis, and inflammation, in addition to its protective role in the hypoxia and ischemia/reperfusion injury. The pathophysiological implications of AMPK involvement in vascular function with regard to the vascular complications of metabolic disease and the therapeutic potential of AMPK activators are also discussed.

Abbreviations

ACC, acetyl-CoA carboxylase; AICAR, 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside; AMPK, AMP-activated protein kinase; AMPKK, AMPK kinases; BH4, tetrahydrobiopterin; BKCa, large conductance calcium-activated potassium channel; CaMKK, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases; CPA, cyclopiazonic acid; CPT1, carnitine palmitoyltransferase 1; EC, endothelial cell; EDH, endothelium-dependent hyperpolarization; EDHF, endothelium-dependent hyperpolarizing factor; eEF2, eukaryotic elongation factor 2; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; ER, endoplasmic reticulum; ETC, electron transport chain; FAs, fatty acids; FAO, fatty acid oxidation; FFAs, free fatty acids; FOXO, forkhead transcription factor; GLUT, glucose transporter; GP, glycogen phosphatase; GTPCH, GTP-cyclohydrolase I; Hsp90, heat-shock protein 90; I/R, ischemia/reperfusion; ICAM-1, intracellular adhesion molecule 1; IFN γ , interferon gamma; IKCa channel, intermediate-conductance calcium-activated K⁺ channel; IKK, I κ B kinase; JAK, janus kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase; KATP, ATP-sensitive potassium channel; KSR2, kinase suppressor of Ras 2; LKB1, tumor suppressor liver kinase B1; LPS, lipopolysaccharide; MLC, myosin light chain; MLCK, myosin light-chain kinase; MnSOD, manganese superoxide dismutase; mTORC1, mammalian target of rapamycin complex 1; MYPT1, myosin phosphatase targeting subunit 1; NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells; NO, nitric oxide; Nox, NADPH oxidase enzymes; Nrf2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2; ONOO⁻, peroxynitrite; PGC1 α , peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α ; PGs, prostaglandins; Phe, phenylephrine; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKA, protein kinase A; PKB, protein kinase B or Akt; PKC, protein kinase C; PP, protein phosphatase; PP2A, protein phosphatase 2A; PP2C α , protein phosphatase 2C α ; ROS, reactive oxygen species; RS, reticulum sarcoplasmic; SERCA, sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase; SOD, superoxide dismutase; SR, sarcoplasmic reticulum; STAT-1, signal transducer and activator of transcription 1; TAG, triacylglyceride; TAK1, tumor growth factor (TGF) β kinase 1; TNF α , tumor necrosis factor alpha; Trx, thioredoxin; TSC, tuberous sclerosis complex; TXNIP, thioredoxin-interacting protein; UCP2, uncoupling protein 2; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1; VEGF, vascular endothelial growth factor; VOC, voltage-operated Ca²⁺ channels; VSM, vascular smooth muscle; VSMCs, vascular smooth muscle cells.

AMPK, a key regulator of energy metabolism and mitochondrial homeostasis

All living cells use energy from the environment for vital processes such as growth, reproduction, and development. Animal cells extract energy from biomolecules through respiration, which consumes O_2 and produces CO_2 and H_2O . When they take more energy than they require for immediate use, the excess energy is stored in chemical bonds, primarily as glycogen and lipids [1,2]. Adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) is a main sensor of the cellular energy status. AMPK is activated in response to energy deficiency when the AMP/ATP ratio is increased and restores energy balance by inhibiting anabolism that consumes ATP, while promoting catabolic processes that generate ATP. Several conditions favor depletion of energy levels, such as hypoxia, exposure to mitochondrial respiration toxic agents, and nutrient starvation [3].

AMPK is a heterotrimeric serine/threonine protein kinase complex ubiquitously expressed, consisting of a catalytic α subunit (α_1 and α_2) and two regulatory subunits namely β (β_1 and β_2) and γ (γ_1 , γ_2 , and γ_3). There are multiple AMPK isoforms composed of one α -subunit, one β -subunit, and one γ -subunit, in any of their possible combinations, that are differentially expressed and regulated throughout the human body [4]. AMP and AMP mimetic small molecules are direct activators of AMPK that trigger a conformational change in the AMPK complex leading to phosphorylation of Thr¹⁷² in the AMPK α subunit [5–7]. Besides its key role as a gauge energy sensor, AMPK is involved in the regulation of several other cell processes such as apoptosis, cell growth and differentiation, cell polarity, autophagy, immune function, and inflammation [3,8,9].

Regulation of AMPK activity

AMPK is activated by three mechanisms sensitive to small changes in the AMP/ATP ratio: phosphorylation at the Thr¹⁷² residue of the AMPK α catalytic subunit by upstream protein kinases, dephosphorylation by upstream protein phosphatases (PP), and then allosteric activation by AMP or/and ATP [10]. Under conditions of energy deficit, the Thr¹⁷² residue is phosphorylated mainly by two distinct upstream kinases: the tumor suppressor liver kinase B1 (LKB1) and the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase 2 (CaMKK2 or CaMKK β) [11–16]. LKB1 is constitutively active and a key element in the mechanism by

which AMPK senses the energy status of the cell. LKB1 activates AMPK in response to energy depletion which is modulated by AMP or ADP binding to the AMPK- γ subunit, especially in metabolic tissues such as muscle, adipose tissue, and liver [12,16].

CaMKK2 is activated by increases in intracellular Ca^{2+} which occurs in response to many hormones in specific cell types such as neurons or endothelial cells (ECs) [10,14,15,17,18] (Fig. 1). In contrast to upstream kinases, PP dephosphorylates the Thr¹⁷² residue on the AMPK α catalytic subunit. To sense cell energy status, AMPK primarily monitors the AMP: ATP ratio and is activated by AMP binding by three mechanisms that are complementary and antagonized by ATP: increasing the rate of AMPK phosphorylation at Thr¹⁷² by LKB1, suppressing dephosphorylation of p-Thr¹⁷² AMPK α by PPs and by allosteric activation increasing the activity of AMPK already phosphorylated on Thr¹⁷² [7,10,14,15,17]. AMPK can also be regulated by inhibition through an ubiquitination mechanism mediated by the formation of a complex between the AMPK β subunit and several factors such as the cell death-inducing DNA fragmentation factor α -like effector, or E3 ubiquitin ligases such as MG53, CRBN/CRL, among others, which induces AMPK degradation [19,20]

Role of AMPK in metabolism: downstream pathways

Lipid metabolism

The regulation of lipid metabolism is the first known function of AMPK. AMPK inhibits *the novo* synthesis of fatty acids (FAs), cholesterol, and triacylglycerides (TAG), while it activates FAs uptake by the cell and lipid oxidation pathways. Thus, in response to several cell stressors, AMPK is phosphorylated at Thr¹⁷² that induces acyl CoA-carboxylase (ACC) phosphorylation, thus inhibiting ACC activity as rate-limiting step in FAs synthesis that converts acetyl-CoA to malonyl-CoA. A second mechanism by which AMPK inhibits lipid synthesis is by inhibition of sterol regulatory element-binding protein 1c, transcriptional factor of enzymes involved in lipid synthesis such as ACC and FA synthase [17,21]. Furthermore, AMPK inhibits phosphorylation of the cholesterol synthesis rate-limiting enzyme 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase [22], thus reducing cholesterol *the novo* synthesis (Fig. 1). Finally, AMPK inhibits the enzyme glycerol-3-phosphate acyltransferase, involved in the synthesis of TAGs, thus avoiding lipid storage [23].

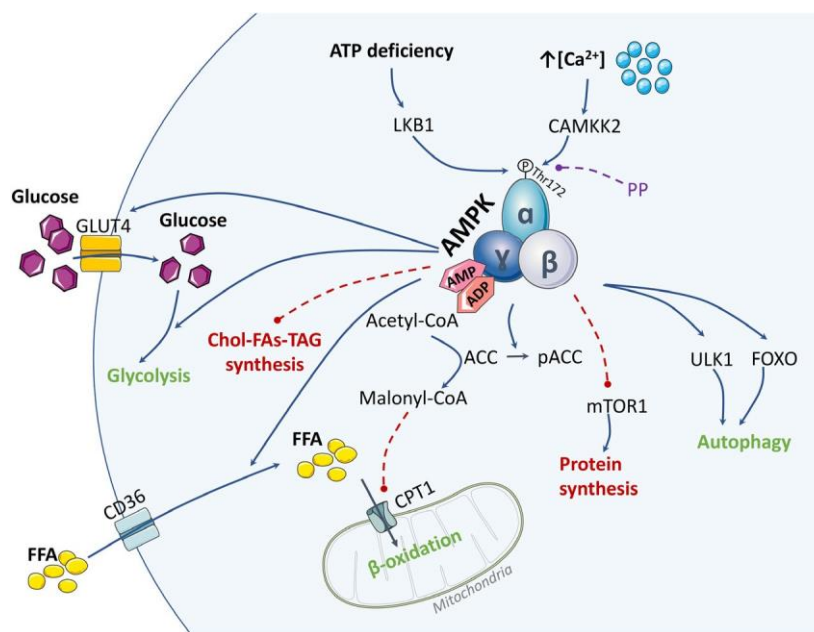


Fig. 1. AMPK signaling pathways. AMPK is a trimeric protein formed by subunits α , β , and γ . During energy starvation (ATP deficiency), AMP or ADP bind to AMPK leading to its activation through phosphorylation at Thr172 by AMPK kinases (AMPKK) as LKB1. Increased intracellular calcium levels stimulate CAMKK2 that also phosphorylates AMPK. Other factors inhibit AMPK, such as a PP that reduces AMPK activity by dephosphorylation. AMPK activation restores the energy status through activation of catabolic pathways. First, AMPK stimulates phosphorylation of ACC, preventing transformation of acetyl-CoA to malonyl-CoA which inhibits free FAs (FFA) mitochondrial uptake by CPT1. Consequently, AMPK activation favors FFA mitochondrial uptake to get energy through β -oxidation. AMPK also stimulates FFA cell uptake by the transporter CD36 to supply mitochondrial β -oxidation. Furthermore, AMPK activity inhibits lipid anabolic pathways, preventing synthesis of cholesterol, FFA, and TAG. Second, AMPK activation increases glucose cell uptake into the cell by GLUT4 and stimulates enzymes involved in glycolysis. Third, AMPK activation inhibits the mammalian target of rapamycin 1 (mTOR1) thus preventing protein synthesis. Forth, AMPK activation favors autophagy mainly through the autophagy-related protein ULK1 and forkhead family of transcription factor (FOXO) signaling pathways. (Green color: processes stimulated by AMPK activation, mainly catabolic pathways such as glycolysis, β -oxidation, autophagy. Red color: processes inhibited by AMPK activation, mainly anabolic pathways, such as lipid and protein synthesis).

In addition to inhibiting lipid anabolism, AMPK stimulates lipid catabolic pathways by facilitating FAs uptake and FAs mitochondrial β -oxidation (FAO). By inducing the activity of the FAs transporter CD36, AMPK facilitates FAs uptake through the cell membrane into the cytosol [24]. Moreover, by phosphorylating and inhibiting ACC, AMPK reduces malonyl-CoA levels; malonyl-CoA in turn inhibits carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) that favors movement of FAs from the cytosol into the intermembrane space of mitochondria to be oxidized, thus resulting in AMPK indirectly facilitating FAs uptake into the mitochondria and FAO [25,26].

Glucose metabolism

As an energy sensor, AMPK favors glucidic catabolic pathways in different organs. AMPK facilitates skeletal muscle glucose uptake by increasing the expression

of the glucose transporter 4 (GLUT4), as well as its translocation to the plasma membrane [27,28]. Once glucose is inside the cells, AMPK facilitates its use as an energy source by stimulating enzymes involved in the glycolysis (Fig. 1), as demonstrated in cardiomyocytes, macrophages, and tumor cells [29,30]. AMPK also favors glycogenolysis by activating glycogen phosphorylase (GP) while inhibits glycogen synthase thus preventing glycogen synthesis in skeletal muscle cells. Mutations in the γ_2 and γ_3 -AMPK subunits lead to abnormal glycogen storage associated with arrhythmias and hypertrophic cardiomyopathy in human heart [31–34] and also to elevated glycogen levels in skeletal muscle [35]. In addition, AMPK inhibits hepatic gluconeogenesis, essential for maintenance of plasma glucose levels during fasting, by decreasing expression of enzymes such as phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase [36]. On the other hand, AMPK ensures both normal β -cell glucose

sensing and glucose-stimulated insulin secretion, and reduced AMPK activity has been associated with β -cell dysfunction in diet-induced obese rodents, which increases the therapeutic potential of AMPK activators as antidiabetic drugs [37].

Protein metabolism

AMPK promotes protein catabolism. The tuberous sclerosis complex (TSC)1/2 integrates environmental signals including energy status stressors. Thus, under conditions of energy deficit AMPK is activated and is responsible for inhibition of protein synthesis to keep ATP levels in the cell through phosphorylation of TSC2, which inhibits mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and subsequently the ribosomal protein S6 kinase beta-1 (p70S6K), resulting in the prevented translation of ribosomal proteins [38]. AMPK has also been reported to inhibit mTORC1 through phosphorylation of RAPTOR [39]. Other studies have shown that AMPK directly inhibits translational protein elongation by phosphorylating and activating the eukaryotic elongation factor 2 kinase, resulting in the inhibition of protein synthesis [40] (Fig. 1). However, under conditions of energy depletion AMPK activation can favor the synthesis of various proteins essential for cell survival [41].

Role of AMPK in autophagy and mitochondrial biogenesis

Autophagy is a physiological regulated cell mechanism that removes and reuses unnecessary/dysfunctional cell components through degradation and recycling. Thus, autophagy consists in the self-digestion through lysosome-dependent processes to maintain cellular integrity mainly during starvation [41,42]. Autophagy-related genes codify the proteins responsible for autophagy, mainly ULK1 in mammals, a serine/threonine-protein kinase considered as an initiator in the autophagic cascade that activates phosphorylated phosphoinositide 3-kinase (pPI3K) to regulate the formation of autophagosomes. AMPK is involved in the regulation of autophagy, since AMPK can directly activate autophagy through ULK1 phosphorylation and indirectly through mTORC1 inhibition, since mTORC1 exerts an inhibitory phosphorylation on ULK1, preventing autophagy [43]. AMPK can also activate forkhead family of transcription factor (FOXO) thus favoring upregulation of several autophagy inducers [44]. Autophagy is mainly regulated by feedback regulatory loops. Thus, mTORC1 inhibits ULK1 activity and ULK1 negatively regulates mTORC1 [45,46].

Likewise, AMPK activates ULK1 favoring autophagy, while ULK1 negatively regulates AMPK [47]. The coordinated effects of mTORC1 and ULK1 prevent mitochondrial damage thus preserving mitochondrial integrity during nutrient deficiency states in which AMPK is closely involved [45,46].

Autophagy processes are essential for the proper functioning of mitochondria, the main organelle in charge of energy production through mitochondrial respiration. Mitochondrial integrity requires elimination of damaged mitochondria through autophagy and the production of fresh mitochondria through biogenesis. Therefore, mitochondrial biogenesis is a crucial process of energy production and cellular response during nutrient starvation. Several studies have demonstrated that chronic treatment with AMPK activators such as 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside (AICAR) or β -guanidionapropionate can stimulate mitochondrial biogenesis, and this effect disappears in mice lacking AMPK [48–51] suggesting that AMPK plays a key role in the regulation of mitochondrial biogenesis. Accordingly, genetic and pharmacological evidence reveals the importance of AMPK in mitochondrial biogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC1 α), an important cofactor which favors transcription of genes involved in mitochondrial biogenesis [52]. Accordingly, the stimulatory effect of AMPK on PGC1 α is reduced in mice lacking AMPK [51]. Several mechanisms have been proposed through which AMPK can upregulate PGC1 α . First, through activation of SIRT1, a nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺)-dependent protein/histone deacetylase sirtuin, which in turn activates AMPK by deacetylating LKB1, thus suggesting a positive feedback loop between AMPK and SIRT1 [53–56]. Moreover, AMPK can activate PGC1 α by increasing nicotinamide phosphoribosyltransferase which favors NAD⁺/NADH ratio or through upregulation of FAO or p38-MAPK [57].

Role of AMPK in vasculature

The cardiovascular system has mechanisms responsible for coupling blood flow and organ perfusion in response to tissue metabolic demand. AMPK regulates vascular function and structure in EC, vascular smooth muscle cells (VSMCs), and immune cells, and it is activated by harmful stimuli including oxidative stress, ischemia, and hypoxia to restore vascular homeostasis [58–62]. In the vasculature, each AMPK iso-form is layer-specific: α_1 and α_2 AMPK subunits are expressed in both endothelium and VSM, α_1 -subunit

being the most predominant isoform. VSM also expresses both β_1 and β_2 subunits, preferentially AMPK β_1 [63–67].

AMPK in endothelial cells: regulation and activation mechanisms

Activity of AMPK in ECs can be regulated by various stimuli including low ATP levels, as occurs in hypoxia, ischemia or nutrient deprivation conditions, shear stress, exercise, elevation of intracellular calcium by agonists and hormones such as adiponectin, angiotensin II and ghrelin and by pharmacological activators [64], as illustrated in Fig. 2. Endothelial AMPK is

activated by LKB1, that is upregulated in AMP-rising physiological and pathological conditions [11–13], and also by CaMKK2 in response to increases in intracellular Ca²⁺ levels produced by endothelial agonists such as thrombin, bradykinin, or histamine in an AMP-independent manner [68,69] or by vascular endothelial growth factor (VEGF) [70]. Concerning AMPK regulation by PP in ECs, although protein phosphatase 2C α (PP2C α) is the most accepted isoform that dephosphorylates the Thr¹⁷² residue on the AMPK α catalytic subunit in several tissues, it is hardly expressed in human ECs and VSMCs [71]. In contrast, protein phosphatase 2A (PP2A) is abundantly expressed in ECs wherein it inactivates endothelial nitric oxide

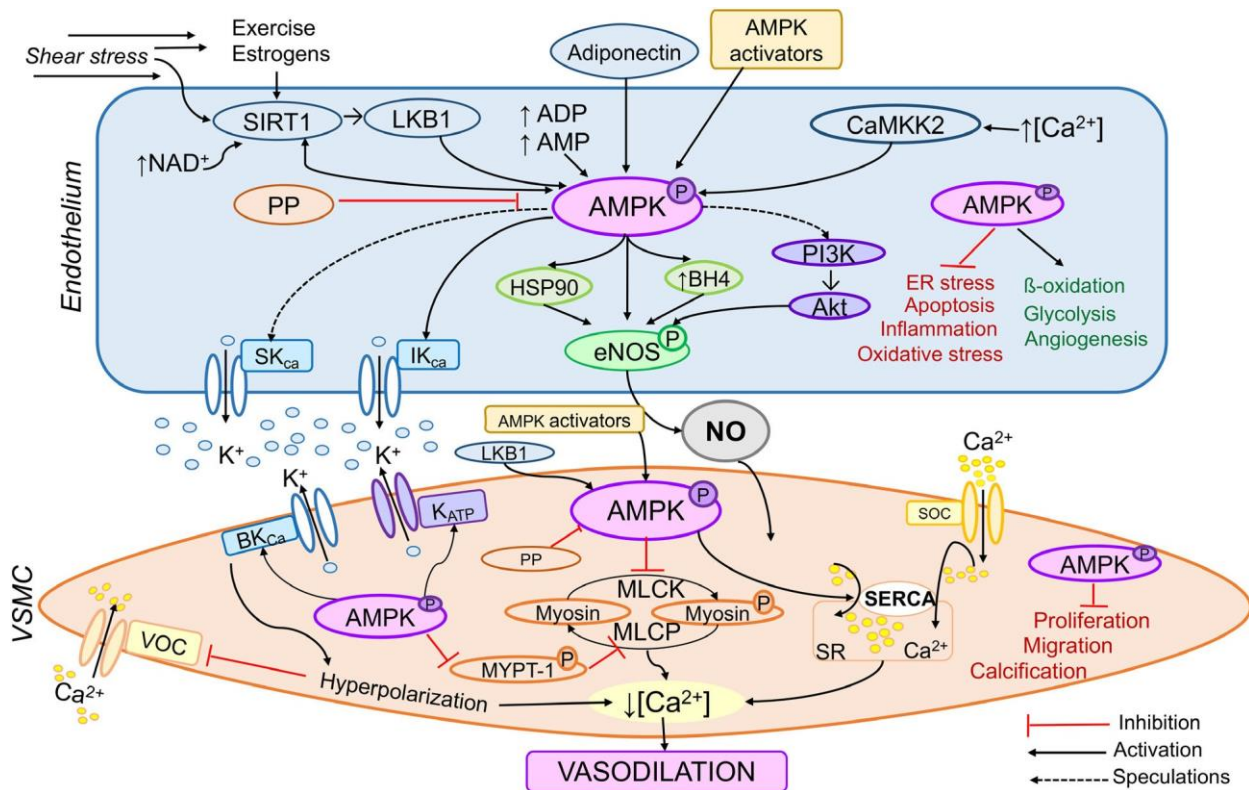


Fig. 2. AMPK in the vasculature: activation mechanisms of AMPK and main targets in endothelium and VSMCs. Endothelial AMPK can be activated by upstream AMPKK such as LKB1 and CaMKK2, hormones such as adiponectin, pharmacological activators (metformin, AICAR, A769662), as well as the energy-sensing molecule, SIRT1. In contrast, PP dephosphorylates and inactivates AMPK. AMPK activation leads to phosphorylation and activation of eNOS, increase in BH4 levels and Hsp90 association with eNOS, which results in NO production. Another eNOS stimulation mechanism by AMPK is through AMPK–PI3K–Akt pathway. AMPK is also involved in EDH-mediated relaxation of resistance arteries through activation of endothelial KCa channels. Activation of endothelial AMPK inhibits oxidative stress, inflammation, ER stress, and apoptosis, and also activates endothelial metabolism by upregulation of β -oxidation of FFAs and glycolysis and promotes angiogenesis. In VSMCs, AMPK can be activated by LKB1 and pharmacological activators that induce relaxation through endothelium-independent mechanisms. AMPK directly relaxes VSM by Ca²⁺-lowering mechanisms, increasing SERCA activity, activation of KATP and BKCa channels resulting in hyperpolarization and inhibition of Ca²⁺ entry through VOC channels. AMPK activation can directly interfere with VSM contractile machinery and induce VSM relaxation by decreasing VSM Ca²⁺ sensitivity through inhibition of MLCK and phosphorylation of MYPT1. In addition to its role in VSM relaxation, AMPK exerts antiproliferative, antimigratory actions and inhibits vascular calcification (straight black line: processes stimulated by AMPK activation; straight red line: processes inhibited by AMPK activation; discontinuous lines: speculation).

synthase (eNOS) by dephosphorylation of Ser¹¹⁷⁷ [67,72]. Chronic activation of PP2A under pathological conditions triggers AMPK inactivation which results in endothelial dysfunction [67]. On the other hand, acute exercise has been reported to induce SIRT1-LKB1 cascade to activate AMPK and eNOS [73].

Endothelium is constantly exposed to shear stress, an important physiological stimulus to maintain and modulate vascular tone. Laminar blood flow enhances NO production by phosphorylation of eNOS and AMPK is one of the protein kinases implicated in this process along with the PI3K/Akt pathway [74–76]. Shear stress activates LKB1-AMPK signaling cascade in endothelium to activate eNOS through phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷ thus increasing bioavailability of NO and vasodilatation [77]. Other studies suggest that SIRT1 is activated in response to shear stress independently of AMPK but both act synergistically on eNOS to increase NO bioavailability [78]. Furthermore, there is evidence that NO itself can activate AMPK α_2 in ECs [79].

An important physiological activator of AMPK in ECs is adiponectin, an adipokine that exerts cardioprotective actions in part through activation of AMPK and eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷. Hypoadiponectinemia has been associated with endothelial dysfunction and insulin resistance in metabolic and cardiovascular diseases [80]. The mechanism by which adiponectin stimulates AMPK has been studied by different research groups, suggesting that adiponectin binds to its receptor (adipoR1) and activates adaptor protein-phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper (APPL1)-LKB1-AMPK-eNOS pathway [81–83]. Other authors reported that adiponectin stimulates eNOS through AMPK/PI3K/Akt pathway [84,85]. Another reported mechanism of AMPK activation in ECs is through peroxynitrite (ONOO⁻) formation by the reaction of O₂^{•-} and NO, which activates protein kinase C ζ and leads to activation of LKB1 and subsequent AMPK phosphorylation [86]. Moreover, estrogens have been identified as activators of AMPK and eNOS in human ECs via CaMKK2 [87] and via SIRT1, since treatment with 17 β -estradiol upregulates the expression of SIRT1 and increases production of NO, protecting against endothelial dysfunction in ovariectomized rats [88,89].

Pharmacological activation of vascular AMPK

Besides its physiological regulation, activation of vascular AMPK can be achieved by direct or indirect pharmacological approaches. In fact, the cardiovascular protective effects of many antidiabetic drugs

traditionally used in the treatment of metabolic diseases such as statins, metformin, and thiazolidinediones involve AMPK activation [58–67]. Thus, metformin indirectly activates AMPK through inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain and subsequent increase in the AMP/ATP ratio [90,91]. In the heart, metformin-induced AMPK activation following ischemia/reperfusion (I/R) enhanced AMPK activity by phosphorylation at the Thr¹⁷² residue, upregulated eNOS phosphorylation, and increased NO bioavailability [92]. Direct AMPK activators have been developed to selectively bind AMPK-specific subunit isoforms independently on AMP or ATP levels, although some of these compounds may have off-side target effects in vascular tissues and limited potency and selectivity. AICAR is a pro-drug that

is converted into the AMP analog ZMP inside cells to bind AMPK γ subunit [93], while the thienopyridine A769662 is a selective allosteric activator that preferentially binds the AMPK β_1 subunit and increases activity of the α_1 catalytic subunit by protecting against Thr¹⁷² dephosphorylation [7,90,93–95]. AICAR is a vasodilator in aorta through AMPK α_1 subunit activation [65] and acutely lowers blood pressure and relaxes mesenteric resistance arteries of hypertensive rats [96] but it causes bradycardia when administered intravenously which makes it unsuitable for clinical use [97]. A769662 has been reported to be 3 orders of magnitude more potent than AICAR as *in vitro* vasodilator of resistance arteries, its vasorelaxant effects in intrarenal arteries being associated with phosphorylation of the AMPK α_1 subunit at Thr¹⁷² and phosphorylation of the AMPK downstream target ACC, thus supporting the specificity of A769662 vascular action and linking AMPK vasoactive and metabolic actions in the arterial wall [65,66,98,99]. New synthetic compounds such as MT63-78 and PF-249 interact with the allosteric drug and metabolite (ADaM) site located between AMPK α and β subunits and allosterically activate both β_1 - and β_2 -containing AMPK trimers [100,101]; concerning cardiovascular protective therapeutic potential of these agents, cardiac hypertrophy and glycogen accumulation have been reported as off-side target effects [101]. On the other hand, the novel pan-AMPK activator O304 has recently been shown to increase AMPK activity by suppressing PP2C-mediated dephosphorylation of the Thr¹⁷² residue in human recombinant AMPK and trimers [102]. This compound not only reduced plasma glucose and ameliorated insulin resistance but also improved microvascular perfusion and blood pressure in both obese mice and type II diabetic patients, which suggests a great therapeutic potential as antidiabetic drug due to its beneficial

metabolic and vascular effects. Further studies are needed to elucidate the mechanisms underlying the vascular actions of these new agents.

Endothelial AMPK: main targets and physiological actions

Endothelium is the key modulator of vascular tone and tissue perfusion and releases vasoactive factors in response to different stimuli; as a metabolic sensor, vascular AMPK has been proposed to be involved in coupling blood flow to energy demand. Conduit arteries are more dependent on NO than resistance arteries. As the diameter of the artery becomes smaller, endothelium-derived hyperpolarization (EDH) turns into the dominant endothelium-dependent vasodilator mechanism, regulating peripheral resistance and blood pressure [89,103,104].

Endothelial NOS is the major source of vasodilator NO and is activated by AMPK through different mechanisms (Fig. 2): (a) phosphorylation of eNOS at Ser¹¹⁷⁷ or Ser⁶³³, as depicted from the increased eNOS Ser¹¹⁷⁷ and/or Ser⁶³³ phosphorylation concomitant with increased Thr¹⁷² pAMPK and AMPK activity found in human ECs or intact arteries in response to various stimuli including shear stress, adiponectin, or pharmacological activators [58–61,99]; (b) suppression of GTP-cyclohydrolase I (GTPCH) degradation and the subsequent increase in tetrahydrobiopterin (BH4) levels, supported by the reduced levels of GTPCH I and BH4 in aortas from the AMPK α_2 ^(-/-) mice [105]; (c) increase in heat-shock protein 90 (Hsp90) association with eNOS, as demonstrated by the augmented eNOS Ser¹¹⁷⁹ phosphorylation, NO bioactivity, and coimmunoprecipitation of eNOS with hsp90 induced by AICAR and metformin in wild-type C57BL6 mice but not in AMPK α_1 knockout mice [106]. On the other hand, several studies have shown that activation of AMPK can phosphorylate eNOS at the inhibitory Thr⁴⁹⁵ site, inactivating eNOS and reducing NO production, these effects being attenuated by specific endothelial AMPK α_1 deletion [107,108]. AMPK-induced cardiovascular effects by phosphorylation of eNOS were first reported by Chen *et al* [109] in the heart. In this study, eNOS was shown to be activated in high calcium conditions with Ca²⁺-calmodulin presence by AMPK phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷ and, in contrast, to be inhibited in low calcium conditions by AMPK phosphorylation at Thr⁴⁹⁵ site. As mentioned above, physiological stimuli such as adiponectin [110] or leptin [111], acute exercise [112], shear stress [77] and antidiabetic drugs such as metformin [113] and rosiglitazone [114] increase endothelial NO production

through AMPK activation and eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷.

AMPK activation has also been implicated in the EDH-mediated relaxations of resistance arteries and in the regulation of blood pressure in mice *in vivo*, since this EDH-type vasodilator response is lost after specific knockout of the endothelial AMPK α_1 subunit [115]. However, other studies have contradictorily shown that activators of AMPK (AICAR and A769662) inhibit EDH-like relaxations, through blocking preferentially small conductance Ca²⁺-activated K⁺ (K_{Ca}) channels in mesenteric arteries [108]. In a recent study, our group first demonstrated that AMPK activation in kidney resistance arteries induced a potent renal vasodilation through endothelium-dependent mechanisms involving activation of both eNOS by eNOS Ser¹¹⁷⁷ phosphorylation concomitant with increased Thr¹⁷² pAMPK, and endothelial intermediate-conductance calcium-activated K⁺ channels, the latter inducing hyperpolarization of ECs that further spreads through myoendothelial gap junctions to the underlying VSM to reduce calcium and induce relaxation [99,116], as shown in Fig. 2. Further investigations are needed to elucidate the therapeutic potential of the AMPK-induced potentiation of EDH-relaxant responses in resistance arteries under pathological conditions of elevated blood pressure and/or endothelial dysfunction involving impaired NO bioavailability.

Besides its beneficial role in endothelium-dependent vasodilation, activation of endothelial AMPK has been implicated in the regulation of other important physiological functions (Fig. 2) such as reduction of oxidative stress and inflammation [117,118], promotion of angiogenesis [119], inhibition of apoptosis [120], suppression of endoplasmic reticulum (ER) stress [121,122], and regulation of endothelial metabolism by upregulation of β -oxidation of FAs, a major energy source in ECs, via an AMPK-ACC-malonyl-CoA-CPT1 mechanism [63,123,124].

AMPK in vascular smooth muscle: regulation and main targets

Vascular smooth muscle cells produce vasoconstriction or vasodilation in response to physiological or pathological stimuli. In blood vessel injury, VSM changes the contractile to a synthetic phenotype thus increasing proliferation and migration, a critical step for development of atherosclerosis [125]. As in the endothelium, AMPK α_1 and α_2 subunits are located in VSM, α_1 subunit being the most abundantly expressed isoform [66]. VSM also expresses both β_1 and β_2 subunits, predominantly β_1 -AMPK [65,66]. AMPK has been involved in

endothelium-independent vasodilation of both large and small arteries [65,66,98] and in the regulation of VSM proliferation and inflammation [126]. AMPK was initially reported to be activated by metabolic stress in arterial smooth muscle [66]. Acetylcholine [127] and reactive oxygen species (ROS) such as H_2O_2 [128] activate LKB1-AMPK pathway in VSM. On the other hand, a PP2A heterotrimer, PP2APp2r2d, has been shown to inhibit AMPK activity by dephosphorylating AMPK α at Thr172 in rat and human VSMCs [129,130].

Activation of AMPK α_1 by AICAR was demonstrated to induce a potent relaxation in mice aorta in an endothelium- and eNOS-independent manner [65]. It has been proposed that AMPK directly relaxes VSM by Ca^{2+} -lowering mechanisms, as shown in Fig. 2. Accordingly, our group has recently demonstrated that AMPK activation produces renal vasodilation by reducing VSM [Ca^{2+}]_i and to a lesser extent through Ca^{2+} -independent mechanisms by decreasing VSM Ca^{2+} sensitivity of the contractile machinery. Moreover, we also demonstrated that activation of AMPK by A769662 in renal resistance arteries increased sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} -ATPase (SERCA) activity in VSM, thus inducing Ca^{2+} sequestration to SR and producing endothelium-independent relaxations [99]. In other small arteries such as mesenteric arteries, A769662 was shown to activate SERCA by AMPK-dependent phosphorylation of phospholamban [98], thus supporting that SERCA stimulation by AMPK activation is a common mechanism to induce VSM-mediated relaxations in small arteries. In relation to endothelium-independent hyperpolarization of VSM, our group also demonstrated that vascular AMPK activation by A769662 induced a potent vasodilation through activation of VSM ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channels in renal resistance arteries [99], whereas other authors proposed that A769662 activates large conductance K_{Ca} (BK_{Ca}) channels in VSM of mesenteric resistance arteries, resulting in hyperpolarization (Fig. 2) [98].

On the other hand, AMPK activation can directly interfere with VSM contractile machinery and signaling to induce VSM relaxation through a Ca^{2+} -independent mechanism that decreases Ca^{2+} sensitivity [131-133]. This relaxing mechanism plays a key role when vasodilation is needed for prolonged periods without lowering cytosolic Ca^{2+} concentrations, such as occurs in hypoxia. Thus, AMPK activation by metformin decreased phenylephrine (Phe)-induced contraction in rat aortic rings and inhibited Phe-mediated myosin light-chain kinase (MLCK) phosphorylation of myosin light chains (p-MLC) in cultured rat VSMCs (Fig. 2) [132]. Other studies reported that AMPK

activation by AICAR in cultured human VSMCs abolished Phe-induced phosphorylation of myosin phosphatase targeting subunit 1 (MYPT1) and inhibited p-MLC (Fig. 2) [131]. AMPK activation by A769662 or PT-1 has also been shown to mediate Ca^{2+} desensitization of the contractile machinery and VSM relaxation through depolymerization of the actin cytoskeleton [133].

In addition to its role in VSM relaxation, AMPK exerts antiproliferative and antimigratory actions in VSMCs [58,134,135] and inhibits vascular calcification [136,137]. The fact that AMPK can have vascular endothelium-independent VSM-mediated vasorelaxant and antiproliferative effects confers an additional therapeutic potential to AMPK activators in the treatment of metabolic disease-associated vascular complications wherein endothelium dysfunction and impaired eNOS/NO signaling pathway compromise NO-mediated vasodilator, antiinflammatory, and antiproliferative actions [138].

AMPK and reactive oxygen species in the vasculature

Oxidative stress or excessive ROS production is a key pathogenic factor underlying endothelial and VSM dysfunction in cardiovascular diseases. Nevertheless, redox signaling plays a critical role in homeostasis and cell survival, and ROS such as the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), the hydroxyl radical ($OH^{\cdot-}$), or the cell-permeable nonradical H_2O_2 are produced in small amounts during normal cell function. ROS sources in the vascular wall include complex I and III of the mitochondria, NADPH oxidases (Nox), xanthine oxidase, and uncoupled eNOS. Reduction of molecular O_2 by Nox in complexes I and III of the mitochondria electron transport chain (ETC) during metabolic processes produces $O_2^{\cdot-}$, being the mitochondrial respiration a major source of ROS generation under basal physiological conditions. ROS production is counterbalanced and modulated by the cell antioxidant systems including superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, and peroxiredoxins, which block harmful effects of ROS [104,139-142].

The role of AMPK in redox homeostasis is well established. While ROS can regulate AMPK activity, AMPK in turn modulates antioxidant defense gene expression and ROS production in the vascular wall. In addition to its activation by changes in metabolic pathways and AMP/ATP ratio, AMPK can be directly or indirectly influenced by cellular redox status (Fig. 3). Thus, AMPK is directly activated by reversible oxidation of critical cysteine residues (Cys-299/Cys-303)

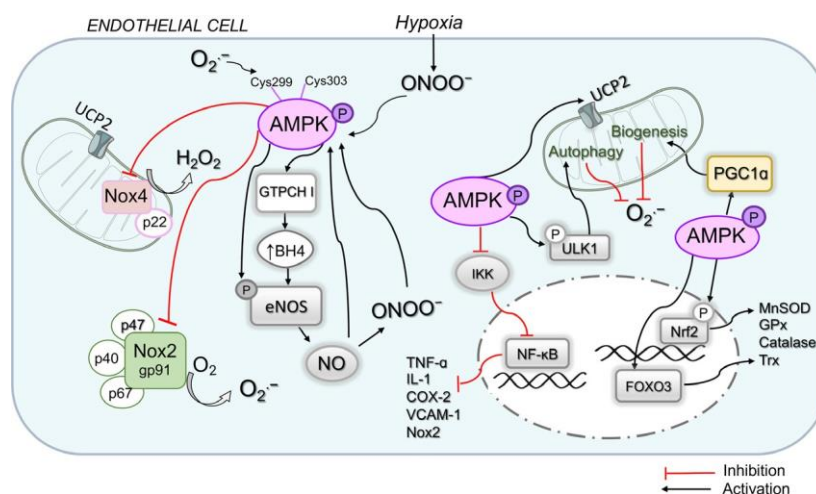


Fig. 3. Role of AMPK in redox homeostasis of ECs. AMPK activity can be regulated by direct oxidation of cysteine residues (Cys-299/Cys-303) and by ischemic signals, NO, and hypoxia through the formation of peroxynitrite ONOO⁻. AMPK in turn modulates antioxidant defense gene expression through transcription factors FOXO3 and Nrf2 and by promoting mitochondrial biogenesis through activation of the PGC1 α . AMPK downregulates oxidant production by increasing levels of GTPCH I and the synthesis of the eNOS cofactor BH₄, thus preventing eNOS uncoupling and O₂⁻ generation and by suppressing Nox2 and mitochondrial Nox4 ROS generating activity and expression, and by inhibiting activation of the redox-sensitive transcription factor NF- κ B. AMPK reduces mitochondrial ROS production by promoting biogenesis through activation of PGC1 α , by upregulating UCP2 and by regulating autophagy via by direct phosphorylation of the autophagy kinase ULK1.

in the AMPK α_1 catalytic subunit without ATP depletion [143]. However, changes in AMPK activity in response to redox variations have also been reported to be indirect and secondary to redox effects on mitochondrial ATP production [144]. In the vascular wall, AMPK is responsive to numerous oxidative stress and ischemic signals including NO, the potent oxidant peroxynitrite formed by interaction of NO and O₂⁻ and hypoxia. In bovine aortic ECs, peroxynitrite activated AMPK through phosphorylation at Thr¹⁷² [145], and mitochondrial ROS stimulated by berberine activated AMPK through peroxynitrite formation and AMPK α phosphorylation [146] (Fig. 3). In pulmonary arterial smooth muscle cells, hypoxia-induced ROS elevation increased AMPK activity independently of changes in AMP/ATP ratio, through intracellular Ca²⁺ release from ER and enhanced store-operated Ca²⁺ entry, activation of CaMKK β and AMPK α phosphorylation at Thr¹⁷², [147]. ROS generated within the mitochondrial ETC and not oxidative phosphorylation are involved in hypoxic activation of AMPK [148].

Elevated ROS levels produce energy stress and metabolic failure by oxidizing enzymes from the ETC, tricarboxylic acid cycle, and glycolysis [149]. AMPK functions as a redox sensor and its activation maintains redox status by inhibiting oxidant production or by increasing the antioxidant potential (Fig. 3).

In human ECs, activation of AMPK by AICAR inhibits palmitate-induced ROS elevation by upregulating expression of thioredoxin (Trx) through FOXO3 [150], and reduces hyperglycemia-induced increase in mitochondrial ROS by upregulating manganese SOD (MnSOD) and promoting mitochondrial biogenesis through activation of the AMPK-PGC1 α [151]. Silencing of AMPK α_1 in cultured human umbilical ECs reduces the expression of MnSOD, catalase, γ -glutamylcysteine synthase, and Trx genes [118]. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is an antioxidant transcription factor activated by ROS under both physiological and stress conditions and stimulates the expression of antioxidant genes as an adaptive response to oxidative stress [152]. AMPK positively regulates and directly phosphorylates Nrf2 at the Ser⁵⁵⁰ residue, which promotes nuclear accumulation of Nrf2 for antioxidant response element-driven gene transactivation [153].

Reduction of oxidant production by AMPK is mainly achieved through inhibition of Nox, uncoupled eNOS, and mitochondria-derived ROS [58,154] (Fig. 3). *In vivo* activation of AMPK in diabetic rats, or AMPK overexpression in ECs, normalized endothelial function and increased levels of GTP-cyclohydrolase (GTPCH I) and the synthesis of the essential eNOS cofactor BH₄, thus preventing eNOS uncoupling and superoxide generation [105].

NADPH oxidases from the Nox family primarily generate ROS and catalyze the conversion of O_2 into $O_2^{\cdot-}$ using NADPH as electron donor. Seven Nox homologues have been identified in the human genome based on the number of big transmembrane catalytic subunits, Nox1-Nox5, as well as Duox1 and Duox2 [155], and from these, Nox1, Nox2, Nox4, and Nox5 are expressed in the vascular endothelium but also in other vascular cells such as VSMCs, adventitial fibroblasts, and various leucocytes present in vascular wall under pathological conditions [156]. AMPK was first shown to inhibit Nox activity in human neutrophils wherein AMPK activation with AICAR suppressed phorbol ester-stimulated $O_2^{\cdot-}$ generation and the respiratory burst by reducing translocation to the cell membrane and phosphorylation of the cytosolic Nox adaptor p47phox, protein crucial for Nox2 activation [157] (Fig. 3). In human umbilical vein ECs, activation of AMPK with rosiglitazone quenched high glucose-induced Nox-derived oxidative stress through inhibition of p22phox protein expression, but also inhibition of the protein kinase C (PKC)-dependent translocation of p47phox and Rac1 to the membrane [158]. In cardiac myocytes, glucagon-like peptide-1 activates AMPK α_2 , the major isoform expressed in cardiomyocytes, thus blocking high glucose-induced PKC- β_2 -dependent phosphorylation of p47phox translocation to the plasma membrane and Nox2-derived oxidative stress and glucotoxicity [159]. Endothelial Nox2 can also be a physiologically relevant source of H_2O_2 generation that contributes to the endothelium-dependent vasodilatation in the heart and kidney [104,141,160]. Our group has recently demonstrated that AMPK is a physiological regulator of Nox2 activity in intrarenal arteries, since acute exposure to the AMPK activator A769662 suppressed $O_2^{\cdot-}$ generation stimulated by phorbol esters and did not further inhibit Nox-derived ROS production under conditions of Nox2 blockade [99]. On the other hand, AMPK does not only regulate Nox2-derived ROS production by inhibiting its activation but also through regulation of Nox2 expression. AMPK α_1 knockout mice displayed Nox2 upregulation, endothelial dysfunction, and increased vascular oxidative stress in response to angiotensin II [161]. Although the major isoform of AMPK in ECs is AMPK $\alpha_1\beta_1\gamma_1$, both AMPK α_1 and AMPK α_2 are equally important in maintaining endothelial function. The early studies of Wang *et al.* [162] demonstrated that AMPK α_2 functions as a physiological suppressor of Nox2 activity and that AMPK α_2 deletion leads to endothelial dysfunction and enhanced expression (p47phox, p67phox, and gp91phox) and activity of Nox2 mediated by increased nuclear factor (NF)- κ B activation in

ECs, whereas AMPK activation with AICAR inhibited endothelial Nox2 expression and ROS production in an AMPK α_2 -dependent manner [162,163].

Nox4 is the most abundantly expressed Nox enzyme in ECs, is constitutively active, localized in the mitochondria and ER, and generates H_2O_2 in contrast to Nox1 and Nox2 that primarily produce $O_2^{\cdot-}$, [155,156]. While AMPK was first shown to negatively regulate Nox4-dependent oxidative stress and apoptosis in kidney podocytes and tubular cells in diabetes and obesity [164,165], we have recently shown that acute treatment of healthy renal interlobar arteries with the AMPK activator A769662 induced a powerful inhibition of NADPH-derived ROS production associated with a marked downregulation of Nox4 expression and reduced H_2O_2 generation in the vascular wall, which suggests that AMPK is a regulator of arterial Nox4 activity under physiological conditions [99] (Fig. 3).

Mitochondria are major sources of ROS generation and AMPK regulates mitochondrial ROS production through several mechanisms including upregulation of the mitochondrial anion carrier protein uncoupling protein 2 (UCP2) and by modulating autophagy and elimination of dysfunctional mitochondria [154]. Exposure of human ECs to either AICAR or metformin caused AMPK-dependent upregulation of both UCP2 mRNA and UCP2 protein, while overexpression of UCP2 suppressed both $O_2^{\cdot-}$ and prostacyclin synthase nitration induced by high glucose [166]. Damaged proteins and DNA or dysfunctional mitochondria cause enhanced ROS production. Dysfunctional mitochondria are eliminated from cells through autophagy mechanism, autophagy deficiency leading to enhanced ROS [167]. AMPK regulates mitochondrial ROS production through the regulation of autophagy via inactivation of the mTORC1 pathway (by phosphorylation and activation of TSC2 exchange factor) [168] or by direct phosphorylation of ULK1 thus favoring autophagy [169] (Fig. 3).

Mitochondrial dysfunction is involved in the pathogenesis of the vascular complications of metabolic disease, usually associated with enhanced ROS production induced by atherosclerotic stimuli such as hyperglycemia, hyperlipidemia, and oxidized low-density lipoproteins [166,170–172]. Pharmacological activation of AMPK in ECs has been shown to attenuate oxidative stress evoked by hyperglycemia [166] and to ameliorate palmitate-induced endothelial dysfunction by suppression of mitochondrial ROS-associated ER stress and subsequent Trx-interacting protein (TXNIP)/NLRP3 inflammasome activation [173]. AMPK activation can also protect against EC damage under oxidative stress via inhibition of EC apoptosis

and mitochondrial superoxide production mediated by phosphorylation of eNOS [174].

Pathophysiological significance of the AMPK-ROS axis in vascular disease

Abnormal elevated levels of ROS, in particular $O_2^{\cdot-}$, produced by Nox, mitochondria or uncoupled eNOS in response to hyperglycemia, hyperlipidemia, or proinflammatory cytokines in diabetes, obesity and insulin resistance, are involved in endothelial and vascular dysfunction associated with metabolic disease [138,142,175]. As described above, AMPK is an oxidative sensor and redox regulator in the cardiovascular system, AMPK activity can be regulated by oxidative stress and AMPK in turn is able to modulate both mitochondrial ROS generation and gene expression of antioxidant defenses in ECs. Hence, pharmacological activation of AMPK in the vascular endothelium was early proposed to be beneficial in metabolic disease not only because of its bioenergetic effects but also due to its ability to counteract oxidative stress [118]. The powerful beneficial effects of AMPK activation on vascular oxidative stress are consistent with the cardiovascular protective actions of drugs used in the treatment of metabolic disorders that activate AMPK such as AICAR, metformin, or thiazolidinediones [64].

AMPK, hypoxia, and ischemia/reperfusion

Ischemia is the restriction of normal blood flow caused by narrowing of blood vessel lumen which decreases O_2 supply (hypoxia) to affected tissues. Hypoxia is one of the most potent physiological activators of AMPK in tissues and organs including heart and the vascular endothelium [29,149]. The mechanisms underlying AMPK activation by hypoxia include reduced ATP production due to inhibition of FAs β -oxidation [176], and ROS from the mitochondrial ETC and reactive nitrogen species such as peroxynitrite that activate AMPK under conditions of nonsevere hypoxia [177,178]. Hypoxia combined with glucose deprivation in ECs induces AMPK α_1 activation and protects these cells by preventing apoptosis via both upregulation of the Nrf2-dependent expression of anti-apoptotic gene products and maintaining intracellular ATP in ECs [179].

Hypoxia phosphorylates and activates endothelial AMPK, specifically AMPK α_2 subunit, to regulate angiogenesis [119]. Although AMPK α_2 is the least expressed AMPK subunit isoform in ECs, it is essential for angiogenesis in response to hypoxic stress.

Angiogenesis can also be mediated via AMPK α_1 activation by VEGF, independently of eNOS and possibly by providing energy through inhibition of ACC [70].

Angiogenesis is induced by ischemia-derived hypoxia and is the growth of new capillaries consisting of EC tubes without VSMCs or adventitia from pre-existing vessels, to recover blood perfusion in the ischemic zones [180–182]. Angiogenesis is required for migration and proliferation of ECs and morphological differentiation of ECs into capillary-like tubes under hypoxia conditions. Therefore, endothelial AMPK may be determinant for blood vessel recruitment and maintenance of blood perfusion in ischemic tissues [119]. AMPK inhibition by transfection of AMPK α -specific siRNA reduced tube formation in human umbilical vein ECs, whereas in mouse aortic ECs isolated from AMPK α_1 or AMPK α_2 knockout mice there was a reduced expression of UCP2, and tube formation was impaired. Ischemia increased angiogenesis, Ser¹¹⁷⁷ phosphorylation of eNOS, and UCP2 in ischemic muscles from WT mice, but not from either AMPK α_1 or AMPK α_2 -deficient mice [183]. Downregulation of AMPK attenuates EC differentiation/migration and angiogenesis induced by hypoxia [119], VEGF [70], or adiponectin [85]. Overexpression of UCP2 increased angiogenesis in ECs of AMPK-deficient mice indicating that downregulation of ROS may be critical [183]. The mechanism proposed for AMPK-mediated angiogenesis is that hypoxia activates endothelial AMPK that in turn stimulates the Akt/eNOS/NO signaling cascade. This endothelial AMPK pathway was not implicated in EC migration and tube formation under normoxic conditions [119]. However, direct AMPK-mediated eNOS phosphorylation at Ser¹¹⁷⁷ was produced under prolonged hypoxia conditions or peroxynitrite-derived ischemia-reperfusion (I/R) [119,145].

AMPK and I/R

When a tissue recovers the normal blood flow (reperfusion) after a hypoxic-ischemic period, an I/R injury is produced rather than the recovery of normal function. I/R damage is produced mainly because of apoptosis of ECs and subsequent obstruction of capillaries and microvascular flow, which finally produces injury to target organs such as brain (stroke) [184], heart (myocardial damage) [185], or kidneys (renal failure) [186], being a major cause of morbidity and mortality worldwide. In this context, AMPK activation has been demonstrated to have protective effects during I/R via regulation of energy metabolism, oxidative stress, inflammation, mitochondrial function, autophagy, apoptosis, and ER stress [149,187].

The heart is highly sensitive to changes in O₂ supply, hypoxia, or anoxia being detrimental for cardiac function. Intrinsic AMPK activation by hypoxia protects the heart against ischemic injury and apoptosis, but also pharmacological AMPK activation has been shown to protect cardiomyocyte function under myocardial I/R injury [185]. Hearts from AMPK α_2 deficiency mice failed to increase glucose uptake and glycolysis during ischemia and FA oxidation during reperfusion and exhibited more myocyte apoptosis and less contractile function [188]. Moreover, adiponectin knockout mice had an increased myocardial infarct size and apoptosis compared to WT after I/R, and administration of adiponectin reduced ischemic damage via AMPK activation, which suggests therapeutic potential for acute treatment of obesity-related ischemic heart disease [189]. On the other hand, acute metformin administration before I/R, activated myocardial AMPK, increased eNOS phosphorylation at Ser¹⁷⁷ and decreased myocardial infarction in the heart of *db/db* diabetic mice [92]. Pretreatment with A769662 also increased eNOS activation, attenuated infarct size and reduced myocardial apoptosis and necrosis [190], confirming that pharmacologic AMPK stimulation mitigates I/R damage. Interestingly, long-term caloric restriction has been reported to produce a high AMPK activation that profoundly protects the aged heart from I/R injury [191]. Increasing experimental evidence supports that natural antioxidants protect against myocardial I/R by suppressing Nox and enhancing antioxidant enzymes activity via AMPK [192,193] and melatonin has been shown to be a cardioprotective agent by enhancing mitochondrial biogenesis and reducing mitochondrial-derived ROS production in I/R hearts from diabetic rats [194]. In addition to the antioxidant protective action of AMPK activation in I/R injuries, activated protein C [195] and antithrombin [196] have been shown to activate AMPK and to exert anti-inflammatory effects during myocardial I/R through inhibition of c-Jun N-terminal

kinase (JNK) and the NF- κ B signaling pathways.

In the kidney, AMPK activation also confers protection during renal I/R, a major cause of acute kidney injury in which severe cellular damage and kidney dysfunction are produced [197]. There is evidence that intrinsic AMPK activation alone during ischemia is not able to stop progression of I/R damage but AMPK activation by metformin or AICAR exerts renoprotective actions such as inhibition of oxidative stress, apoptosis, and profibrotic markers, and activation of autophagy, thus better preparing the kidney to respond to and manage injury [186]. On the other hand, AICAR has been shown to decrease

monocyte/macrophage infiltration and to ameliorate acute tubular necrosis after kidney I/R injury [198]. Moreover, preactivation of AMPK by metformin preserves cellular integrity and ameliorates the epithelial cell damage caused by renal ischemia [199]. However, it seems that AMPK activation after renal I/R does not increase phosphorylation of eNOS or ACC, in contrast to that observed in the ischemic heart [200].

In conclusion, AMPK activation during I/R leads to increased glycolysis and FAs uptake and oxidation in the mitochondria to restore ATP levels, promotes cell survival by inducing autophagy and inhibiting ER stress, inflammation, and oxidative stress [185,187]. Therefore, AMPK activators may be potential therapeutic drugs for protection against I/R injuries.

AMPK and vascular inflammation

Low-grade inflammation of the vascular wall is associated with endothelial dysfunction and involved in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular disease. AMPK activation can exert vasoprotective effects not only through augmentation of endothelial NO availability or through reduction of vascular oxidant production, but also through its anti-inflammatory effects on ECs by suppressing the NF- κ B signaling pathway and thus reducing levels of cytokines such as tumor necrosis factor α (TNF- α) and adhesion molecules such as vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), and E-selectin [201,202] (Fig. 3). The NF- κ B is a redox-sensitive transcription factor that regulates expression of a large number of inflammatory genes. NF- κ B is inactive in the cytoplasm bound to I κ B protein under basal conditions; however, upon cytokine stimulation, I κ B is phosphorylated by I κ B kinase (IKK) that targets its degradation allowing NF- κ B translocation into the nucleus, its activation, and the expression of proinflammatory genes [203]. AMPK has been implicated as a modulator of the inflammatory response since AMPK activators suppress lipopolysaccharide (LPS)-, TNF α -, and palmitate-induced NF- κ B activity and expression of proinflammatory cytokines in various cell types including endothelial and mesangial cells [204,205], but also in glial cells [206], retinal pericytes [112], and skeletal myocytes of obese/type 2 diabetic patients [207].

AMPK contributes to the vascular anti-inflammatory effects of NO, since NO activates AMPK α_2 in ECs which in turn phosphorylates (at Ser¹⁷⁷ and Ser¹⁸¹) and inactivates IKK thus attenuating activation of NF- κ B signaling and the expression of inflammatory genes [79]. Vascular anti-inflammatory effects of

AMPK were early shown to be related to AMPK interactions with ROS metabolism, and AMPK was demonstrated to negatively regulate NF- κ B activation through inhibition of the 26S proteasome-dependent I κ B α degradation and the subsequent expression of Nox2 (Fig. 3). Thus, in aortic ECs from AMPK α_2 ^{-/-} mice and human umbilical vein EC expressing dominant negative AMPK or AMPK α_2 -specific siRNA, loss of AMPK activity caused endothelial dysfunction and increased subunit expression of gp91phox (Nox2), p47phox, p67phox, superoxide production, 26S proteasome activity, I κ B α degradation, and nuclear translocation of NF- κ B (p50 and p65); in contrast, AMPK activation by AICAR or AMPK overexpression reversed these effects suggesting that AMPK maintains the nonatherogenic and noninflammatory phenotype of ECs [162]. Furthermore, *in vivo* AMPK α_1 deletion leads to Nox2 upregulation and to Nox2-derived oxidative stress and to increased mRNA expression of pro-inflammatory mediators such as iNOS, cyclooxygenase-2, and VCAM-1, resulting in endothelial dysfunction and vascular inflammation, and supporting that basal AMPK activity is a protective, redox-regulating element in vascular homeostasis [161]. Recent investigations have elucidated the mechanism by which endothelial AMPK α_1 modulates vascular inflammation and oxidative stress and has involved vascular infiltration of phagocytic cells. Thus, specific endothelial AMPK α_1 deletion aggravated endothelial dysfunction induced by chronic angiotensin II infusion, and enhanced recruitment of infiltrating leukocytes that contributed to augmented oxidative stress derived from Nox2 (phagocytic NADPH oxidase) by upregulating of cytokines and vascular adhesion molecules including VCAM-1, monocyte chemoattractant protein 1, and chemokine (C-C motif) ligand 5 [208]. Furthermore, mice lacking endothelial AMPK α_1 lost heme oxygenase 1-mediated antioxidant defense [208].

Interactions between circulating monocytes and ECs, which is regulated by adhesion molecules such as selectins, ICAM-1, and VCAM-1 expressed on the surface of ECs in response to inflammatory stimuli, are crucial for the progression of atherogenesis. AMPK and AMPK activating drugs such as metformin and AICAR have been reported to attenuate EC pro-inflammatory atherogenic response by inhibiting monocyte adhesion [209,210] through phosphorylation at Ser⁸⁹ of the transcriptional coactivator p300; AMPK thus blocks p300-mediated acetylation of NF- κ B and its activation and reduces the expression of adhesion molecules and, consequently, adhesion of monocytes to ECs in TNF- α -activated human aortic ECs [210]. As mentioned above, NF- κ B pathway can also be

inhibited through AMPK α_2 -mediated phosphorylation and inactivation of IKK, as depicted by the reduced IL-1-stimulated IKK phosphorylation found in ECs lacking AMPK α_2 but not AMPK α_1 [79].

The modulatory role of AMPK in vascular endothelium inflammatory response has been related to its interactions with mitochondrial ROS and ER stress [173]. Pharmacological activation of AMPK with salicylate or AICAR ameliorated palmitate-induced endothelial dysfunction by suppression of mitochondrial ROS-associated ER stress and the subsequent TXNIP/NLRP3 inflammasome activation through the reduction of NLRP3 and caspase-1 expression; the latter resulted in inhibition of inflammation and apoptosis, enhancement of eNOS phosphorylation, and improved endothelium-dependent vasodilatation [173]. AMPK has also been reported to suppress the proinflammatory Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway by phosphorylating JAK in ECs [211].

Besides endothelium, AMPK can modulate the inflammatory response in VSM cells through various mechanisms including the phosphatase and tensin homolog, a tumor suppressor gene that acts as a negative regulator of PI3K and regulates cell proliferation, survival, and growth [212]. Moreover, AMPK can also modulate the STAT-1 cascade in VSM [213]. Thus, in human aortic VSMCs, pharmacologic or genetic activation of AMPK inhibited STAT-1 and attenuated the proinflammatory actions induced by STAT-1 activators such as interferon- γ (IFN- γ) and angiotensin II, while inhibition of AMPK had opposite effects. Deletion of AMPK α_1 or AMPK α_2 resulted in activation of STAT-1 and increased levels of proinflammatory mediators, both of which were attenuated by genetic or pharmacological inhibition of STAT-1. AMPK activation suppressed STAT-1 signaling and inhibited vascular inflammation through upregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1 [213].

In cells of the immune system, AMPK activation was early reported to reduce Toll-like receptor 4-induced neutrophil activation and to decrease NF- κ B signaling and the release of TNF- α and IL-6 thus ameliorating severity of LPS-induced acute lung injury [214]. The interactions between AMPK and macrophages and T lymphocytes of the immune system have recently been reviewed by Jansen *et al.* [117]. AMPK α_1 is involved in proliferation and differentiation of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes and deletion of AMPK α_1 in these cells leads to impaired ability to generate memory CD8⁺-T-cell responses when activated by infectious stimuli [215]. AMPK α_1 has also been demonstrated to be necessary to

couple nutrients availability to T-cell demand during the inflammatory process [216]. AMPK plays a key role in regulating macrophage activation and infiltration through the negative regulation of the proinflammatory JNK signaling. Thus, AMPK-mediated inhibition of JNK phosphorylation has been reported in macrophages [217] and increased JNK phosphorylation has been demonstrated in macrophages and ECs from mice deficient in AMPK subunits [218]. On the other hand, AMPK α_1 deletion in myeloid cells led to dysfunction consisting in maintained polarization of M1 and decreased number of M2 anti-inflammatory macrophages along with impaired release of cytokines and impaired phagocytosis of necrotic and apoptotic cells [219]. AMPK α_1 deletion of myelomonocytic cells in the angiotensin II-induced model of endothelial dysfunction, induced a pro-inflammatory phenotype with severe endothelial dysfunction and oxidative stress, enhanced F4/80 macrophage and GR1+ granulocyte infiltration, and augmented release of IFN- γ and TNF- α [220].

Pathophysiological significance of the AMPK–inflammation axis in vascular disease

Inflammation might be the link between metabolic and cardiovascular disease, and a low-grade proinflammatory state of the vascular wall associated with endothelial dysfunction underlies the vascular complications of obesity, diabetes, and other insulin-resistant states [138]. Metabolic abnormalities such as hyperglycemia, hyperlipidemia, and insulin resistance activate the JAK/STAT signaling pathway, a major intracellular cascade that promotes inflammatory response and insulin resistance and accelerates the development of cardiovascular complications [221,222]. As mentioned above, AMPK is a vascular inflammatory repressor and AMPK deletion or AMPK inhibition in obese humans exacerbate inflammation [161,223]. Reduction of AMPK activity has been associated with chronic inflammation in metabolic syndrome, including obesity and type 2 diabetes, and acceleration of atherosclerosis [224,225], while AMPK activators such as AICAR or antidiabetic drugs like metformin inhibit inflammation, attenuate EC proinflammatory atherogenic response by inhibiting monocyte adhesion, and have cardiovascular protective effects [64,226].

Vascular AMPK and metabolic disease

Endothelial dysfunction is an early pathogenic event in vascular dysfunction and represents a maladapted

endothelial phenotype produced by enhanced exposure to mechanical, metabolic, oxidative, or hypoxic stimuli that lead to impaired vasodilatation, angiogenesis, and barrier function along with elevated expression of proinflammatory and pro-thrombotic factors [138,227]. In diabetes, obesity and other insulin-resistant states, hyperglycemia, hyperlipidemia, or hypertension induce oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction, first step and main predictor of vascular atherosclerotic processes and cardiovascular complications, including myocardial infarction, stroke, and heart and renal failure [227,228]. Dysregulation of vascular AMPK might link these cardiovascular complications to metabolic disease [229–234].

AMPK dysregulation has been reported under conditions of metabolic stress such as obesity and diabetes; as a master energy sensor activated during energy stress conditions and ATP depletion, is not surprising that high levels of glucose, triglycerides, or FAs in obesity and insulin resistance lead to inhibition of vascular AMPK activity [235,236]. The mechanisms of this inhibition are unclear, but it has been proposed that PKC activation observed in metabolic disorders can phosphorylate AMPK α_1 at inhibitory site Ser⁴⁸⁷ thus reducing its activity [237]. Moreover, PKC activation induced by high glucose and FAs causes ROS-derived NADPH oxidase production in both EC and VSM cells [238]. Furthermore, PP2A protein expression was upregulated in aortas of mice fed a high fat diet, and decreased AMPK phosphorylation [129,130]. High glucose levels and hyperinsulinemia in diabetes suppress AMPK activation in VSM through Akt-dependent-mediated inhibitory phosphorylation at Ser⁴⁸⁵ on AMPK α_1 subunit [239].

As discussed above, AMPK exerts beneficial actions on the vasculature such as the increase in endothelial NO production, activation of VSM relaxation, suppression of inflammation, downregulation of ROS production, and increase of antioxidant defenses. Therefore, inhibition of AMPK activity has detrimental consequences for the cardiovascular system. It has been reported that downregulation of AMPK/PI3K/ Akt/eNOS pathway by high fat diet induces endothelial dysfunction in a rat model of diet-induced obesity [234]. Moreover, high levels of FAs have been reported to lead to lipid accumulation in ECs and endothelial dysfunction in obesity due to impaired AMPK activity and downstream ACC, thus inhibiting FA oxidation and promoting lipotoxicity [240]. Other studies have shown that loss of AMPK α_1 in VSMCs promotes atherosclerotic calcification *in vivo* [136] and mouse aortic ECs from AMPK α_2 knockout mice exhibit aberrant ER stress [122].

The potential therapeutic benefits of AMPK activation for treatment of metabolic and cardiovascular disease can be inferred from the pathophysiological consequences of AMPK vascular dysfunction, as discussed above. In recent years, there has been a remarkable research effort to develop new AMPK activators, and beneficial actions on vascular function of drugs such as AICAR or others widely used in clinical practice such as metformin, thiazolidinediones, or statins have been shown in experimental assays. Thus, these compounds improved endothelial function by enhancing NO production and reducing oxidative and ER stress, inflammation and apoptosis in ECs, and calcification in VSM induced by hyperlipidemia and hyperglycemia under experimental conditions [64,91,122,123,137,235,241,242]. Nevertheless, some of these drugs have shown off-side target effects and low potency and specificity which make them unsuitable for clinical use [97,101]. Therefore, the search for new AMPK activators with therapeutic potential for the treatment of metabolic disease vascular complications, having both vascular and metabolic beneficial effects, is needed.

Conclusions

The information provided in this review summarizes the mechanisms by which the master energy sensor AMPK regulates blood flow in response to tissue metabolic demands, explains its contribution to maintaining a healthy endothelium and also the molecular mechanisms underlying the vasodilator, antioxidant, and anti-inflammatory protective actions of AMPK in the vasculature. The physiological bases of AMPK vascular actions are relevant for understanding the pathogenesis of vascular injury associated with metabolic disease in diabetes and obesity, wherein impaired AMPK activity associated with chronic inflammation and oxidative stress is paralleled by dysfunctional vascular AMPK which contributes to endothelial dysfunction and to the proatherogenic inflammatory response. The beneficial cardioprotective effects of AMPK activators, including antidiabetic drugs currently used in the treatment of diabetes and insulin resistance, highlight the potential therapeutic benefits of AMPK activation for the treatment of metabolic and cardiovascular disease.

Acknowledgements

This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) co-funded by the FEDER Program of EU (grants n° SAF2016-77526-R and PID2019-

105689RB) and Santander-Universidad Complutense de Madrid (grant n° PR87/19-22629). Claudia Rodríguez was supported by grant FPU16/04582 from MEC (Spain).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

DP conceived the idea and drafted the manuscript. CR, MM, CC and DP wrote and discussed the manuscript. DP revised the final version.

References

- 1 Suarez RK (2012) Energy and metabolism. *Compr Physiol* 2, 2527–2540.
- 2 Yang J, Zhou R & Ma Z (2019) Autophagy and energy metabolism. *Adv Exp Med Biol* 1206, 329–357.
- 3 Hardie DG (2014) AMP-activated protein kinase: maintaining energy homeostasis at the cellular and whole-body levels. *Annu Rev Nutr* 34, 31–55.
- 4 Kim M, Shen M, Ngoy S, Karamanlidis G, Liao R & Tian R (2012) AMPK isoform expression in the normal and failing hearts. *J Mol Cell Cardiol* 52, 1066–1073.
- 5 Calabrese MF, Rajamohan F, Harris MS, Caspers NL, Magyar R, Withka JM, Wang H, Borzilleri KA, Sahasrabudhe PV, Hoth LR *et al.* (2014) Structural basis for AMPK activation: natural and synthetic ligands regulate kinase activity from opposite poles by different molecular mechanisms. *Structure* 22, 1161–1172.
- 6 Chen L, Wang J, Zhang YY, Yan SF, Neumann D, Schlattner U, Wang ZX & Wu JW (2012) AMP-activated protein kinase undergoes nucleotide-dependent conformational changes. *Nat Struct Mol Biol* 19, 716–718.
- 7 Ross FA, Jensen TE & Hardie DG (2016) Differential regulation by AMP and ADP of AMPK complexes containing different gamma subunit isoforms. *Biochem J* 473(Pt(2)), 189–199.
- 8 Carling D & Viollet B (2015) Beyond energy homeostasis: the expanding role of AMP-activated protein kinase in regulating metabolism. *Cell Metab* 21, 799–804.
- 9 Domenech E, Maestre C, Esteban-Martinez L, Partida D, Pascual R, Fernandez-Miranda G, Seco E, Campos-Olivas R, Perez M, Megias D *et al.* (2015) AMPK and PFKFB3 mediate glycolysis and survival in response to mitophagy during mitotic arrest. *Nat Cell Biol* 17, 1304–1316.

REVIEW

- 10 Hardie DG (2018) Keeping the home fires burning: AMP-activated protein kinase. *J R Soc Interface* 15, 20170774.
- 11 Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Makela TP, Alessi DR & Hardie DG (2003) Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* 2, 28.
- 12 Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M & Carling D (2003) LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 13, 2004–2008.
- 13 Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA & Cantley LC (2004) The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 3329–3335.
- 14 Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG & Hardie DG (2005) Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2, 9–19.
- 15 Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong S-P, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M & Carling D (2005) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* 2, 21–33.
- 16 Hurley RL, Anderson KA, Franzone JM, Kemp BE, Means AR & Witters LA (2005) The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem* 280, 29060–29066.
- 17 Carling D, Sanders MJ & Woods A (2008) The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Int J Obes (Lond)* 32 (Suppl 4), S55–S59.
- 18 Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, Snowden MA & Carling D (2007) Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J* 403, 139–148.
- 19 Qi J, Gong J, Zhao T, Zhao J, Lam P, Ye J, Li JZ, Wu J, Zhou HM & Li P (2008) Downregulation of AMP-activated protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose tissue. *EMBO J* 27, 1537–1548.
- 20 Lee MS, Han HJ, Han SY, Kim IY, Chae S, Lee CS, Kim SE, Yoon SG, Park JW, Kim JH *et al.* (2018) Loss of the E3 ubiquitin ligase MKRN1 represses diet-induced metabolic syndrome through AMPK activation. *Nat Commun* 9, 3404.
- 21 Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, Park O, Luo Z, Lefai E, Shyy JY *et al.* (2011) AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab* 13, 376–388.
- 22 Carling D, Clarke PR, Zammit VA & Hardie DG (1989) Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem* 186, 129–136.
- 23 Muoio DM, Seefeld K, Witters LA & Coleman RA (1999) AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J* 338(Pt 3), 783–791.
- 24 Habets DD, Coumans WA, El Hasnaoui M, Zarrinpashneh E, Bertrand L, Viollet B, Kiens B, Jensen TE, Richter EA, Bonen A *et al.* (2009) Crucial role for LKB1 to AMPKalpha2 axis in the regulation of CD36-mediated long-chain fatty acid uptake into cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta* 1791, 212–219.
- 25 Obici S, Feng Z, Arduini A, Conti R & Rossetti L (2003) Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat Med* 9, 756–761.
- 26 Kahn BB, Alquier T, Carling D & Hardie DG (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1, 15–25.
- 27 Taylor EB, An D, Kramer HF, Yu H, Fujii NL, Roeckl KS, Bowles N, Hirshman MF, Xie J, Feener EP *et al.* (2008) Discovery of TBC1D1 as an insulin-, AICAR-, and contraction-stimulated signaling nexus in mouse skeletal muscle. *J Biol Chem* 283, 9787–9796.
- 28 Zheng D, MacLean PS, Pohnert SC, Knight JB, Olson AL, Winder WW & Dohm GL (2001) Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. *J Appl Physiol* (1985) 91, 1073–1083.
- 29 Marsin AS, Bertrand L, Rider MH, Deprez J, Beauloye C, Vincent MF, Van den Berghe G, Carling D & Hue L (2000) Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol* 10, 1247–1255.
- 30 Marsin AS, Bouzin C, Bertrand L & Hue L (2002) The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem* 277, 30778–30783.
- 31 Gollob MH, Seger JJ, Gollob TN, Tapscott T, Gonzales O, Bachinski L & Roberts R (2001) Novel PRKAG2 mutation responsible for the genetic syndrome of ventricular preexcitation and conduction system disease with childhood onset and absence of cardiac hypertrophy. *Circulation* 104, 3030–3033.

REVIEW

- 32 Gollob MH, Green MS, Tang AS, Gollob T, Karibe A, Ali Hassan AS, Ahmad F, Lozado R, Shah G, Fananapazir L *et al.* (2001) Identification of a gene responsible for familial Wolff-Parkinson-White syndrome. *N Engl J Med* 344, 1823–1831.
- 33 Blair E, Redwood C, Ashrafian H, Oliveira M, Broxholme J, Kerr B, Salmon A, Ostman-Smith I & Watkins H (2001) Mutations in the gamma(2) subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Hum Mol Genet* 10, 1215–1220.
- 34 Arad M, Benson DW, Perez-Atayde AR, McKenna WJ, Sparks EA, Kanter RJ, McGarry K, Seidman JG & Seidman CE (2002) Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 109, 357–362.
- 35 Milan D, Jeon JT, Looft C, Amarger V, Robic A, Thelander M, Rogel-Gaillard C, Paul S, Iannuccelli N, Rask L *et al.* (2000) A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science* 288, 1248–1251.
- 36 Zhang Y, Chen J, Zeng Y, Huang D & Xu Q (2019) Involvement of AMPK activation in the inhibition of hepatic gluconeogenesis by *Ficus carica* leaf extract in diabetic mice and HepG2 cells. *Biomed Pharmacother* 109, 188–194.
- 37 Sun G, Tarasov AI, McGinty J, McDonald A, da Silva Xavier G, Gorman T, Marley A, French PM, Parker H, Gribble F *et al.* (2010) Ablation of AMP-activated protein kinase $\alpha 1$ and $\alpha 2$ from mouse pancreatic beta cells and RIP2.Cre neurons suppresses insulin release *in vivo*. *Diabetologia* 53, 924–936.
- 38 Hoppe S, Bierhoff H, Cado I, Weber A, Tiebe M, Grummt I & Voit R (2009) AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 17781–17786.
- 39 Van Nostrand JL, Hellberg K, Luo EC, Van Nostrand EL, Dayn A, Yu J, Shokhirev MN, Dayn Y, Yeo GW & Shaw RJ (2020) AMPK regulation of Raptor and TSC2 mediate metformin effects on transcriptional control of anabolism and inflammation. *Genes Dev* 34, 1330–1344.
- 40 Leprivier G, Remke M, Rotblat B, Dubuc A, Mateo AR, Kool M, Agnihotri S, El-Naggar A, Yu B, Somasekharan SP *et al.* (2013) The eEF2 kinase confers resistance to nutrient deprivation by blocking translation elongation. *Cell* 153, 1064–1079.
- 41 Mizrachy-Schwartz S, Cohen N, Klein S, Kravchenko-Balasha N & Levitzki A (2011) Up-regulation of AMP-activated protein kinase in cancer cell lines is mediated through c-*Src* activation. *J Biol Chem* 286, 15268–15277.
- 42 Kobayashi S (2015) Choose delicately and reuse adequately: the newly revealed process of autophagy. *Biol Pharm Bull* 38, 1098–1103.
- 43 Alers S, Loffler AS, Wesselborg S & Stork B (2012) Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol* 32, 2–11.
- 44 Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP & Brunet A (2007) The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J Biol Chem* 282, 30107–30119.
- 45 Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R *et al.* (2011) Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331, 456–461.
- 46 Kim J, Kundu M, Viollet B & Guan KL (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13, 132–141.
- 47 Loffler AS, Alers S, Dieterle AM, Keppeler H, Franz-Wachtel M, Kundu M, Campbell DG, Wesselborg S, Alessi DR & Stork B (2011) Ulk1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop. *Autophagy* 7, 696–706.
- 48 Jorgensen SB, Treebak JT, Viollet B, Schjerling P, Vaulont S, Wojtaszewski JF & Richter EA (2007) Role of AMPK $\alpha 2$ in basal, training-, and AICAR-induced GLUT4, hexokinase II, and mitochondrial protein expression in mouse muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E331–E339.
- 49 Jorgensen SB, Wojtaszewski JF, Viollet B, Andreelli F, Birk JB, Hellsten Y, Schjerling P, Vaulont S, Neuffer PD, Richter EA *et al.* (2005) Effects of alpha-AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle. *FASEB J* 19, 1146–1148.
- 50 Thomson DM, Porter BB, Tall JH, Kim HJ, Barrow JR & Winder WW (2007) Skeletal muscle and heart LKB1 deficiency causes decreased voluntary running and reduced muscle mitochondrial marker enzyme expression in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E196–E202.
- 51 Zong H, Ren JM, Young LH, Pypaert M, Mu J, Birnbaum MJ & Shulman GI (2002) AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 15983–15987.
- 52 Lin J, Handschin C & Spiegelman BM (2005) Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 1, 361–370.
- 53 Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N & Ido Y (2008) SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 283, 27628–27635.

REVIEW

- 54 Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P & Auwerx J (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458, 1056–1060.
- 55 Sun Y, Li J, Xiao N, Wang M, Kou J, Qi L, Huang F, Liu B & Liu K (2014) Pharmacological activation of AMPK ameliorates perivascular adipose/endothelial dysfunction in a manner interdependent on AMPK and SIRT1. *Pharmacol Res* 89, 19–28.
- 56 Ruderman NB, Xu XJ, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F & Ido Y (2010) AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E751–E760.
- 57 Chaube B, Malvi P, Singh SV, Mohammad N, Viollet B & Bhat MK (2015) AMPK maintains energy homeostasis and survival in cancer cells via regulating p38/PGC-1 α -mediated mitochondrial biogenesis. *Cell Death Discov* 1, 15063.
- 58 Salt IP & Hardie DG (2017) AMP-activated protein kinase: an ubiquitous signaling pathway with key roles in the cardiovascular system. *Circ Res* 120, 1825–1841.
- 59 Chen Z, Peng IC, Sun W, Su MI, Hsu PH, Fu Y, Zhu Y, DeFea K, Pan S, Tsai MD *et al.* (2009) AMP-activated protein kinase functionally phosphorylates endothelial nitric oxide synthase Ser633. *Circ Res* 104, 496–505.
- 60 Morrow VA, Fougelle F, Connell JM, Petrie JR, Gould GW & Salt IP (2003) Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 278, 31629–31639.
- 61 Bradley EA, Eringa EC, Stehouwer CDA, Korstjens I, Van Nieuw Amerongen GP, Musters R, Sipkema P, Clark MG & Rattigan S (2010) Activation of AMP-activated protein kinase by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -d-ribofuranoside in the muscle microcirculation increases nitric oxide synthesis and microvascular perfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 1137–1142.
- 62 Almabrouk TAM, Ewart MA, Salt IP & Kennedy S (2014) Perivascular fat, AMP-activated protein kinase and vascular diseases. *Br J Pharmacol* 171, 595–617.
- 63 Fisslthaler B & Fleming I (2009) Activation and signaling by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circ Res* 105, 114–127.
- 64 Ewart MA & Kennedy S (2011) AMPK and vasculoprotection. *Pharmacol Ther* 131, 242–253.
- 65 Goirand F, Solar M, Athes Y, Viollet B, Mateo P, Fortin D, Leclerc J, Hoerter J, Ventura-Clapier R & Garnier A (2007) Activation of AMP kinase alpha subunit induces aortic vasorelaxation in mice. *J Physiol* 581, 1163–1171.
- 66 Rubin LJ, Magliola L, Feng X, Jones AW & Hale CC (2005) Metabolic activation of AMP kinase in vascular smooth muscle. *J Appl Physiol* 98, 296–306.
- 67 Zou MH & Wu Y (2008) AMP-activated protein kinase activation as a strategy for protecting vascular endothelial function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35, 535–545.
- 68 Thors B, Halldórsson H & Thorgeirsson G (2004) Thrombin and histamine stimulate endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation at Ser1177 via an AMPK mediated pathway independent of PI3K-Akt. *FEBS Lett* 573, 175–180.
- 69 Stahmann N, Woods A, Carling D & Heller R (2006) Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. *Mol Cell Biol* 26, 5933–5945.
- 70 Stahmann N, Woods A, Spengler K, Heslegrave A, Bauer R, Krause S, Viollet B, Carling D & Heller R (2010) Activation of AMP-activated protein kinase by vascular endothelial growth factor mediates endothelial angiogenesis independently of nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 285, 10638–10652.
- 71 Lifschitz-Mercer B, Sheinin Y, Ben-Meir D, Bramante-Schreiber L, Leider-Trejo L, Karby S, Smorodinsky NI & Lavi S (2001) Protein phosphatase 2C α expression in normal human tissues: an immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol* 116, 31–39.
- 72 Michell BJ, Chen ZP, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT & Kemp BE (2001) Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 276, 17625–17629.
- 73 Cacicedo JM, Gauthier M-S, Lebrasseur NK, Jasuja R, Ruderman NB & Ido Y (2011) Acute exercise activates AMPK and eNOS in the mouse aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H1255–H1265.
- 74 Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R & Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601–605.
- 75 Zhang QJ, McMillin SL, Tanner JM, Palionyte M, Abel ED & Symons JD (2009) Endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in treadmill-running mice: role of vascular signalling kinases. *J Physiol* 587, 3911–3920.
- 76 Fisslthaler B, Fleming I, Keserü B, Walsh K & Busse R (2007) Fluid shear stress and NO decrease the activity of the hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase in endothelial cells via the AMP-activated protein kinase and FoxO1. *Circ Res* 100, e12–e21.
- 77 Zhang Y, Lee TS, Kolb EM, Sun K, Lu X, Sladek FM, Kassab GS, Garland T Jr & Shyy JY (2006) AMP-activated protein kinase is involved in endothelial NO synthase activation in response to

REVIEW

- shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26,1281–1287.
- 78 Chen Z, Peng IC, Cui X, Li Y-S, Chien S & Shyy JYJ (2010) Shear stress, SIRT1, and vascular homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 10268–10273.
- 79 Bess E, Fisslthaler B, Frömel T & Fleming I (2011) Nitric oxide-induced activation of the AMP-activated protein kinase α 2 subunit attenuates I κ B kinase activity and inflammatory responses in endothelial cells. *PLoS One* 6, e20848.
- 80 Zhao L, Fu Z, Wu J, Aylor KW, Barrett EJ, Cao W & Liu Z (2015) Globular adiponectin ameliorates metabolic insulin resistance via AMPK-mediated restoration of microvascular insulin responses. *J Physiol* 593, 4067–4079.
- 81 Achari AE & Jain SK (2017) Adiponectin, a therapeutic target for obesity, diabetes, and endothelial dysfunction. *Int J Mol Sci* 18, 1321.
- 82 Deepa SS, Zhou L, Ryu J, Wang C, Mao X, Li C, Zhang N, Musi N, DeFronzo RA, Liu F *et al.* (2011) APPL1 mediates adiponectin-induced LKB1 cytosolic localization through the PP2A-PKC ζ signaling pathway. *Mol Endocrinol* 25, 1773–1785.
- 83 Cheng KKY, Lam KSL, Wang Y, Huang Y, Carling D, Wu D, Wong C & Xu A (2007) Adiponectin-induced endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide production are mediated by APPL1 in endothelial cells. *Diabetes* 56, 1387–1394.
- 84 Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I & Quon MJ (2003) Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 278, 45021–45026.
- 85 Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T & Walsh K (2004) Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem* 279, 1304–1309.
- 86 Xie Z, Dong Y, Zhang M, Cui MZ, Cohen RA, Riek U, Neumann D, Schlattner U & Zou MH (2006) Activation of protein kinase C zeta by peroxynitrite regulates LKB1-dependent AMP-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 281, 6366–6375.
- 87 Yang S & Wang J (2015) Estrogen activates AMP-activated protein kinase in human endothelial cells via ER β /Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase kinase β Pathway. *Cell Biochem Biophys* 72, 701–707.
- 88 Bendale DS, Karpe PA, Chhabra R, Shete SP, Shah H & Tikoo K (2013) 17- β Oestradiol prevents cardiovascular dysfunction in post-menopausal metabolic syndrome by affecting SIRT1/AMPK/H3 acetylation. *Br J Pharmacol* 170, 779–795.
- 89 Leung SWS & Vanhoutte PM (2017) Endothelium-dependent hyperpolarization: age, gender and blood pressure, do they matter? *Acta Physiol* 219, 108–123.
- 90 Kim J, Yang G, Kim Y, Kim J & Ha J (2016) AMPK activators: Mechanisms of action and physiological activities. *Exp Mol Med* 48, e224.
- 91 Lu Q, Li X, Liu J, Sun X, Rousselle T, Ren D, Tong N & Li J (2019) AMPK is associated with the beneficial effects of antidiabetic agents on cardiovascular diseases. *Biosci Rep* 39, BSR20181995.
- 92 Calvert JW, Gundewar S, Jha S, Greer JJM, Bestermann WH, Tian R & Lefer DJ (2008) Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. *Diabetes* 57, 696–705.
- 93 Grahame Hardie D (2016) Regulation of AMP-activated protein kinase by natural and synthetic activators. *Acta Pharm Sin B* 6, 1–19.
- 94 Sanders MJ, Ali ZS, Hegarty BD, Heath R, Snowden MA & Carling D (2007) Defining the mechanism of activation of AMP-activated protein kinase by the small molecule A-769662, a member of the thienopyridone family. *J Biol Chem* 282, 32539–32548.
- 95 Scott JW, van Denderen BJ, Jorgensen SB, Honeyman JE, Steinberg GR, Oakhill JS, Iseli TJ, Koay A, Gooley PR, Stapleton D *et al.* (2008) Thienopyridone drugs are selective activators of AMP-activated protein kinase beta1-containing complexes. *Chem Biol* 15, 1220–1230.
- 96 Ford RJ, Teschke SR, Reid EB, Durham KK, Kroetsch JT & Rush JWE (2012) AMP-activated protein kinase activator AICAR acutely lowers blood pressure and relaxes isolated resistance arteries of hypertensive rats. *J Hypertens* 30, 725–733.
- 97 Young LH, Li J, Baron SJ & Russell RR (2005) AMP-activated protein kinase: a key stress signaling pathway in the heart. *Trends Cardiovasc Med* 15, 110–118.
- 98 Schneider H, Schubert KM, Blodow S, Kreutz CP, Erdogmus S, Wiedenmann M, Qiu J, Fey T, Ruth P, Lubomirov LT *et al.* (2015) AMPK dilates resistance arteries via activation of SERCA and BKCa channels in smooth muscle. *Hypertension* 66, 108–116.
- 99 Rodriguez C, Contreras C, Sáenz-medina J, Muñoz M, López M, Rivera L & Prieto D (2020) Activation of the AMP-related kinase (AMPK) induces renal vasodilatation and downregulates Nox-derived reactive oxygen species (ROS) generation. *Redox Biol* 34, 101575.
- 100 Cokorinos EC, Delmore J, Reyes AR, Albuquerque B, Kjøbsted R, Jørgensen NO, Tran J-L, Jatkar A, Cialdea K, Esquejo RM *et al.* (2017) Activation of skeletal muscle AMPK promotes glucose disposal and glucose lowering in non-human primates and mice. *Cell Metab* 25, 1147–1159.e10.
- 101 Myers RW, Guan H-P, Ehrhart J, Petrov A, Prahalada S, Tozzo E, Yang X, Kurtz MM, Trujillo M, Gonzalez Trotter D *et al.* (2017) Systemic pan-AMPK activator MK-8722 improves glucose

REVIEW

- homeostasis but induces cardiac hypertrophy. *Science* 357, 507–511.
- 102 Steneberg P, Lindahl E, Dahl U, Lidh E, Straseviciene J, Backlund F, Kjellkvist E, Berggren E, Lundberg I, Bergqvist I *et al.* (2018) PAN-AMPK activator O304 improves glucose homeostasis and microvascular perfusion in mice and type 2 diabetes patients. *JCI Insight* 3, e99114.
 - 103 Godo S & Shimokawa H (2017) Divergent roles of endothelial nitric oxide synthases system in maintaining cardiovascular homeostasis. *Free Radic Biol Med* 109, 4–10.
 - 104 Muñoz M, Elvira Lopez-Oliva M, Pinilla E, Pilar Martínez M, Sanchez A, Rodriguez C, Garcia-Sacristan A, Hernandez M, Rivera L & Prieto D (2017) CYP epoxygenase-derived H₂O₂ is involved in the endothelium-derived hyperpolarization (EDH) and relaxation of intrarenal arteries. *Free Radic Biol Med* 106, 168–183.
 - 105 Wang S, Xu J, Song P, Viollet B & Zou M-H (2009) *In vivo* activation of AMP-activated protein kinase attenuates diabetes-enhanced degradation of GTP cyclohydrolase I. *Diabetes* 58, 1893–1901.
 - 106 Davis BJ, Xie Z, Viollet B & Zou M-H (2006) Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis *in vivo* by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes* 55, 496–505.
 - 107 Zippel N, Loot AE, Stingl H, Randriamboavonjy V, Fleming IA-O & Fisslthaler B (2018) Endothelial AMP-activated kinase α 1 phosphorylates eNOS on Thr495 and decreases endothelial NO formation. *Int J Mol Sci* 19, 2753.
 - 108 Chen H, Vanhoutte PM & Leung SWS (2019) Acute activation of endothelial AMPK surprisingly inhibits endothelium-dependent hyperpolarization-like relaxations in rat mesenteric arteries. *Br J Pharmacol* 176, 2905–2921.
 - 109 Chen Z-P, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR & Kemp BE (1999) AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* 443, 285–289.
 - 110 Deng G, Long Y, Yu YR & Li MR (2010) Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK-eNOS Pathway. *Int J Obes (Lond)* 34, 165–171.
 - 111 Procopio C, Andreozzi F, Laratta E, Cassese A, Beguinot F, Arturi F, Hribal ML, Perticone F & Sesti G (2009) Leptin-stimulated endothelial nitric-oxide synthase via an adenosine 5⁰-monophosphate-activated protein kinase/Akt signaling pathway is attenuated by interaction with C-reactive protein. *Endocrinology* 150, 3584–3593.
 - 112 Cacicedo JM, Benjachareonwong S, Chou E, Yagihashi N, Ruderman NB & Ido Y (2011) Activation of AMP-activated protein kinase prevents lipotoxicity in retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 3630–3639.
 - 113 Xie Z, Dong Y, Scholz R, Neumann D & Zou M-H (2008) Phosphorylation of LKB1 at serine 428 by protein kinase C-zeta is required for metformin-enhanced activation of the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation* 117, 952–962.
 - 114 Boyle JG, Logan PJ, Ewart MA, Reihill JA, Ritchie SA, Connell JM, Cleland SJ & Salt IP (2008) Rosiglitazone stimulates nitric oxide synthesis in human aortic endothelial cells via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 283, 11210–11217.
 - 115 Enkhjargal B, Godo S, Sawada A, Suvd N, Saito H, Noda K, Satoh K & Shimokawa H (2014) Endothelial AMP-activated protein kinase regulates blood pressure and coronary flow responses through hyperpolarization mechanism in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 1505–1513.
 - 116 Pinilla E, Sánchez A, Martínez MP, Muñoz M, García-Sacristán A, Köhler R, Prieto D & Rivera L (2020) Endothelial KCa1.1 and KCa3.1 channels mediate rat intrarenal artery endothelium-derived hyperpolarization response. *Acta Physiol* 231, e13598.
 - 117 Jansen T, Kvandov M, Daiber A, Stamm P, Frenis K, Schulz E, Münzel T & Kröller-schön S (2020) The AMP-activated protein kinase plays a role in antioxidant defense and regulation of vascular inflammation. *Antioxidants* 9, 525.
 - 118 Colombo SL & Moncada S (2009) AMPK α 1 regulates the antioxidant status of vascular endothelial cells. *Biochem J* 421, 163–169.
 - 119 Nagata D, Mogi M & Walsh K (2003) AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling in endothelial cells is essential for angiogenesis in response to hypoxic stress. *J Biol Chem* 278, 31000–31006.
 - 120 Kim JE, Song SE, Kim YW, Kim JY, Park SC, Park YK, Baek SH, Lee IK & Park SY (2010) Adiponectin inhibits palmitate-induced apoptosis through suppression of reactive oxygen species in endothelial cells: Involvement of cAMP/protein kinase A and AMP-activated protein kinase. *J Endocrinol* 207, 35–44.
 - 121 Dong Y, Zhang M, Wang S, Liang B, Zhao Z, Liu C, Wu M, Choi HC, Lyons TJ & Zou M-H (2010) Activation of AMP-activated protein kinase inhibits oxidized LDL-triggered endoplasmic reticulum stress *in vivo*. *Diabetes* 59, 1386–1396.
 - 122 Dong Y, Zhang M, Liang B, Xie Z, Zhao Z, Asfa S, Choi HC & Zou MH (2010) Reduction of AMP-activated protein kinase α 2 increases endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis *in vivo*. *Circulation* 121, 792–803.

REVIEW

- 123 McCarty MF (2005) AMPK activation as a strategy for reversing the endothelial lipotoxicity underlying the increased vascular risk associated with insulin resistance syndrome. *Med Hypotheses* 64, 1211–1215.
- 124 Dagher Z, Ruderman N, Tornheim K & Ido Y (2001) Acute regulation of fatty acid oxidation and AMP-activated protein kinase in human umbilical vein endothelial cells. *Circ Res* 88, 1276–1282.
- 125 Xu Q & Si LY (2010) Protective effects of AMP-activated protein kinase in the cardiovascular system. *J Cell Mol Med* 14, 2604–2613.
- 126 Igata M, Motoshima H, Tsuruzoe K, Kojima K, Matsumura T, Kondo T, Taguchi T, Nakamaru K, Yano M, Kukidome D *et al.* (2005) Adenosine monophosphate-activated protein kinase suppresses vascular smooth muscle cell proliferation through the inhibition of cell cycle progression. *Circ Res* 97, 837–844.
- 127 Lee KY & Choi HC (2013) Acetylcholine-induced AMP-activated protein kinase activation attenuates vasoconstriction through an LKB1-dependent mechanism in rat aorta. *Vasc Pharmacol* 59, 96–102.
- 128 Zhang M, Dong Y, Xu J, Xie Z, Wu Y, Song P, Guzman M, Wu J & Zou M-H (2008) Thromboxane receptor activates the AMP-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells via hydrogen peroxide. *Circ Res* 102, 328–337.
- 129 Joseph BK, Liu HY, Francisco J, Pandya D, Donigan M, Gallo-Ebert C, Giordano C, Bata A & Nickels JT Jr (2015) Inhibition of AMP kinase by the protein phosphatase 2A heterotrimer, PP2A^{pp2r2d}. *J Biol Chem* 290, 10588–10598.
- 130 Salminen A, Kaarniranta K & Kauppinen A (2016) Age-related changes in AMPK activation: role for AMPK phosphatases and inhibitory phosphorylation by upstream signaling pathways. *Ageing Res Rev* 28, 15–26.
- 131 Wang S, Liang B, Viollet B & Zou M-H (2011) Inhibition of the AMP-activated protein kinase- α 2 accentuates agonist-induced vascular smooth muscle contraction and high blood pressure in mice. *Hypertension* 57, 1010–1017.
- 132 Sung JY & Choi HC (2012) Metformin-induced AMP-activated protein kinase activation regulates phenylephrine-mediated contraction of rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 421, 599–604.
- 133 Schubert KM, Qiu J, Blodow S, Wiedenmann M, Lubomirov LT, Pfitzer G, Pohl U & Schneider H (2017) The AMP-related kinase (AMPK) induces Ca²⁺-independent dilation of resistance arteries by interfering with actin filament formation. *Circ Res* 121, 149–161.
- 134 Nagata D, Takeda R, Sata M, Satonaka H, Suzuki E, Nagano T & Hirata Y (2004) AMP-activated protein kinase inhibits angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 110, 444–451.
- 135 Ferri N (2012) AMP-activated protein kinase and the control of smooth muscle cell hyperproliferation in vascular disease. *Vasc Pharmacol* 56, 9–13.
- 136 Cai Z, Ding Y, Zhang M, Lu Q, Wu S, Zhu H, Song P & Zou M-H (2016) Ablation of adenosine monophosphate-activated protein kinase α 1 in vascular smooth muscle cells promotes diet-induced atherosclerotic calcification *in vivo*. *Circ Res* 119, 422–433.
- 137 Cao X, Li H, Tao H, Wu N, Yu L, Zhang D, Lu X, Zhu J, Lu Z & Zhu Q (2013) Metformin inhibits vascular calcification in female rat aortic smooth muscle cells via the AMPK-eNOS-NO pathway. *Endocrinology* 154, 3680–3689.
- 138 Prieto D, Contreras C & Sánchez A (2014) Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. *Curr Vasc Pharmacol* 12, 412–426.
- 139 Lambeth JD (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4, 181–189.
- 140 Montezano AC & Touyz RM (2014) Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. *Antioxid Redox Signal* 20, 164–182.
- 141 Muñoz M, Martínez MP, López-Oliva ME, Rodríguez C, Corbacho C, Carballido J, García-Sacristán A, Hernández M, Rivera L, Sáenz-Medina J *et al.* (2018) Hydrogen peroxide derived from NADPH oxidase 4- and 2 contributes to the endothelium-dependent vasodilatation of intrarenal arteries. *Redox Biol* 19, 92–104.
- 142 Muñoz M, López-oliva ME, Rodríguez C, Pilar M, Sáenz-medina J, Sánchez A, Climent B, Benedito S, García-sacristán A, Rivera L *et al.* (2019) Differential contribution of Nox1, Nox2 and Nox4 to kidney vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in obesity. *Redox Biol* 28, 101330.
- 143 Zmijewski JW, Banerjee S, Bae H, Friggeri A, Lazarowski ER & Abraham E (2010) Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 285, 33154–33164.
- 144 Hinchey EC, Gruszczuk AV, Willows R, Navaratnam N, Hall AR, Bates G, Bright TP, Krieg T, Carling D & Murphy MP (2018) Mitochondria-derived ROS activate AMP-activated protein kinase (AMPK) indirectly. *J Biol Chem* 293, 17208–17217.
- 145 Zou MH, Hou XY, Shi CM, Nagata D, Walsh K & Cohen RA (2002) Modulation by peroxynitrite of Akt- and AMP-activated kinase-dependent Ser1179 phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 277, 32552–32557.
- 146 Han Y, Wang Q, Song P, Zhu Y & Zou M-H (2010) Redox regulation of the AMP-activated protein kinase. *PLoS One* 5, e15420.

REVIEW

- 147 Mungai PT, Waypa GB, Jairaman A, Prakriya M, Dokic D, Ball MK & Schumacker PT (2011) Hypoxia triggers AMPK activation through reactive oxygen species-mediated activation of calcium release-activated calcium channels. *Mol Cell Biol* 31, 3531–3545.
- 148 Emerling BM, Weinberg F, Snyder C, Burgess Z, Mutlu GM, Viollet B, Budinger GRS & Chandel NS (2009) Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. *Free Radic Biol Med* 46, 1386–1391.
- 149 Wu S & Zou MH (2020) AMPK, mitochondrial function, and cardiovascular disease. *Int J Mol Sci* 21, 1–34.
- 150 Li X-N, Song J, Zhang L, LeMaire SA, Hou X, Zhang C, Coselli JS, Chen L, Wang XL, Zhang Y *et al.* (2009) Activation of the AMPK-FOXO3 pathway reduces fatty acid-induced increase in intracellular reactive oxygen species by upregulating thioredoxin. *Diabetes* 58, 2246–2257.
- 151 Kukidome D, Nishikawa T, Sonoda K, Imoto K, Fujisawa K, Yano M, Motoshima H, Taguchi T, Matsumura T & Araki E (2006) Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes* 55, 120–127.
- 152 Cullinan SB & Diehl JA (2004) PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 279, 20108–20117.
- 153 Joo MS, Kim WD, Lee KY, Kim JH, Koo JH & Kim SG (2016) AMPK facilitates nuclear accumulation of Nrf2 by phosphorylating at serine 550. *Mol Cell Biol* 36, 1931–1942.
- 154 Wang S, Song P & Zou M-H (2012) AMP-activated protein kinase, stress responses and cardiovascular diseases. *Clin Sci (Lond)* 122, 555–573.
- 155 Brandes RP, Weissmann N & Schröder K (2014) Nox family NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Free Radic Biol Med* 76, 208–226.
- 156 Drummond GR & Sobey CG (2014) Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol Metab* 25, 452–463.
- 157 Alba G, El Bekay R, Álvarez-Maqueda M, Chacón P, Vega A, Monteseirín J, Santa Marra C, Pintado E, Bedoya FJ, Bartrons R *et al.* (2004) Stimulators of AMP-activated protein kinase inhibit the respiratory burst in human neutrophils. *FEBS Lett* 573, 219–225.
- 158 Ceolotto G, Gallo A, Papparella I, Franco L, Murphy E, Iori E, Pagnin E, Fadini GP, Albiero M, Semplicini A *et al.* (2007) Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase via AMPK-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2627–2633.
- 159 Balteau M, Van Steenberghe A, Timmermans AD, Dessy C, Behets-Wydemans G, Tajeddine N, Castanares-Zapatero D, Gilon P, Vanoverschelde JL, Horman S *et al.* (2014) AMPK activation by glucagon-like peptide-1 prevents NADPH oxidase activation induced by hyperglycemia in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 307, H1120–H1133.
- 160 Larsen BT, Bubolz AH, Mendoza SA, Pritchard KA Jr & Gutterman DD (2009) Bradykinin-induced dilation of human coronary arterioles requires NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 739–745.
- 161 Schuhmacher S, Foretz M, Knorr M, Jansen T, Hortmann M, Wenzel P, Oelze M, Kleschyov AL, Daiber A, Keaney JF Jr *et al.* (2011) alpha1AMP-activated protein kinase preserves endothelial function during chronic angiotensin II treatment by limiting Nox2 upregulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 560–566.
- 162 Wang S, Zhang M, Liang B, Xu J, Xie Z, Liu C, Viollet B, Yan D & Zou MH (2010) AMPKalpha2 deletion causes aberrant expression and activation of NAD(P)H oxidase and consequent endothelial dysfunction *in vivo*: role of 26S proteasomes. *Circ Res* 106, 1117–1128.
- 163 Song P & Zou M-H (2012) Regulation of NAD(P)H oxidases by AMPK in cardiovascular systems. *Free Radic Biol Med* 52, 1607–1619.
- 164 Eid AA, Ford BM, Block K, Kasinath BS, Gorin Y, Ghosh-Choudhury G, Barnes JL & Abboud HE (2010) AMP-activated protein kinase (AMPK) negatively regulates Nox4-dependent activation of p53 and epithelial cell apoptosis in diabetes. *J Biol Chem* 285, 37503–37512.
- 165 Decleves AE, Zolkipli Z, Satriano J, Wang L, Nakayama T, Rogac M, Le TP, Nortier JL, Farquhar MG, Naviaux RK *et al.* (2014) Regulation of lipid accumulation by AMP-activated kinase [corrected] in high fat diet-induced kidney injury. *Kidney Int* 85, 611–623.
- 166 Xie Z, Zhang J, Wu J, Viollet B & Zou MH (2008) Upregulation of mitochondrial uncoupling protein-2 by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells attenuates oxidative stress in diabetes. *Diabetes* 57, 3222–3230.
- 167 Wu JJ, Quijano C, Chen E, Liu H, Cao L, Fergusson MM, Rovira II, Gutkind S, Daniels MP, Komatsu M *et al.* (2009) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy. *Aging (Albany, NY)* 1, 425–437.

REVIEW

- 168 Inoki K, Zhu T & Guan K-L (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115, 577–590.
- 169 Roach PJ (2011) AMPK -> ULK1 -> autophagy. *Mol Cell Biol* 31, 3082–3084.
- 170 Zmijewski JW, Moellering DR, Goffe CL, Landar A, Ramachandran A & Darley-Usmar VM (2005) Oxidized LDL induces mitochondrially associated reactive oxygen/nitrogen species formation in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289, H852–H861.
- 171 Cho Y-E, Basu A, Dai A, Heldak M & Makino A (2013) Coronary endothelial dysfunction and mitochondrial reactive oxygen species in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 305, C1033–C1040.
- 172 Matsumoto S, Gotoh N, Hishinuma S, Abe Y, Shimizu Y, Katano Y & Ishihata A (2014) The role of hypertriglyceridemia in the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction. *Nutrients* 6, 1236–1250.
- 173 Li J, Wang Y, Wang Y, Wen X, Ma X-N, Chen W, Huang F, Kou J, Qi L-W, Liu B *et al.* (2015) Pharmacological activation of AMPK prevents Drp1-mediated mitochondrial fission and alleviates endoplasmic reticulum stress-associated endothelial dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 86, 62–74.
- 174 Aoki C, Suzuki K, Yanagi K, Satoh H, Niitani M & Aso Y (2012) Miglitol, an anti-diabetic drug, inhibits oxidative stress-induced apoptosis and mitochondrial ROS over-production in endothelial cells by enhancement of AMP-activated protein kinase. *J Pharmacol Sci* 120, 121–128.
- 175 Santiago E, Martinez MP, Climent B, Muñoz M, Briones AM, Salaices M, Garcia-Sacristán A, Rivera L & Prieto D (2016) Augmented oxidative stress and preserved vasoconstriction induced by hydrogen peroxide in coronary arteries in obesity: role of COX-2. *Br J Pharmacol* 173, 3176–3195.
- 176 Hardie DG & Hawley SA (2001) AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *BioEssays* 23, 1112–1119.
- 177 Laderoute KR, Amin K, Calaoagan JM, Knapp M, Le T, Orduna J, Foretz M & Viollet B (2006) 5^o-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol Cell Biol* 26, 5336–5347.
- 178 Hamanaka RB & Chandel NS (2009) Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Curr Opin Cell Biol* 21, 894–899.
- 179 Liu XM, Peyton KJ, Shebib AR, Wang H, Korhuis RJ & Durante W (2011) Activation of AMPK stimulates heme oxygenase-1 gene expression and human endothelial cell survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 300, H84–H93.
- 180 Heil M, Eitenmüller I, Schmitz-Rixen T & Schaper W (2006) Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med* 10, 45–55.
- 181 Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6, 389–395.
- 182 Chen M-H & Fu Q-M (2020) The roles of AMPK in revascularization. *Cardiol Res Pract* 2020, 4028635.
- 183 Xu MJ, Song P, Shirwany N, Liang B, Xing J, Viollet B, Wang X, Zhu Y & Zou MH (2011) Impaired expression of uncoupling protein 2 causes defective postischemic angiogenesis in mice deficient in AMP-activated protein kinase α subunits. *ArteriosclerThromb Vasc Biol* 31, 1757–1765.
- 184 Jiang S, Li T, Ji T, Yi W, Yang Z, Wang S, Yang Y & Gu C (2018) AMPK: potential therapeutic target for ischemic stroke. *Theranostics* 8, 4535–4551.
- 185 Qi D & Young LH (2015) AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart. *Trends Endocrinol Metab* 26, 422–429.
- 186 Declèves AE, Sharma K & Satriano J (2014) Beneficial effects of AMP-activated protein kinase agonists in kidney ischemia-reperfusion: autophagy and cellular stress markers. *Nephron Exp Nephrol* 128, 98–110.
- 187 Ding R, Wu W, Sun Z & Li Z (2020) AMP-activated protein kinase: an attractive therapeutic target for ischemia-reperfusion injury. *Eur J Pharmacol* 888, 173484.
- 188 Russell RR III, Li J, Coven DL, Pypaert M, Zechner C, Palmeri M, Giordano FJ, Mu J, Birnbaum MJ & Young LH (2004) AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Investig* 114, 495–503.
- 189 Shibata R, Sato K, Pimentel DR, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, Funahashi T, Ouchi N & Walsh K (2005) Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nat Med* 11, 1096–1103.
- 190 Kim AS, Miller EJ, Wright TM, Li J, Qi D, Atsina K, Zaha V, Sakamoto K & Young LH (2011) A small molecule AMPK activator protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 51, 24–32.
- 191 Edwards AG, Donato AJ, Lesniewski LA, Gioscia RA, Seals DR & Moore RL (2010) Life-long caloric restriction elicits pronounced protection of the aged myocardium: a role for AMPK. *Mech Ageing Dev* 131, 739–742.
- 192 Duan J, Guan Y, Mu F, Guo C, Zhang E, Yin Y, Wei G, Zhu Y, Cui J, Cao J *et al.* (2017) Protective effect of butin against ischemia/reperfusion-induced myocardial injury in diabetic mice: involvement of the AMPK/GSK-3 β /Nrf2 signaling pathway. *Sci Rep* 7, 41491.

REVIEW

- 193 Ding M, Wang Y, Sun D, Liu Z, Wang J, Li X, Huo C, Jia X, Chen W, Fu F *et al.* (2017) Punicalagin pretreatment attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via activation of AMPK. *Am J Chin Med* 45, 53–66.
- 194 Yu L, Gong B, Duan W, Fan C, Zhang J, Li Z, Xue X, Xu Y, Meng D, Li B *et al.* (2017) Melatonin ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in type 1 diabetic rats by preserving mitochondrial function: role of AMPK-PGC-1 α -SIRT3 signaling. *Sci Rep* 7, 41337.
- 195 Wang J, Yang L, Rezaie AR & Li J (2011) Activated protein C protects against myocardial ischemic/reperfusion injury through AMP-activated protein kinase signaling. *J Thromb Haemost* 9, 1308–1317.
- 196 Ma Y, Wang J, Gao J, Yang H, Wang Y, Manithody C, Li J & Rezaie AR (2015) Antithrombin up-regulates AMP-activated protein kinase signalling during myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Thromb Haemost* 114, 338–349.
- 197 Wang LT, Chen B-L, Wu C-T, Huang K-H, Chiang C-K & Hwa Liu S (2013) Protective role of AMP-activated protein kinase-evoked autophagy on an *in vitro* model of ischemia/reperfusion-induced renal tubular cell injury. *PLoS One* 8, e79814.
- 198 Lempiainen J, Finckenberg P, Levijoki J & Mervaala E (2012) AMPK activator AICAR ameliorates ischaemia reperfusion injury in the rat kidney. *Br J Pharmacol* 166, 1905–1915.
- 199 Seo-Mayer PW, Thulin G, Zhang L, Alves DS, Ardito T, Kashgarian M & Caplan MJ (2011) Preactivation of AMPK by metformin may ameliorate the epithelial cell damage caused by renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 301, F1346–F1357.
- 200 Mount PF, Hill RE, Fraser SA, Levidiotis V, Katsis F, Kemp BE & Power DA (2005) Acute renal ischemia rapidly activates the energy sensor AMPK but does not increase phosphorylation of eNOS-Ser1177. *Am J Physiol Renal Physiol* 289, F1103–F1115.
- 201 Krasner NM, Ido Y, Ruderman NB & Cacicedo JM (2014) Glucagon-Like peptide-1 (GLP-1) analog liraglutide inhibits endothelial cell inflammation through a calcium and AMPK dependent mechanism. *PLoS One* 9, e97554.
- 202 Hattori Y, Akimoto K, Nishikimi T, Matsuoka H & Kasai K (2006) Activation of AMP-activated protein kinase enhances angiotensin II-induced proliferation in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 47, 265–270.
- 203 Hinz M, Arslan S & Scheidereit C (2012) It takes two to tango: I κ Bs, the multifunctional partners of NF- κ B. *Immunol Rev* 246, 59–76.
- 204 Cacicedo JM, Yagihashi N, Keaney JF, Ruderman NB & Ido Y (2004) AMPK inhibits fatty acid-induced increases in NF- κ B transactivation in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 1204–1209.
- 205 Katerelos M, Mudge SJ, Stapleton D, Auwardt RB, Fraser SA, Chen C-G, Kemp BE & Power DA (2010) 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside and AMP-activated protein kinase inhibit signalling through NF- κ B. *Immunol Cell Biol* 88, 754–760.
- 206 Giri S, Nath N, Smith B, Viollet B, Singh AK & Singh I (2004) 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase. *J Neurosci* 24, 479–487.
- 207 Green CJ, Pedersen M, Pedersen BK & Scheele C (2011) Elevated NF- κ B activation is conserved in human myocytes cultured from obese type 2 diabetic patients and attenuated by AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 60, 2810–2819.
- 208 Kröll-Schön S, Jansen T, Tran TLP, Kvandová M, Kalinovic S, Oelze M, Keaney JF, Foretz M, Viollet B, Daiber A *et al.* (2019) Endothelial α 1AMPK modulates angiotensin II-mediated vascular inflammation and dysfunction. *Basic Res Cardiol* 114, 8.
- 209 Ewart MA, Kohlhaas CF & Salt IP (2008) Inhibition of tumor necrosis factor alpha-stimulated monocyte adhesion to human aortic endothelial cells by AMP-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 2255–2257.
- 210 Zhang Y, Qiu J, Wang X, Zhang Y & Xia M (2011) AMP-Activated protein kinase suppresses endothelial cell inflammation through phosphorylation of transcriptional coactivator p300. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 2897–2908.
- 211 Rutherford C, Speirs C, Williams JLL, Ewart M-A, Mancini SJ, Hawley SA, Delles C, Viollet B, Costa-Pereira AP, Baillie GS *et al.* (2016) Phosphorylation of Janus kinase 1 (JAK1) by AMP-activated protein kinase (AMPK) links energy sensing to anti-inflammatory signalling. *Sci Signal* 9, ra109.
- 212 Kim SA & Choi HC (2012) Metformin inhibits inflammatory response via AMPK–PTEN pathway in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 425, 866–872.
- 213 He C, Li H, Viollet B, Zou M-H & Xie Z (2015) AMPK suppresses vascular inflammation *in vivo* by inhibiting signal transducer and activator of transcription-1. *Diabetes* 64, 4285–4297.
- 214 Zhao X, Zmijewski JW, Lorne E, Liu G, Park Y-J, Tsuruta Y & Abraham E (2008) Activation of AMPK attenuates neutrophil proinflammatory activity and decreases the severity of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 295, L497–L504.
- 215 Rolf J, Zarrouk M, Finlay DK, Foretz M, Viollet B & Cantrell DA (2013) AMPK α 1: a glucose sensor that

REVIEW

- controls CD8 T-cell memory. *Eur J Immunol* 43, 889–896.
- 216 Blagih J, Coulombe F, Vincent EE, Dupuy F, Galicia-Vázquez G, Yurchenko E, Raissi TC, van der Windt GJW, Viollet B, Pearce EL *et al.* (2015) The energy sensor AMPK regulates T cell metabolic adaptation and effector responses *in vivo*. *Immunity* 42, 41–54.
- 217 Jeong HW, Hsu KC, Lee J-W, Ham M, Huh JY, Shin HJ, Kim WS & Kim JB (2009) Berberine suppresses proinflammatory responses through AMPK activation in macrophages. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E955–E964.
- 218 Galic S, Fullerton MD, Schertzer JD, Sikkema S, Marcinko K, Walkley CR, Izon D, Honeyman J, Chen Z-P, van Denderen BJ *et al.* (2011) Hematopoietic AMPK β 1 reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity. *J Clin Invest* 121, 4903–4915.
- 219 Mounier R, Théret M, Arnold L, Cuvelier S, Bultot L, Göransson O, Sanz N, Ferry A, Sakamoto K, Foretz M *et al.* (2013) AMPK α 1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration. *Cell Metab* 18, 251–264.
- 220 Jansen T, Kröller-Schön S, Schönfelder T, Foretz M, Viollet B, Daiber A, Oelze M, Brandt M, Steven S, Kvandová M *et al.* (2018) α 1AMPK deletion in myelomonocytic cells induces a pro-inflammatory phenotype and enhances angiotensin II-induced vascular dysfunction. *Cardiovasc Res* 114, 1883–1893.
- 221 Wunderlich CM, Hövelmeyer N & Wunderlich FT (2013) Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling in obesity. *JAKSTAT* 2, e23878.
- 222 Recio C, Oguiza A, Lazaro I, Mallavia B, Egido J & Gomez-Guerrero C (2014) Suppressor of cytokine signaling 1-derived peptide inhibits janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway and improves inflammation and atherosclerosis in diabetic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 1953–1960.
- 223 Gauthier M-S, Brien ELO, Bigornia S, Mott M, Cacicedo JM, Xu XJ, Gokce N, Apovian C & Ruderman N (2011) Decreased AMP-activated protein kinase activity is associated with increased inflammation in visceral adipose tissue and with whole-body insulin resistance in morbidly obese humans. *Biochem Biophys Res Commun* 404, 382–387.
- 224 Luo Z, Saha AK, Xiang X & Ruderman NB (2005) AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 26, 69–76.
- 225 Steinberg GR & Schertzer JD (2014) AMPK promotes macrophage fatty acid oxidative metabolism to mitigate inflammation: implications for diabetes and cardiovascular disease. *Immunol Cell Biol* 92, 340–345.
- 226 Akbar DH (2003) Effect of metformin and sulfonyleurea on C-reactive protein level in well-controlled type 2 diabetics with metabolic syndrome. *Endocrine* 20, 215–218.
- 227 Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M & Tang EHC (2017) Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. *Acta Physiol* 219, 22–96.
- 228 Vanhoutte PM (2009) Endothelial dysfunction - the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circ J* 73, 595–601.
- 229 Ruderman NB, Carling D, Prentki M & Cacicedo JM (2013) AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 123, 2764–2772.
- 230 Ruderman N & Prentki M (2004) AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov* 3, 340–351.
- 231 Steinberg GR & Kemp BE (2009) AMPK in Health and disease. *Physiol Rev* 89, 1025–1078.
- 232 Dugan LL, You YH, Ali SS, Diamond-Stanic M, Miyamoto S, DeClevés AE, Andreyev A, Quach T, Ly S, Shekhtman G *et al.* (2013) AMPK dysregulation promotes diabetes-related reduction of superoxide and mitochondrial function. *J Clin Invest* 123, 4888–4899.
- 233 García-Prieto CF, Gil-Ortega M, Aránguez I, Ortiz-Besoain M, Somoza B & Fernández-Alfonso MS (2015) Vascular AMPK as an attractive target in the treatment of vascular complications of obesity. *Vasc Pharmacol* 67–69, 10–20.
- 234 García-Prieto CF, Hernández-Nuño F, Rio DD, Ruiz-Hurtado G, Aránguez I, Ruiz-Gayo M, Somoza B & Fernández-Alfonso MS (2015) High-fat diet induces endothelial dysfunction through a down-regulation of the endothelial AMPK-PI3K-Akt-eNOS pathway. *Mol Nutr Food Res* 59, 520–532.
- 235 Ido Y, Carling D & Ruderman N (2002) Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation. *Diabetes* 51, 159–167.
- 236 Weikel KA, Cacicedo JM, Ruderman NB & Ido Y (2015) Glucose and palmitate uncouple AMPK from autophagy in human aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 308, C249–C263.
- 237 Heathcote HR, Mancini SJ, Strembitska A, Jamal K, Reihill JA, Palmer TM, Gould GW & Salt IP (2016) Protein kinase C phosphorylates AMP-activated protein kinase α 1 Ser487. *Biochem J* 473, 4681–4697.
- 238 Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M *et al.* (2000) High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 49, 1939–1945.

REVIEW

- 239 Ning J, Xi G & Clemmons DR (2011) Suppression of AMPK activation via S485 phosphorylation by IGF-I during hyperglycemia is mediated by AKT activation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 152, 3143–3154.
- 240 Lee WJ, Lee IK, Kim HS, Kim YM, Koh EH, Won JC, Han SM, Kim M-S, Jo I, Oh GT *et al.* (2005) α -lipoic acid prevents endothelial dysfunction in obese rats via activation of amp-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 2488–2494
- 241 Rossoni LV, Wareing M, Wenceslau CF, Al-Abri M, Cobb C & Austin C (2011) Acute simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via AMP-activated protein kinase and reduces contractility of isolated rat mesenteric resistance arteries. *Clin Sci* 121, 449–458.
- 242 Triggie CR & Ding H (2017) Metformin is not just an antihyperglycaemic drug but also has protective effects on the vascular endothelium. *Acta Physiol* 219, 138–151.



3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La AMPK es un complejo enzimático ubicuo que actúa como sensor principal del estado energético/metabólico celular. Se activa en condiciones de déficit de energía cuando disminuyen los niveles de ATP, como ocurre en situaciones de hipoxia y carencia de nutrientes. Tras su activación, la AMPK produce la inhibición de vías anabólicas (síntesis de TG, AG, proteínas), favoreciendo vías catabólicas (glucólisis, β -oxidación de los ácidos grasos) de generación de ATP y restaurando así la homeostasis energética y la supervivencia celular (Hardie et al., 2012; Lopez et al., 2016; Martinez-Sanchez et al., 2017; Ruderman et al., 2013). Además de su importante papel en el metabolismo, la AMPK está implicada en la regulación de otros procesos como la autofagia, la biogénesis mitocondrial, el estrés oxidativo y la inflamación y en los últimos años se ha identificado a la AMPK como reguladora de la función vascular (Almabrouk et al., 2014; Bradley et al., 2010; Chen et al., 2009; Morrow et al., 2003; Salt & Hardie, 2017).

El riñón es un órgano con una alta tasa metabólica y un gran consumo energético, representando el flujo sanguíneo renal el 25% del gasto cardíaco. La AMPK se encuentra altamente expresada en el riñón y juega un papel importante en la regulación del metabolismo lipídico y glucídico y también de procesos de la fisiología renal como el transporte de iones en células tubulares y la función normal de los podocitos (Hallows KR, 2010; Sharma et al., 2008). Sin embargo, no se conoce el papel de la AMPK en la regulación de la función vascular renal y los mecanismos implicados.

Por otro lado, la obesidad es un problema de salud pública cuya prevalencia está en aumento a nivel mundial y es un factor de riesgo para el desarrollo de otras enfermedades como la resistencia a la insulina, la hipertensión, la diabetes tipo II y dislipemias, que en su conjunto se conocen como síndrome metabólico. La obesidad y el síndrome metabólico incrementan el riesgo de sufrir complicaciones como la nefropatía diabética y la enfermedad renal crónica (ERC) (Abrass, 2004). Sin embargo, se ha demostrado que la ERC puede desarrollarse en individuos obesos no diabéticos, representando un factor de riesgo de lesión renal independiente de la diabetes y la hipertensión (De Vries et al., 2014; Kramer et al., 2005). Entre los mecanismos patológicos subyacentes en el daño renal derivado de la obesidad se encuentran, la lipotoxicidad, la secreción anormal de adipocinas, la disfunción endotelial, la inflamación y el estrés oxidativo (Amann & Benz, 2013; De Vries et al., 2014; Muñoz et al., 2018; Muñoz et al., 2015). La reducción de la actividad de la AMPK en el riñón se ha asociado con alteraciones en la función renal, inflamación y fibrosis en modelos experimentales de

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

ERC (Kikuchi et al., 2018; Satriano & Sharma, 2013) y en la nefropatía asociada con la obesidad (Decleves et al., 2011), así como con el daño tubular causado por la lipotoxicidad en modelos de obesidad inducida por dieta (Decleves et al., 2011; Decleves, Zolkipli, et al., 2014). Por lo tanto, la alteración de la AMPK a nivel renal podría estar vinculada a la disfunción vascular, al estrés oxidativo y a la inflamación en la obesidad, objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. Por último, se ha descrito que fármacos usados en el tratamiento de enfermedades metabólicas como los antidiabéticos tienen efectos beneficiosos sobre la función cardiovascular debido a la activación de la AMPK. Por ello, el potencial terapéutico del A769662, activador selectivo de la AMPK, sobre la función vascular renal, el estrés oxidativo y la inflamación se evaluará en el contexto de la obesidad.

La hipótesis del presente trabajo es que la AMPK podría regular la función vascular renal acoplando así el flujo sanguíneo renal al metabolismo del riñón y por consiguiente que la alteración de la AMPK vascular estaría implicada en la disfunción del endotelio renal, contribuyendo así a la lesión renal asociada a la obesidad. Por lo tanto, la activación de la AMPK vascular renal podría ser una diana terapéutica interesante contra la nefropatía asociada a enfermedades metabólicas (Kikuchi et al., 2018; Salatto et al., 2017).

Por todo lo expuesto anteriormente, el objetivo general de esta Tesis Doctoral fue investigar el papel de la AMPK sobre la función vascular renal en condiciones fisiológicas y en la obesidad. Los objetivos específicos del presente trabajo han sido:

1. Determinar los efectos de la activación de AMPK en la función vascular renal en arterias intrarenales de ratas Wistar y en arterias humanas
2. Caracterizar los mecanismos de acción vascular de la AMPK a nivel del endotelio y del MLV renal
3. Analizar las interacciones entre la AMPK y las NADPH oxidasas, enzimas que generan especies reactivas de oxígeno en los tejidos vasculares del riñón.
4. Valorar las variaciones en la actividad de la AMPK en la obesidad y su relación con la disfunción endotelial renal, el estrés oxidativo y la inflamación en arterias renales
5. Determinar los efectos de un activador selectivo de la AMPK sobre la función endotelial, el estrés oxidativo y la inflamación en modelos de obesidad genética



4. RESULTADOS

4.1 Activation of the AMP-related kinase (AMPK) induces renal vasodilatation and downregulates Nox-derived reactive oxygen species (ROS) generation

Claudia Rodríguez, Cristina Contreras, Javier Sáenz-Medina, Mercedes Muñoz, César Corbacho, Joaquín Carballido, Albino García-Sacristán, Medardo Hernandez, Miguel López, Luis Rivera, Dolores Prieto

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Redox Biology



Activation of the AMP-related kinase (AMPK) induces renal vasodilatation and downregulates Nox-derived reactive oxygen species (ROS) generation

Claudia Rodríguez^a, Cristina Contreras^a, Javier Sáenz-Medina^b, Mercedes Muñoz^a, César Corbacho^c, Joaquín Carballido^b, Albino García-Sacristán^a, Medardo Hernandez^a, Miguel López^d, Luis Rivera^a, Dolores Prieto^{a,*}

^a Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid, Spain

^b Departamento de Urología, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Madrid, Spain

^c Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Madrid, Spain

^d NeurObesity Group, Department of Physiology, CIMUS, Universidad de Santiago de Compostela-Instituto de Investigación Sanitaria, Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

AMPK activators
Renal arteries
IK_{Ca} channels
K_{ATP} channels
SERCA
Reactive oxygen species

ABSTRACT

AMP-activated protein kinase (AMPK) is a cellular energy sensor activated during energy stress to stimulate ATP production pathways and restore homeostasis. AMPK is widely expressed in the kidney and involved in mitochondrial protection and biogenesis upon acute renal ischemia, AMPK activity being blunted in metabolic disease-associated kidney disease. Since little is known about AMPK in the regulation of renal blood flow, the present study aimed to assess the role of AMPK in renal vascular function. Functional responses to the selective AMPK activator A769662 were assessed in intrarenal small arteries isolated from the kidney of renal tumour patients and Wistar rats and mounted in microvascular myographs to perform simultaneous measurements of intracellular calcium [Ca²⁺]_i and tension. Superoxide (O₂^{•-}) and hydrogen peroxide (H₂O₂) production were measured by chemiluminescence and fluorescence and protein expression by Western blot. Activation of AMPK with A769662 increased AMPK_α phosphorylation at Thr-172 and induced potent relaxations compared to AICAR in isolated human and rat intrarenal arteries, through both endothelium-dependent mechanisms involving nitric oxide (NO) and intermediate-conductance calcium-activated potassium (IK_{Ca}) channels, as well as activation of ATP-sensitive (K_{ATP}) channels and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) in vascular smooth muscle (VSM). Furthermore, AMPK activator reduced NADPH oxidase 4 (Nox4) and Nox2-derived reactive oxygen species (ROS) production. These results demonstrate that A769662 has potent vasodilator and antioxidant effects in intrarenal arteries. The benefits of AMPK activation in rat kidney are reproduced in human arteries and therefore vascular AMPK activation might be a therapeutic target in the treatment of metabolic disease-associated kidney injury

1. Introduction

AMPK is an ubiquitous heterotrimeric kinase considered as a master energy sensor/metabolic switch that is activated during energy stress in response to ATP depletion, to preserve cell survival under low-caloric conditions [1–4]. As the ratio of AMP/ATP increases, activation of AMPK turns on ATP-generating pathways (e.g. glucose uptake, glycolysis, fatty acid oxidation) and reduces ATP-consuming pathways (free fatty acid – FFA-, triglyceride and protein synthesis) [1]. AMPK is made up of a catalytic α-subunit (α₁ and α₂), a structural β-subunit (β₁ and β₂), and the AMP-binding site containing γ-subunit (γ₁, γ₂ and γ₃). AMPK activation requires phosphorylation of the α-subunit and occurs

in response to increased AMP/ATP ratio, as well as through phosphorylation by upstream kinases such as the tumor suppressor liver kinases B1 (LKB1) or the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase β (CAMKKβ) [2].

AMPK is not only involved in metabolism but also in the regulation of physiological processes such as mitochondria biogenesis, cell growth and proliferation, inflammation, oxidative stress and cell autophagy. AMPK also plays a key role in cardiovascular function, in part through phosphorylation and activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells and cardiomyocytes [5–9]. By stimulating nitric oxide (NO) production, the AMPK-eNOS endothelial signalling pathways is involved in endothelium-dependent vasodilatation [10] in

* Corresponding author. Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 28040, Madrid, Spain.

E-mail address: dprieto@ucm.es (D. Prieto).

<https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101575>

Received 9 April 2020; Accepted 10 May 2020

Available online 16 May 2020

2213-2317/© 2020 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abbreviations

AMPK	AMP-activated protein kinase
ACh	acetylcholine
BK _{Ca} channel	large-conductance calcium-activated K ⁺ channel
COX	cyclooxygenase
EC	endothelial cell
EDH	endothelium-derived-hyperpolarization
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
IK _{Ca} channel	intermediate-conductance calcium-activated K ⁺ channel

K _{ATP}	ATP-sensitive potassium channels
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
Nox	NADPH oxidase enzymes
O ₂ ⁻	superoxide
Phe	phenylephrine
PSS	physiological saline solution
ROS	reactive oxygen species
SERCA	sarcoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATP _{ase}
VSM	vascular smooth muscle

response to physiological stimuli such as shear stress [7,11,12] or adipokines acting via Gq receptors like adiponectin and leptin [1].

The kidney is an organ with one of the highest energy consumption rates in the body, used for the regulation of fluids and electrolytes homeostasis and for waste excretion, and renal blood flow represents about 25% of cardiac output. AMPK is highly expressed in the kidney and regulates activity of various ion and creatinine transporters in renal tubular cells and reduces podocyte permeability and albuminuria upon kinase activation with adiponectin [13,14]. Acute renal ischemia is a potent activator of AMPK which induces cell survival mechanisms including mitochondrial protection and biogenesis [15], suppression of extracellular matrix proteins [16] and induction of autophagy [17]. Accordingly, AMPK activators have been shown to be protective and attenuate ischemia-reperfusion injury in canine models of renal transplantation and in rat models of kidney ischemia-reperfusion injury [18–20]. On the other hand, AMPK has been reported to exert antioxidant effects in the cardiovascular system by inhibiting the expression and activity of NADPH oxidase (Nox) subunits, suggestive of potential crosstalk between AMPK and Nox, despite how AMPK suppresses Nox remains to be clarified [21].

Reduced renal AMPK activity has been associated to impaired renal function and inflammation in the kidney of diabetic patients [22], in obesity-associated nephropathy [23] and in experimental models of chronic kidney disease [24,25], and is involved in renal inflammation and fibrosis [23]. Therefore, AMPK activation has recently been proposed as a therapeutic target of metabolic disease-associated nephropathy and experimental chronic kidney disease. Cardiovascular-protective effects of AMPK are well characterized [26] and many therapeutic agents used for the treatment of diabetes and atherosclerosis, including metformin, thiazolidinediones and statins may exert their cardiovascular protective effects by activation of AMPK [27–29]. However, despite the role of AMPK in kidney function and dysfunction is well established, little is known about its role in the regulation of renal vascular function.

The hypothesis of the present study is that activation of AMPK may regulate renal vascular function thus coupling renal blood flow to kidney metabolism. Therefore, we sought to investigate AMPK vasodilator effects in human renal arteries and to identify AMPK targets in kidney arterial tissue. For this, we assessed the contribution of the eNOS-NO endothelium-dependent pathway, as well as vascular smooth muscle (VSM) relaxant mechanisms involving K⁺ channels and the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA). Moreover, the interaction between AMPK and Nox-mediated mechanisms generating reactive oxygen species (ROS) in kidney vascular tissues were also investigated.

2. Methods

2.1. Animal model

Male Wistar rats were housed and maintained on standard chow and

water *ad libitum* at the Pharmacy School animal care facility. They were killed by decapitation and exsanguination at 12–14 weeks. The kidneys, heart and mesentery were quickly removed and placed in cold (4 °C) physiological saline solution (PSS) of the following composition (mM): NaCl 119, NaHCO₃ 25, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.17, MgSO₄ 1.18, CaCl₂ 1.5, EDTA 0.027 and glucose 11, continuously gassed with a mixture of 5% CO₂/95% O₂ to maintain pH at 7.4. Animal care and experimental protocols conformed to the European Union Directive 2010/63/EU on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes and were approved by the Animal Care and Use Committee of Complutense University of Madrid. All animal experiments are reported in compliance with the ARRIVE Guidelines.

2.2. Patients

Intrarenal arteries and cortex samples were obtained from the kidney of renal tumour patients who underwent nephrectomy as earlier reported [30]. The investigation with human tissue conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Permission was obtained from the Ethics Committee of the University Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda, Spain (Reg. no 5.16) and patients gave their informed consent.

2.3. Dissection and mounting of microvessels

Renal interlobar or arcuate arteries, 2nd-4th order branches of the main renal artery were carefully dissected by removing the surrounding connective tissue from tumour-free parts of the kidney of human patients, or kidney of Wistar rats. For some experiments, mesenteric resistance arteries and coronary arteries of Wistar rats were dissected. Small samples of both renal arteries and cortex were also dissected out for ROS measurements, as described earlier [30]. Arterial segments were mounted in microvascular myographs (Danish Myotechnology, Denmark) by inserting two 40 µm tungsten wires into the vessel lumen and were equilibrated for 30 min in PSS maintained at 37 °C. The relationship between passive wall tension and internal circumference was determined for each individual artery and from this, the internal circumference, L₁₀₀, corresponding to a transmural pressure of 100 mmHg for a relaxed vessel in situ was calculated. The arteries were set to an internal diameter I₁ (I₁ = 0.9 × L₁₀₀) at which tension development is maximal.

2.4. Experimental procedures for the functional experiments

At the beginning of each experiment, arteries were challenged twice with 120 mM K⁺ (KPSS) in order to test vessel viability. Concentration-responses curves to the endothelial agonist acetylcholine (ACh) and to the β-adrenergic agonist isoprenaline were performed to assess arterial function on arteries precontracted with phenylephrine (Phe) (0.1–0.5 µM). The effects of the AMPK selective activator A769662 (Tocris Cookson, Bristol, UK) was assessed in intrarenal, coronary and

mesenteric arteries precontracted with Phe and responses to A769662 were added in a second concentration-curve in order to test whether the relaxations were reproducible (Fig. S1). The relaxant responses of A769662 were compared to those elicited by the AMPK activator (AICAR) (Tocris Cookson, Bristol, UK) by adding cumulative concentrations of these agents on arteries precontracted with Phe. The AMPK inhibitor (compound C, 0.5 μ M) (Tocris Cookson, Bristol, UK) was tested on the relaxations to the AMPK activators and was added to the myograph chamber 30 min before a second concentration-response curve was performed. To evaluate whether the relaxant effect of AMPK was endothelium-dependent, endothelium-intact and endothelium-denuded rat and human renal arterial segments were pre-contracted with Phe and treated with A769662. The endothelium was mechanically removed by inserting a human hair in the vessel lumen and guiding it back and forwards several times. The absence of functional endothelium was confirmed by lack of the relaxation to ACh (10 μ M), as earlier described [31]. Functional responses to A769662 were further obtained in the absence and presence of NOS synthase inhibitor (L- NOARG, 100 μ M) (Sigma-Aldrich, Spain), inhibitors of intermediate- conductance K_{Ca} channels (IK_{Ca} , TRAM-34 1 μ M) (Tocris Cookson, Bristol, UK), large-conductance K_{Ca} channels (BK_{Ca} , iberiotoxin 0.3 μ M) (Tocris Cookson, Bristol, UK), Kir6 ATP-sensitive K channels (K_{ATP} , glibenclamide 1 μ M) (Tocris Cookson, Bristol, UK) or the inhibitor of SERCA ATPase, cyclopiazonic acid (CPA, 10 μ M) (Tocris Cookson, Bristol, UK) in rat and human renal arteries.

2.5. Measurements of VSM intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$)

Simultaneous measurements of VSM $[Ca^{2+}]_i$ and tension in intact renal interlobar arteries were performed as described earlier [31]. Arterial segments were mounted in a microvascular myograph placed on an inverted microscope (Zeiss Axiovert S100 TV) equipped for dual excitation wavelength microfluorimetry. Arteries were incubated in the

dark in PSS with 8 μ M Fura 2-acetoxymethyl ester (Fura 2-AM) (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies SA, Madrid, Spain) and 0.05% Cremophor EL. After Fura-2-AM loading, arteries were washed for 30 min in PSS and were illuminated with alternating 340 nm and 380 nm light using a monochromator-based system (Deltascan, PTI). Simultaneous measurements of $[Ca^{2+}]_i$ and tension by Fura2-AM fluorescence were performed in rat interlobar arteries to further study AMPK-mediated calcium-dependent mechanisms in VSM. The ratio (R) F340/F380 was taken as a measure of $[Ca^{2+}]_i$. Time-response curves to 10 μ M of the AMPK selective activator A769662 were performed in renal arteries with intact endothelium pre-contracted with Phe or with 30 mM K^+ in the absence and presence of inhibitor of IK_{Ca} TRAM-34 (1 μ M). In order to restrict Ca^{2+} measurements to VSM when assessing the role of VSM K^+ channels or SERCA ATPase, experiments were performed in renal endothelium-denuded arteries pre-contracted with Phe. Then time-response curves to 10 μ M A769662 were performed in the absence and presence of inhibitors of BK_{Ca} channels (iberiotoxin, 0.3 nM), K_{ATP} channel (glibenclamide, 1 μ M) or SERCA ATPase (CPA, 10 μ M).

2.6. Measurement of superoxide production by chemiluminescence

Changes in basal and NADPH-stimulated levels of superoxide (O_2^-) were measured by lucigenin chemiluminescence in renal arteries and cortex of wistar rats and human samples, as earlier reported [30,31]. Cortex samples and segments of the renal interlobar arteries were dissected and equilibrated in PSS for 30 min at room temperature and then incubated in the absence (basal) and presence of AMPK selective activator A769662 (30 μ M) and the NADPH oxidase inhibitor Nox2ds-tat (1 μ M) (AnaSpec Seraing, Belgium) for 30 min at 37 $^{\circ}$ C. Samples were then transferred to microtiter plate wells containing 5 μ M bis-N-me-

ROS sources inhibitors and then stimulated with NADPH (100 μ M) which was added prior to ROS measurements. In another set of experiments, the protein kinase C activator phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu, 10 μ M) (Tocris Cookson, Bristol, UK) was used instead of NADPH in order to indirectly stimulate the Nox2-derived superoxide production. Chemiluminescence was measured in a luminometer (BMG Fluostar Optima), and for calculation baseline values were subtracted from the counting values under the different experimental conditions and superoxide production was normalized to dry tissue weight.

2.7. Measurement of hydrogen peroxide by Amplex Red

Hydrogen peroxide (H_2O_2) production was measured by Amplex Red assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies SA, Madrid, Spain) in renal arteries and cortex of wistar rats [30,31]. Samples were equilibrated in HEPES-physiological saline solution (PSS) for 30 min at room temperature and then incubated in the absence (basal) and presence of AMPK selective activator A769662 (30 μ M) for 30 min at 37 $^{\circ}$ C. Arteries and cortex samples were then transferred to microtiter plate black wells containing 10 mM final concentration (Amplex Red) and 10 U/ml final concentration (horseradish peroxidase) and some samples were stimulated with NADPH (100 μ M) just prior to determination. Fluorescence was measured in a fluorimeter (BMG Fluostar Optima), using an excitation filter of 544 nm and an emission filter of 590 nm. Background fluorescence was subtracted from the counting values under the different experimental conditions and H_2O_2 production was normalized to dry tissue weight.

2.8. Western blot analysis

Renal arterial tissue incubated 30 min with A769662, or vehicle were snap frozen in liquid nitrogen, homogenized and lysed in buffer containing Tris-HCl (pH 7.5) 50 mmol/L, EGTA 1 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, Triton X-100 1% vol/vol, sodium orthovanadate 0.1 mmol/L, thylacridinium nitrate (lucigenin) in the absence and presence of different sodium fluoride 50 mmol/L, sodium pyrophosphate 5 mmol/L, sucrose 0.27 mol/L and protease inhibitor cocktail. The protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, S.A, Madrid, Spain). Protein lysates (7 μ g) were subjected to 6.5% SDS- PAGE, electrotransferred on a polyvinylidene fluoride membrane and probed with the following primary antibodies: pACC Ser⁷⁹ (1:1000; ref 3661), pAMPK α Thr¹⁷² (1:1000; ref 2535), AMPK $\alpha_{1/2}$ (1:1000; ref 2532) from Cell Signaling Technology (Leiden, The Netherlands); NADPH oxidase 4 (1:500; ref ab154244) from Abcam (Cambridge, UK); β -actin (1:5000; ref. A5316) from Sigma (St. Louis, MO, USA) [4,32]. The blots were visualized using enhanced chemiluminescence and quantified by densitometry with ImageJ free software. Values were expressed in relation to β -actin protein levels.

2.9. Data presentation and statistical analysis

Results are expressed as either absolute values (units of R (F340/F380) or Nm^{-1} of tension) or as a percent of the response to either Phe or KPSS in each artery, as means \pm SEM of 6–10 arteries from 4 to 12 rats (1–2 artery from each animal) for the functional experiments. For the measurement of O_2^- or H_2O_2 production, results are expressed in counts per minute (cpm) per mg of tissue and relative fluorescence units (RFU) per mg of tissue in arterial segments and cortex samples, respectively, as means \pm SEM of 5–7 patients or means \pm SEM of 4–10 rats. Statistical significance was determined by using paired or unpaired Student's t-test where appropriate, or one-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test for comparisons involving more than two groups. $P < 0.05$ were considered statistically significant. Calculations were made using a standard software package (GraphPad Prism 5.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, United States).

3. Results

3.1. AMPK activation relaxes intrarenal arteries

Normalized internal lumen diameters, l_1 , vasomotor responses and endothelium-dependent relaxations of human renal arteries are shown in Table 1. Since vascular AMPK has recently been identified as a potent vasodilator in resistance arteries [33], the effects of the AMPK selective activator A769662 (3 μ M and 10 μ M) were assessed in interlobar arteries from human and rat kidney, as well as in rat mesenteric and coronary arteries, in order to compare the renal vascular effects of A769662 to that in small arteries from systemic and coronary vascular beds. AMPK activation produced potent relaxations of both human and rat intrarenal arteries (Fig. 1 a and c) and also in mesenteric resistance arteries (Fig. 1e). Notably, A769662 did not have significant relaxant effects in precontracted coronary arteries (Fig. 1g). The relaxations elicited by AMPK activation were compared to those evoked by the endothelium-dependent agonist ACh or the β -adrenoceptor agonist isoprenaline in each arterial bed (Fig. 1b, d, f and h). Relaxant responses to A769662 were reproducible in rat and human renal arterial segments (Supplementary Fig. S1).

Pharmacological characterization of AMPK activation in intrarenal arteries was performed by constructing concentration-response curves to two different AMPK activators: A769662 that selectively binds the AMPK β_1 subunit and AICAR, an unspecific and allosteric AMPK activator (Fig. 2a). A769662-elicited relaxations were about 2.5 orders of magnitude more potent than those produced by AICAR (Table 2), and therefore A769662 was used in the subsequent experiments. Treatment for 30 min with the AMPK inhibitor (compound C, 0.5 μ M) inhibited the relaxant responses elicited by both A769662 and AICAR in a second concentration-response curve (Fig. 2b and c; Table 2).

Western blot analysis confirmed that activity of AMPK was augmented by A769662 in intrarenal arteries as depicted by the 3-fold enhancement of AMPK α phosphorylation at Thr-172 after 20 min incubation with A769662 (Fig. 2d and e). In addition, A769662 increased phosphorylation of the AMPK's downstream target acetyl-CoA carboxylase (ACC) in renal arteries (Fig. 2f).

3.2. A769662 induces relaxations by endothelial NO release

AMPK plays a role in cardiovascular function in part through phosphorylation and activation of eNOS in endothelial cells and cardiomyocytes [8]. In order to assess the contribution of the endothelium to the relaxant responses of AMPK, human and rat renal arterial segments with intact endothelium or endothelium-denuded pre-contracted with Phe were stimulated with A769662 (3 and 10 μ M). Both mechanical endothelium removal and (Fig. 3 a and c) and inhibition of NOS with L-NOARG (Fig. 3 b and d) markedly reduced A769662-evoked relaxations thus suggesting that the vasodilator mechanism of AMPK is in part dependent on the vascular endothelium and involves the eNOS-NO pathway.

3.3. A769662 reduces VSM $[Ca^{2+}]_i$ and activates endothelial IK_{Ca} channels and VSM K_{ATP} sensitive channels to induce relaxation

Simultaneous measurements of VSM $[Ca^{2+}]_i$ and tension were performed in rat interlobar arteries to further investigate the role of AMPK in calcium-dependent mechanisms of human renal vasodilation. Time-response curves to 10 μ M of the AMPK selective activator A769662 produced relaxations that were accompanied by simultaneous decreases in VSM $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 4a) However, relaxations elicited by A769662 were larger than the corresponding decreases in VSM $[Ca^{2+}]_i$, thus suggesting the involvement of Ca^{2+} -desensitization mechanisms (Fig. 4b), as confirmed by tension- $[Ca^{2+}]_i$ relationships for A769662 (Fig. 4c).

A769662-induced relaxations and $[Ca^{2+}]_i$ decreases were abolished

when raising the extracellular K^+ concentration (Fig. 4d and e) which suggests that K^+ efflux and hyperpolarization mechanisms are in part responsible for the AMPK relaxant effects in renal arteries. Since K_{Ca} channels have recently been involved in AMPK relaxant mechanisms in small arteries [33], the effects of selective K_{Ca} inhibitors were assessed in the AMPK responses of endothelium-intact renal arteries. Treatment with the inhibitor of IK_{Ca} channels TRAM-34 significantly reduced A769662-evoked relaxations in human renal arteries (Fig. 5a and b), and this inhibition was confirmed in rat intrarenal arteries as shown in Fig. 5e. Moreover, IK_{Ca} channel blockade caused a significant reversion of the decreases in $[Ca^{2+}]_i$ evoked by A769662 (Fig. 5c and d). In order to determine whether VSM BK_{Ca} channels may be involved in the relaxant mechanism of A-769662, as recently reported for small mesenteric arteries [33], the selective inhibitor of BK_{Ca} channels iberiotoxin was used in endothelium-denuded rat intrarenal arteries. A769662-elicited relaxations and $[Ca^{2+}]_i$ -decreasing effects were not sensitive to iberiotoxin (Fig. 5f and g). Therefore, the fact that A-769662-induced relaxations were sensitive to TRAM-34 in endothelium intact arteries but not to iberiotoxin in endothelium-denuded microvessels, suggests that AMPK activation might have a major effect on IK_{Ca} channels expressed in endothelial cells.

In the kidney, ATP-sensitive potassium channels (K_{ATP}) are localized in tubular epithelial cells, glomerular mesangial cells and VSM of renal blood vessels [34]. Activation of arterial smooth muscle K_{ATP} channels produces smooth muscle hyperpolarization leading to a reduction in $[Ca^{2+}]_i$ and vasodilatation [35]. Therefore, we assessed whether K_{ATP} channels might be involved in the relaxant responses elicited by AMPK activation in renal small arteries. Treatment with the selective K_{ATP} channel inhibitor glibenclamide markedly reduced A769662-evoked relaxations in human renal arteries (Fig. 6a and b) and significantly inhibited decreases in $[Ca^{2+}]_i$ induced by A-769662 in rat renal arteries (Fig. 6c and d).

3.4. Activation of SERCA is involved in the relaxations of A-769662

SERCA is an important and potent modulator of smooth muscle $[Ca^{2+}]_i$ and therefore the effects of the selective SERCA inhibitor cyclopiazonic acid (CPA, 10 μ M) on changes in VSM $[Ca^{2+}]_i$ and relaxation produced by AMPK activation were further explored in endothelium-denuded renal arteries, as shown in Fig. 7. Treatment with CPA induced a marked inhibition of the relaxations of A769662 in renal microvessels (Fig. 7a and b), suggesting that AMPK activates SERCA in VSM to produce vasodilation of human intrarenal arteries. This relaxant mechanism was confirmed in rat intrarenal arteries since treatment with CPA significantly reduced the VSM $[Ca^{2+}]_i$ -decreasing effects of A769662 (Fig. 7c and d).

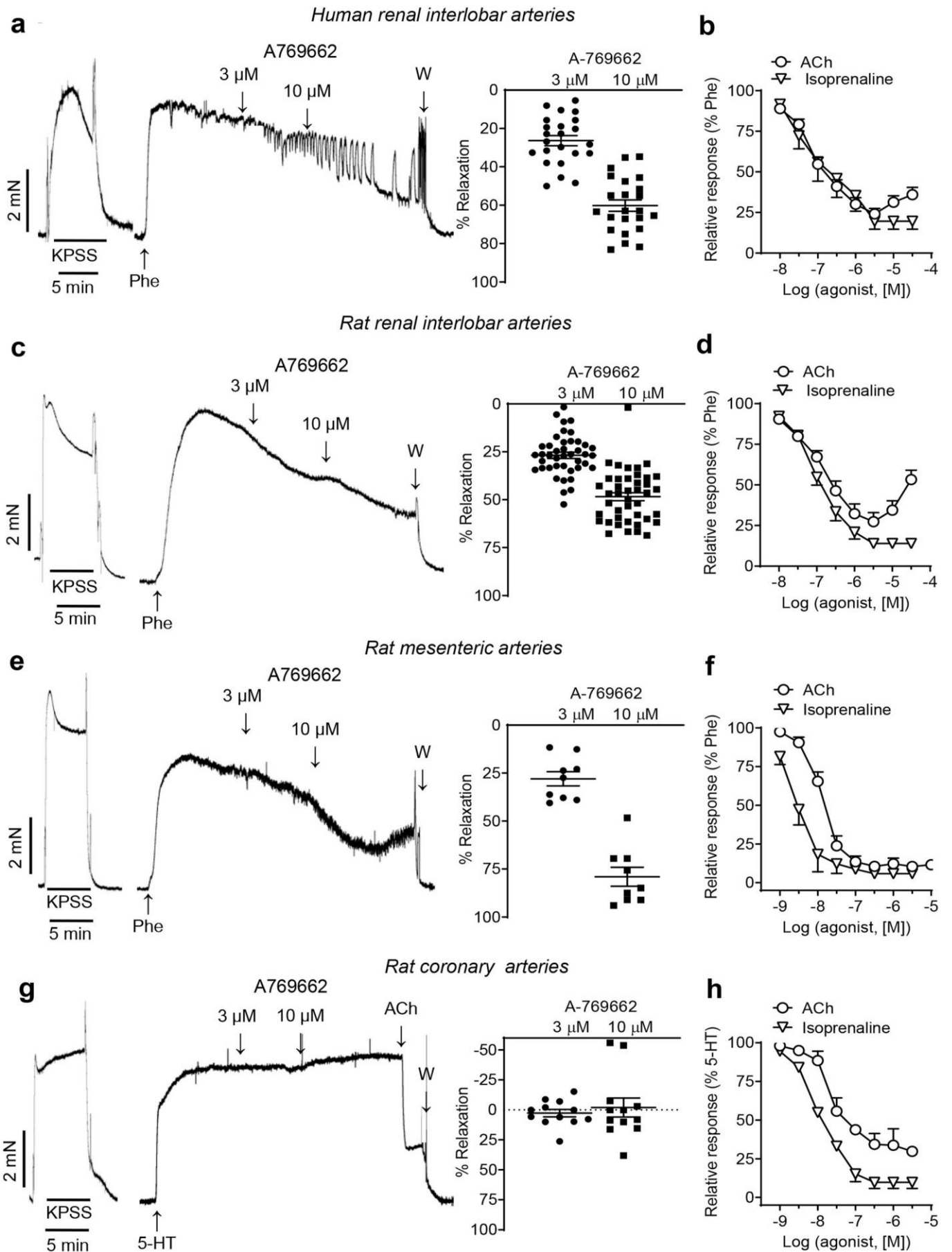
3.5. A769662 reduces ROS generation through inhibition of Nox2 and Nox4

AMPK is known to modulate reactive oxygen species (ROS) generation in the vascular endothelium [21] and therefore we explored whether AMPK activation plays a role in the regulation of ROS in the renal vascular wall. Basal $O_2^{\bullet -}$ levels were enhanced by NADPH addition and acute treatment with the AMPK activator A769662 induced a

Table 1
Vasomotor function of the human intrarenal arteries.

		n
l_1 (μ m)	454 \pm 28	25
KPSS (Nm $^{-1}$)	1.97 \pm 0.30	28
ACh (Relaxation %)	73.4 \pm 4	26

Values represent mean \pm S.E.M. of the number n of individual arteries, 3–4 from each patient (7 patients). l_1 is the effective lumen diameter of the arteries.



(caption on next page)

Fig. 1. AMPK activation induces vasorelaxation of renal and mesenteric but not coronary arteries

Original recordings showing A769662-induced relaxations of intact renal interlobar arteries from human (a) and rat (c) kidney and rat mesenteric arteries (e), and the lack of effect of AMPK activator in coronary arteries from rat (g). Average vasorelaxant effects of A769662 (3 μ M and 10 μ M) (a,c,e,g) compared to those of the endothelial agonist acetylcholine (ACh) and the β -adrenoceptor isoprenaline (b,d,f,h) in rat renal, mesenteric and coronary arteries. Results are expressed as percentage of the increases in tension induced by phenylephrine (Phe) or serotonin (5-HT) for coronary arteries. Data are shown as the mean \pm SEM of 9–28 arteries from 6–14 rats (1–2 per animal) and as the mean \pm SEM of 20 arteries from 7 patients.

powerful inhibition of NADPH-derived $O_2^{\cdot-}$ production in samples of arteries and cortex from human and rat kidneys (Fig. 8a and b). Since Nox2 and Nox4 are involved in kidney physiological processes and are a source of vasodilator H_2O_2 in the renal endothelium [30], we next assessed whether these Nox subunits are targets of A769662 antioxidant action in renal arteries. Basal H_2O_2 production assessed by Amplex Red fluorescence assay was markedly increased by NADPH addition and blunted by the AMPK activator in both renal interlobar arteries and cortex from rats (Fig. 8c). Furthermore, Western blot analysis showed that protein levels of Nox4 were significantly reduced in renal arteries acutely treated with A769662 (Fig. 8d), thus suggesting that AMPK activation downregulates Nox4-derived arterial H_2O_2 production.

To assess the involvement of Nox2 in the antioxidant action of AMPK, the effects of A769662 on NADPH-stimulated $O_2^{\cdot-}$ production were measured in the absence and presence of the selective Nox2 inhibitor, Nox2ds-tat, that inhibits the assembly of the cytosolic subunit p47^{phox} with Nox2 thus blocking enzyme activity. NADPH-derived $O_2^{\cdot-}$ levels were reduced to a similar extent by both Nox2ds-tat and A769662, and combined treatment with the AMPK activator and the Nox2 inhibitor did not further inhibit NADPH-derived $O_2^{\cdot-}$ production

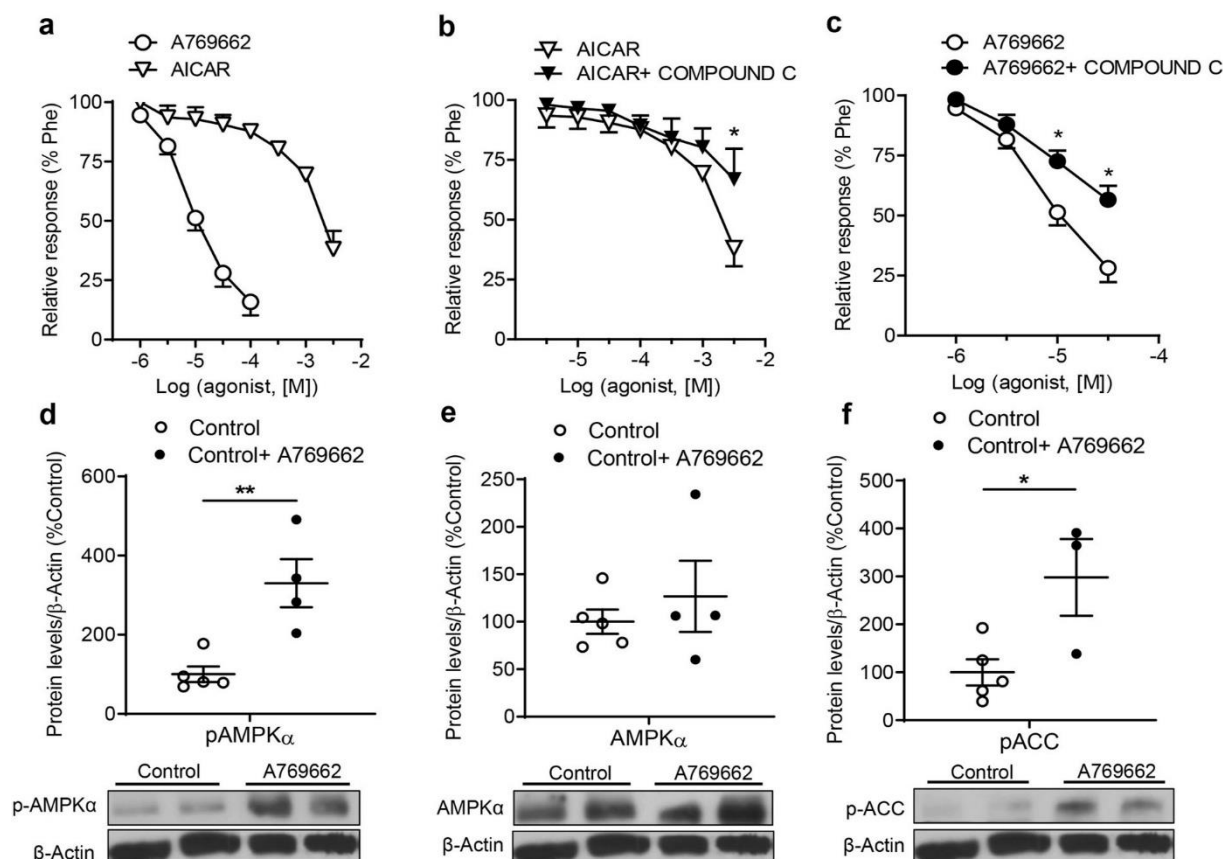
Table 2

Relaxant effects of the AMPK activators AICAR and A769662 and effect of the AMPK inhibitor compound C in rat renal interlobar arteries.

	pEC ₅₀ (%)	E _{max} (%)	n	I ₁ (μ m)
A769662	4.92 \pm 0.05	71.9 \pm 5.7	6	308 \pm 16
+ Compound C	3.89 \pm 0.15**	43.5 \pm 6**	6	312 \pm 16
AICAR	2.67 \pm 0.09***	61.8 \pm 0.9	6	316 \pm 17
+ Compound C	1.79 \pm 0.1*	33.1 \pm 13	6	326 \pm 15

Values represent mean \pm S.E.M. of the number *n* of individual arteries, 1–2 per animal. pEC₅₀ is $-\log EC_{50}$, EC₅₀ being the agonist concentration giving half-maximal relaxation; E_{max} = maximal relaxation (% Phe). Significant differences were analyzed by ANOVA or paired or unpaired Student *t*-test. **P* < 0.05; ***P* < 0.01 versus control before treatment and ****P* < 0.001 versus A769662.

(Fig. 8e). To confirm that A769662 may have the same pharmacological target as Nox2ds-tat, the PKC activator PDBu was used, since PKC augments assembly of p47^{phox} with Nox2 thus stimulating Nox2 activity

**Fig.2. A769662-induced potent relaxations compared to AICAR- and phosphorylates AMPK and ACC in renal arteries**

Relaxant responses of AMPK activation with A769662 vs AICAR in renal arteries from rats (a) and inhibitory effect of compound C (0.5 μ M) (b,c). Data are shown as the mean \pm SEM of 6–8 arteries from 6 rats. Western blots analysis for pAMPK α (d), AMPK α (e) and pACC α (f) protein levels in samples of renal arteries from rats with or without acute treatment with A769662 (10 μ M). Results were quantified by densitometry and presented as a ratio of density of the protein band vs that of β -actin from the sample. Data are shown as the mean \pm SEM of 4–5 animals. Statistical significant differences between means were analyzed by using unpaired Student's *t*-test **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs control.

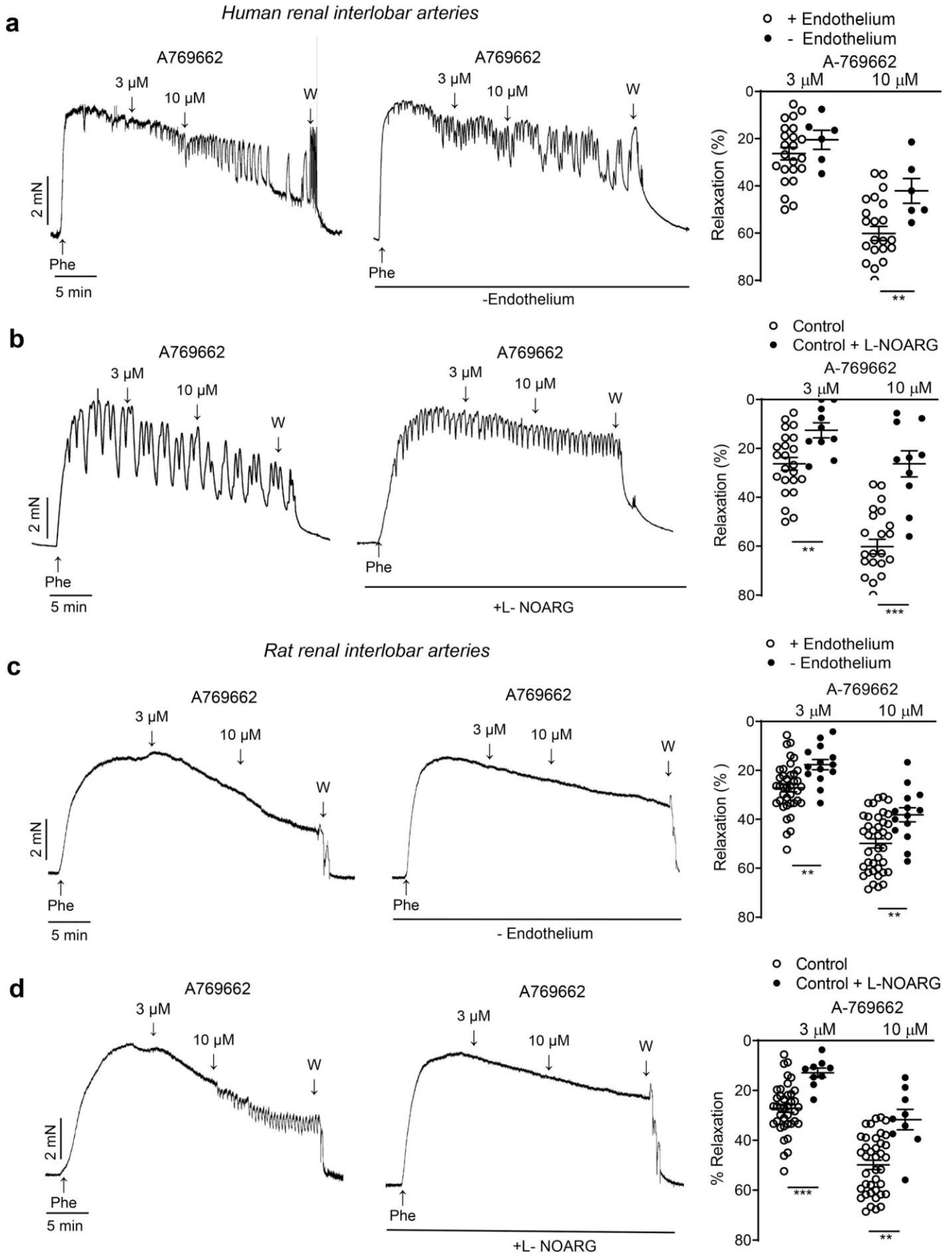


Fig. 3. Endothelial-derived NO is involved in the relaxations induced by AMPK activation in renal arteries

Original recordings showing the inhibitory effects of mechanical endothelium removal and NOS blockade with L-NOARG (100 μ M) on the relaxations induced by AMPK activator A7699662 in intrarenal arteries from human (a,b) and rat (c,d) kidney. Results are expressed as percentage of the increases in tension induced by phenylephrine (Phe). Data are shown as the mean \pm SEM of 5–15 rats (1–2 arteries per animal) and as the mean \pm SEM of 4–7 patients (2–3 arteries per patient). Statistical significant differences between means were analyzed by paired Student's *t*-test ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

and ROS production. Basal $O_2^{\cdot-}$ levels were significantly increased by PDBu addition as shown in Fig. 8f. PDBu-stimulated $O_2^{\cdot-}$ levels were significantly larger in cortex than in renal arteries and were blunted by Nox2ds-tat and A769662 in both arteries and cortex samples (Fig. 8f), thus suggesting overlapping mechanisms.

4. Discussion

Previous studies have shown that AMPK serves a role in renal

physiology by mediating kidney cell survival mechanisms upon activation by acute ischemia and by regulating activity of various tubular cell transporters [13–15,20]. Moreover, AMPK activation is protective in metabolic disease-associated nephropathy wherein AMPK activity is blunted [23]. The present findings demonstrate that AMPK might be involved in metabolic regulation of renal blood flow, since activation of this kinase causes vasodilatation of human renal arteries through both endothelium-dependent and direct VSM mechanisms; moreover, our data show that AMPK also modulates Nox-derived ROS production.

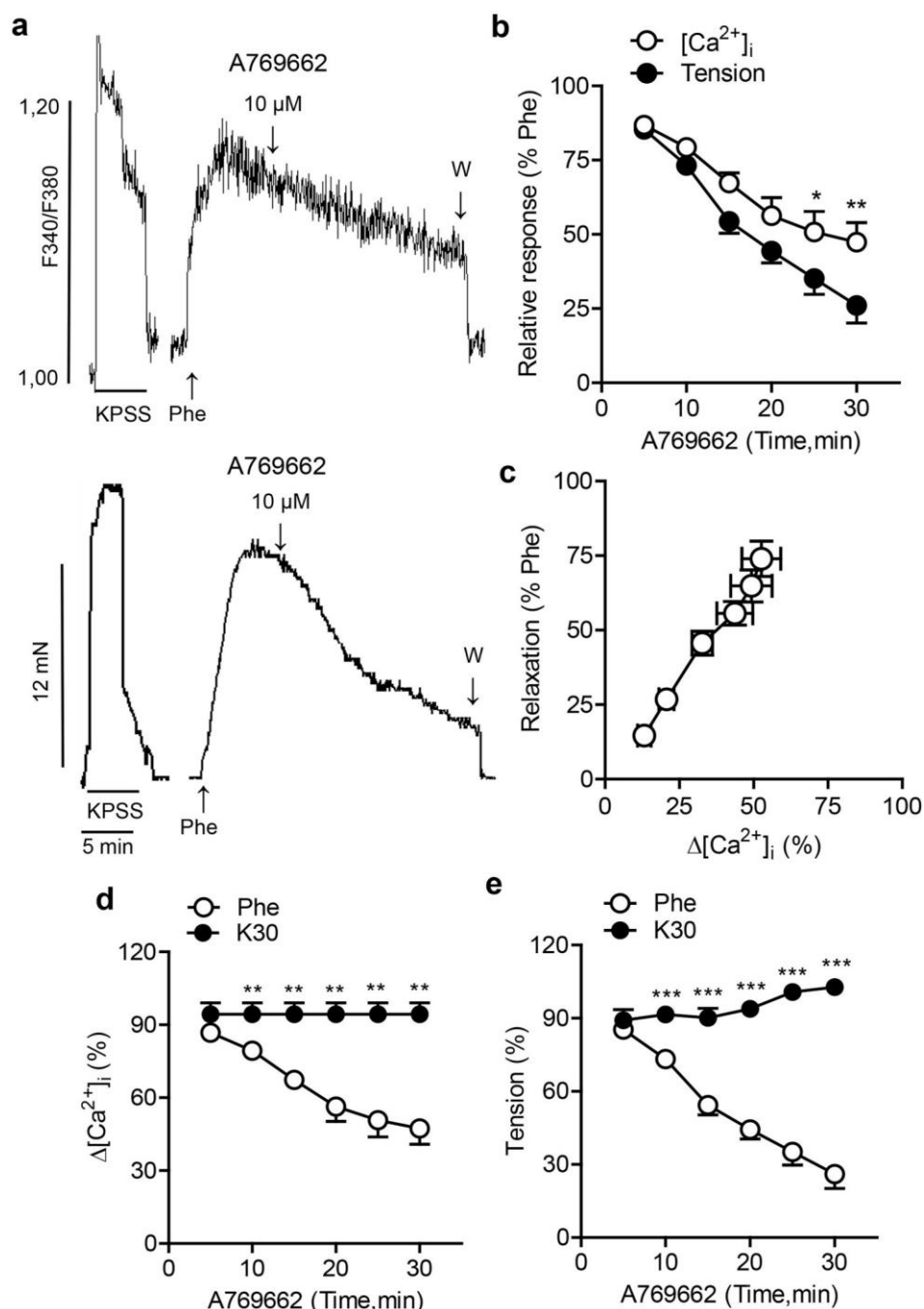


Fig. 4. AMPK activation relaxes renal arteries by reducing VSM $[Ca^{2+}]_i$ and by calcium-independent mechanisms.

Representative traces showing simultaneous recordings of VSM $[Ca^{2+}]_i$ and tension and the effect of the AMPK activator A7699662 in endothelium-intact rat renal arteries pre-contracted with phenylephrine (Phe). (a) Average concentration-dependent decreases in $[Ca^{2+}]_i$ (upper panel) and relaxations (lower panel) in response to A769662 (b) and $[Ca^{2+}]_i$ -tension relationships for the effect of A769662 in renal arteries. (c) AMPK activation-induced decreases in $[Ca^{2+}]_i$ and relaxations in arteries precontracted with Phe were abolished when raising extracellular K^+ in arteries precontracted with 30 mM K^+ (d, e) All results are expressed as percentage of the increases in $[Ca^{2+}]_i$ or tension induced by Phe or with 30 mM K^+ . Data are shown as the mean \pm SEM of 5 arteries, 1 per animal. Statistical significance was calculated by paired Student's *t*-test **P* < 0.05, ***P* < 0.01.

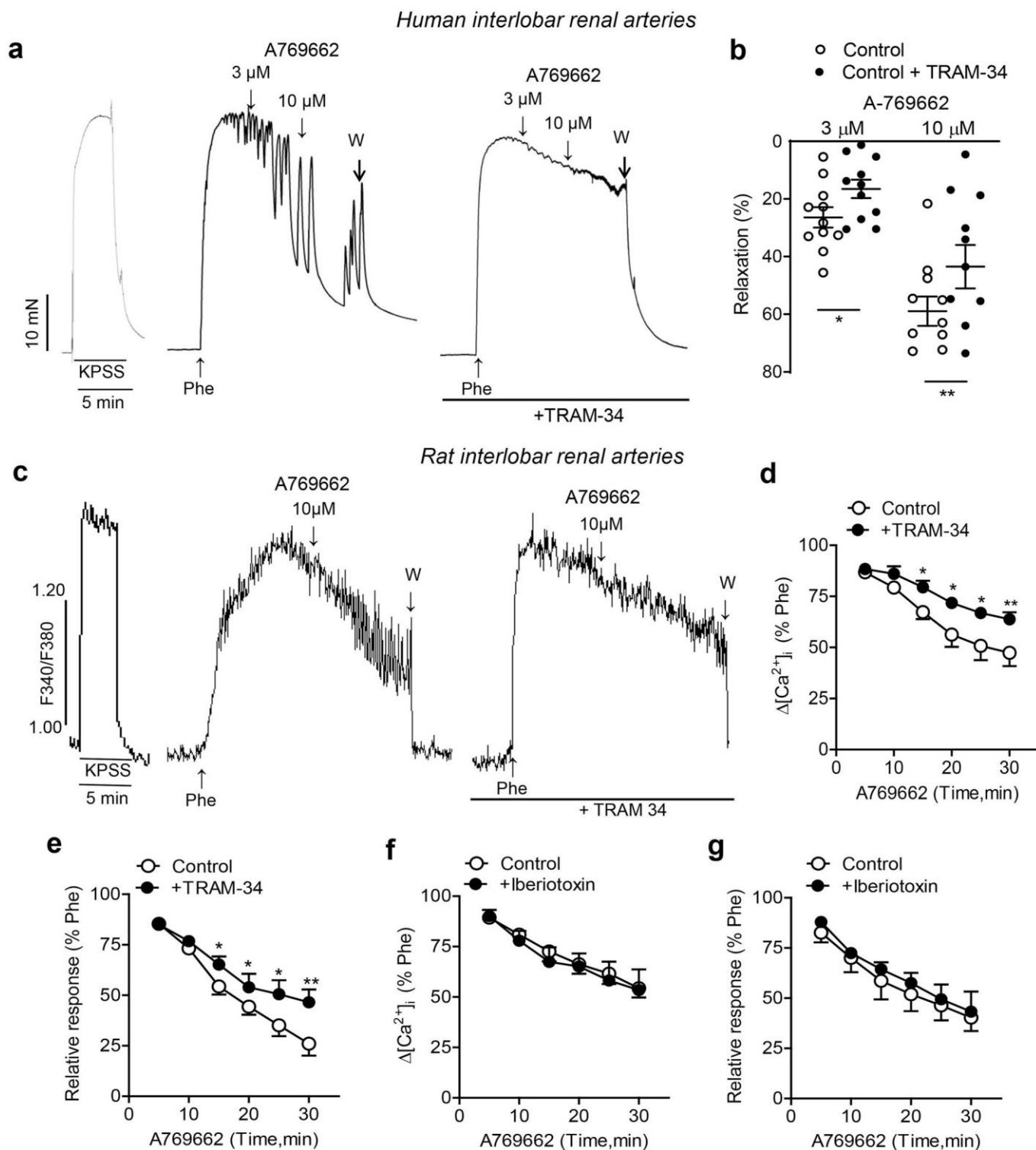


Fig. 5. Intermediate-conductance K_{Ca} (IK_{Ca}) channels are implicated in AMPK-induced vasodilation of human renal arteries.

Representative traces showing the effect of the inhibitor of intermediate-conductance K_{Ca} (IK_{Ca}) channels TRAM-34 (1 μ M) on the A769662-elicited vasodilation of human renal arteries (**a**) and the average inhibitory effect of TRAM-34 (**b**). Data are shown as the mean \pm SEM of 10 arteries from 4 patients. Original recordings showing A769662-induced decreases in VSM $[Ca^{2+}]_i$ (top) that were blunted by TRAM-34 (bottom) in intact renal interlobar arteries from rat. (**c**) Average inhibitory effect of TRAM-34 on the decreases in $[Ca^{2+}]_i$ (**d**) and the relaxations to A769662 (**e**) in renal interlobar arteries. Average inhibitory effect of the inhibitor of high-conductance K_{Ca} channels (BK_{Ca}), Iberiotoxin (0.03 μ M) on the decreases in $[Ca^{2+}]_i$ (**f**) and the relaxations to A769662 (**g**) in endothelium-denuded renal interlobar arteries. Data are shown as the mean \pm SEM of 4–5 rats (1 artery per animal). Statistical significance was calculated by paired Student's t-test * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Specific features of kidney AMPK-mediated arterial vasodilatation such as activation of endothelial IK_{Ca} channels and VSM K_{ATP} channels are first unveiled.

Pharmacological activation of AMPK with the thienopyridine derivative A769662 induced potent relaxations of arteries from the rat kidney. Notably, that effect is reproduced in a similar extend in human

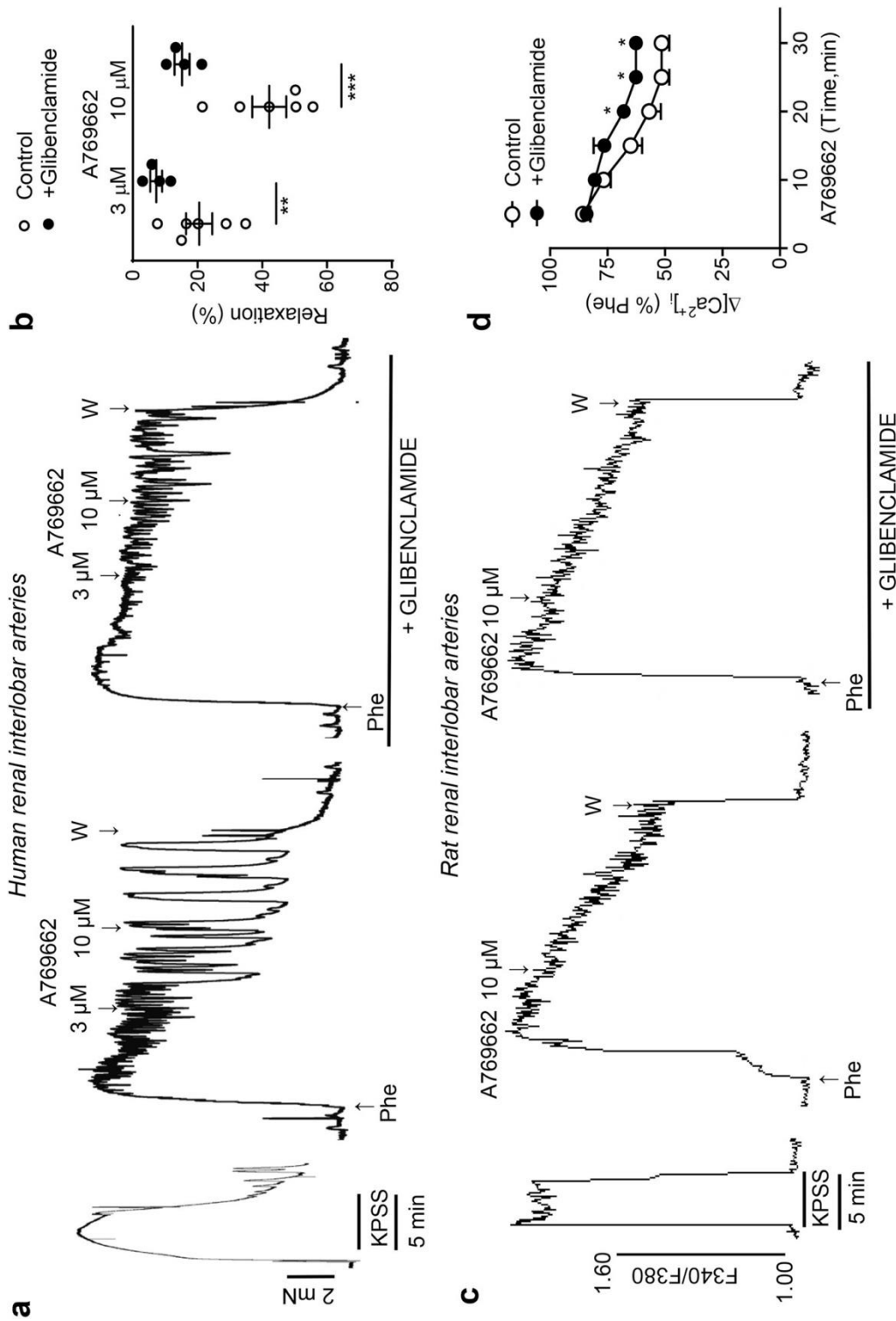


Fig. 6. A769662 activates ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channels in VSM of human renal arteries

Representative traces illustrating the inhibition of both A769662-elicited vasorelaxation (top) in human renal arteries (a) and decreases in VSM $[Ca^{2+}]_i$ (bottom) in renal arteries from rat (c) induced by the Kir6 K_{ATP} channel blocker glibenclamide (1 μ M). Arteries were endothelium-denuded. Summarized data showing the average changes in relaxation (b) and $[Ca^{2+}]_i$ (d) induced by A769662 in presence of glibenclamide. Values means \pm SEM of n = 4-5 rats (1 artery per animal) and the mean \pm SEM of from 4 patients (2 arteries per patient)

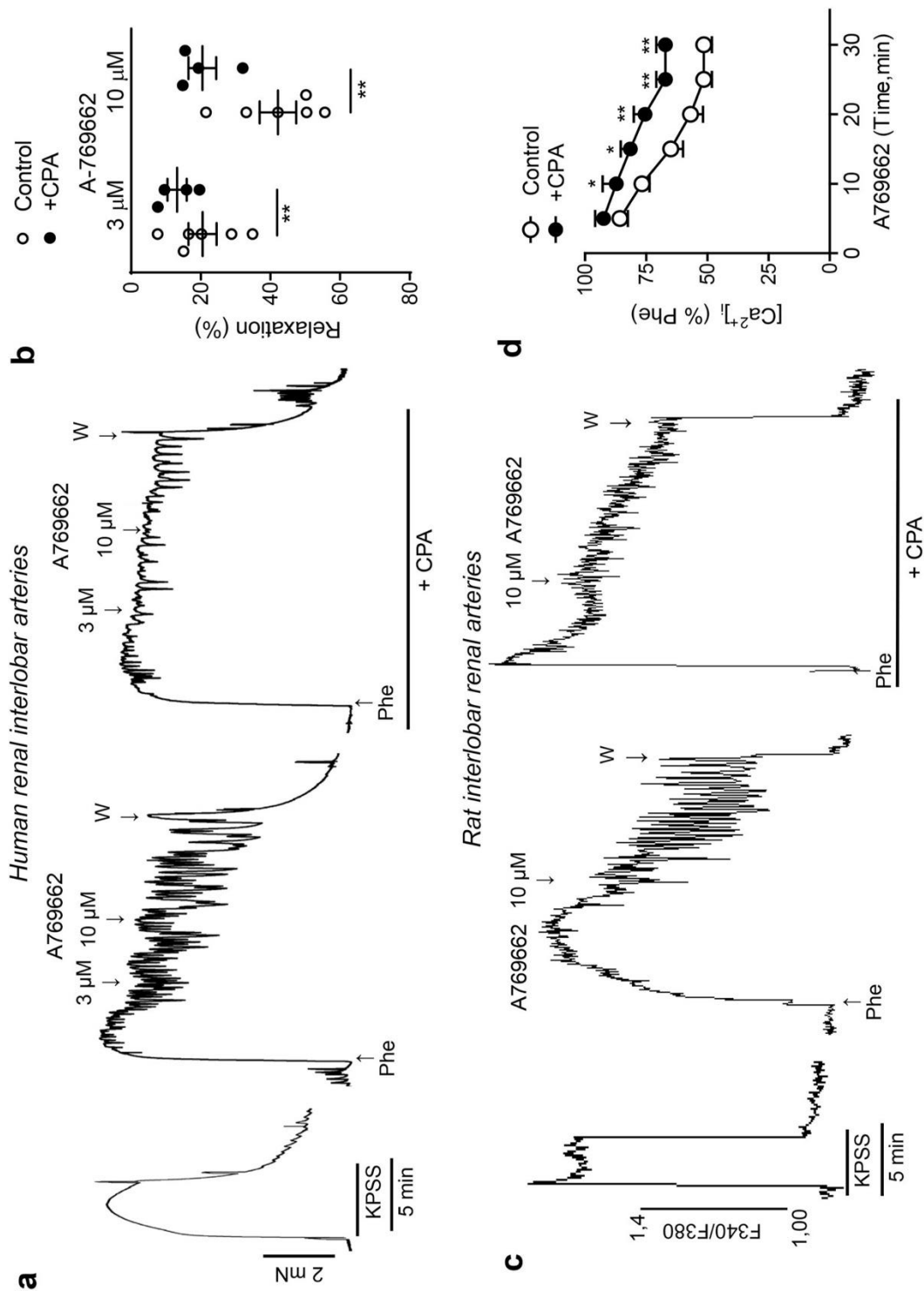
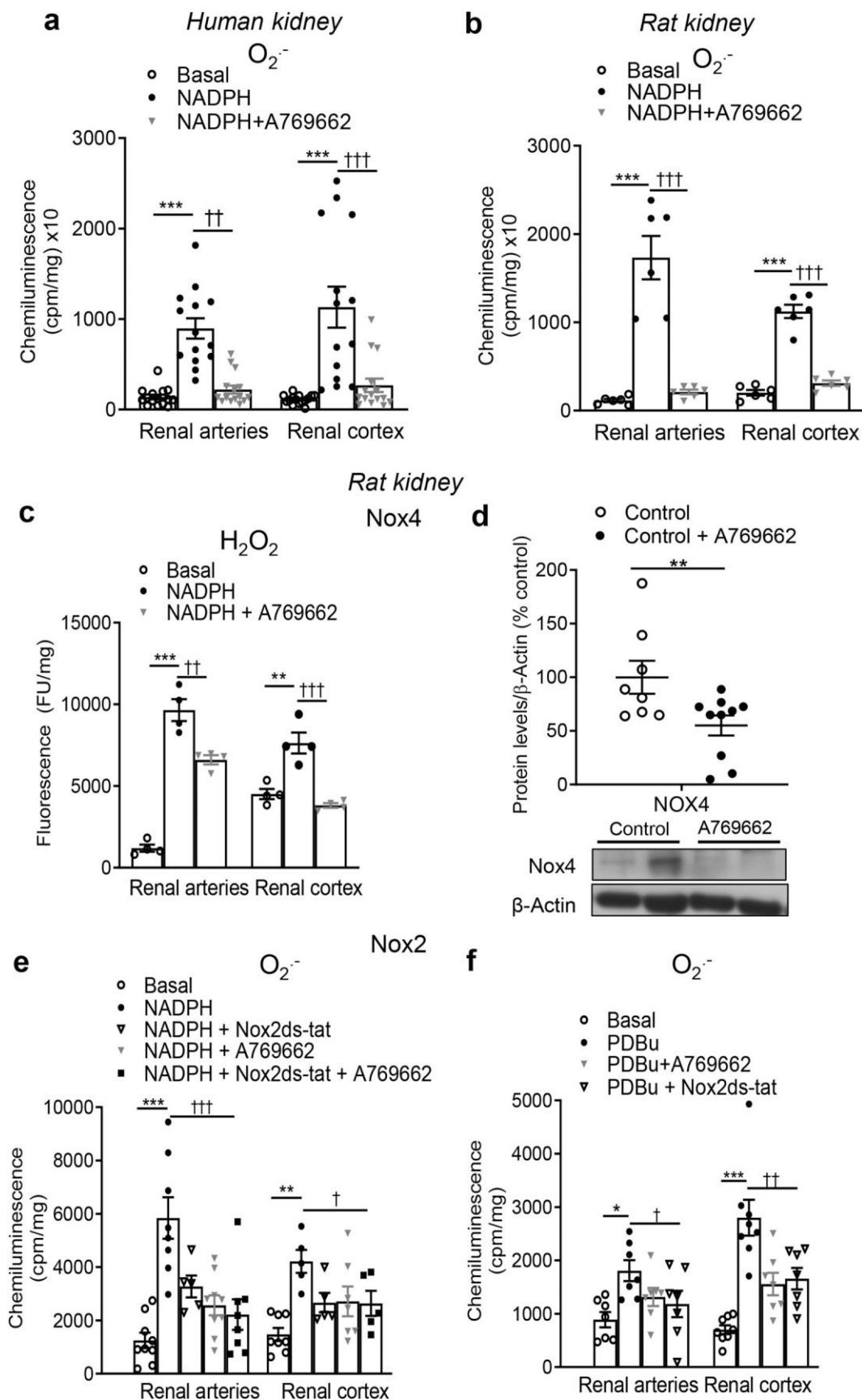


Fig. 7. SERCA activation in involved in A769662-induced relaxations of human renal arteries

Original recordings showing that both vasodilation (top) in human renal arteries (a) and decreases in $[Ca^{2+}]_i$ (bottom) in rat renal arteries evoked by AMPK activation with A769662 (c) were blunted by the inhibitor of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) CPA (10 μM). Experiments were performed in endothelium-denuded arteries. Summarized data showing the average changes in relaxation (b) and $[Ca^{2+}]_i$ (d) induced by A769662 in presence of CPA. Data are shown as means ± SEM of n = 6 rats (1 artery per rat) and as the mean ± SEM from 3 patients (2 arteries per patient). Statistical significant differences between means were analyzed by paired Student's *t*-test **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.



(caption on next page)

Fig. 8. Activation of AMPK downregulates Nox4- and Nox2-derived ROS generation.

(a,b) Powerful inhibitory effect of AMPK activation on NADPH-stimulated levels $O_2^{\cdot-}$ in renal arteries and cortex samples from human **(a)** and rat **(b)** kidney measured by lucigenin-enhanced chemiluminescence. **(c)** Basal and NADPH-stimulated levels of H_2O_2 in renal arteries and renal cortex from rat measured by Amplex Red fluorescence were reduced by A769662 (30 μ M). Results are expressed in counts per minute (cpm) per mg of tissue for chemiluminescence and in relative fluorescence units (RFU) per mg of tissue for fluorescence. Bars represent mean \pm SEM of 7 patients (2 samples per patient) and 6–10 animals (1–2 samples per animal). Significant differences were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni as a *posteriori* test ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus control before treatment, †† $P < 0.01$; ††† $P < 0.001$ versus NADPH-treated. **(d)** Western blots analysis for Nox4 protein levels in renal arteries and downregulation upon acute *in vitro* treatment with the AMPK activator A769662 (30 μ M). Results were quantified by densitometry and presented as a ratio of density of the NOX4 band vs that of β -actin from the sample. Data are shown as the mean \pm SEM of 8–10 rats. Statistical significance was calculated by unpaired Student's *t*-test * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. **(e)** NADPH-stimulated levels $O_2^{\cdot-}$ in samples of renal arteries and cortex from rat kidney were reduced by the selective Nox2 inhibitor Nox2ds-tat (1 μ M) and by A769662 (30 μ M) alone, but there was no further inhibition by combined treatment with Nox2ds-tat plus A769662. **(f)** Protein kinase C activator phorbol 12,13-dibutyrate PDBu (10 μ M) was used to indirectly stimulate Nox2 and $O_2^{\cdot-}$ production. Basal and PDBu-stimulated levels $O_2^{\cdot-}$ in renal tissues were reduced by the Nox2 inhibitor Nox2ds-tat and by A769662. **(f)** Results are expressed in counts per minute (cpm) per mg of tissue for chemiluminescence. Bars represent mean \pm SEM of 6–10 rats. Significant differences were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni as a *posteriori* test ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus control before treatment, †† $P < 0.01$; ††† $P < 0.001$ versus NADPH or PDBu-treated.

intrarenal arteries. A769662 also relaxed mesenteric resistance but not coronary arteries from the same rats, thus suggesting that A-7669662 vasodilator action is vascular tissue-specific. Renal vasodilatation induced by A7669662 was 3 orders of magnitude more potent than that elicited by the pharmaceutical AMPK activator AICAR [10,36,37]. The higher vasodilator potency in the micromolar range found for A-7669662 versus AICAR in intrarenal arteries would confirm its high specificity towards AMPK and is in agreement with that recently reported for other small arteries such as muscular and mesenteric resistance arteries [33].

A7669662 relaxation was found to be associated with phosphorylation of AMPK and of the AMPK downstream target ACC in renal interlobar arteries. A7669662 selectively binds the AMPK β_1 catalytic subunit and allosterically increases kinase activity of the α_1 catalytic subunit, but this compound can also activate AMPK by inhibiting dephosphorylation of AMPK on Thr-172, like the effects of AMP [38]. Accordingly, acute exposure of renal arteries to A769662 enhanced AMPK Thr-172 phosphorylation and also phosphorylation (and thus inhibition) of the AMPK downstream target ACC, rate-limiting enzyme for fatty acid synthesis, the latter indicating that AMPK vasodilator action accompanies kinase regulatory activity of lipid metabolism and energy storage/mobilization in kidney vascular tissues.

AMPK cardiovascular actions have mainly been attributable to AMPK-activating eNOS in endothelial cells and cardiomyocytes, although AMPK is expressed in both endothelium and VSM and its activation can induce endothelium-independent vasodilation [33,36,39]. In endothelial cells AMPK can be regulated by stimuli affecting cellular ATP levels such as hypoxia, as well as by fluid shear stress, Ca^{2+} -elevating agonists and hormones such as insulin, leptin, adiponectin and thyroid hormones, through upstream kinases including LKB1 or CAMKK β [2,8]. Activation of AMPK by AICAR in endothelial cells of both large and small resistance arteries has been demonstrated to increase phosphorylation of eNOS at Ser1177 and Ser635, resulting in increased NO production and vasodilatation [5–7,10,40]. In agreement with these data, A769662-induced relaxations of both human and rat intrarenal arteries were found to be partially inhibited by mechanical endothelial cell removal and by pharmacological blockade of eNOS, suggesting the involvement of the eNOS/NO pathway in renal vasodilatation induced by AMPK. However, a significant amount of the A769662-induced relaxant response persisted in arteries denuded from endothelium indicating that AMPK activation can directly relax VSM of renal arteries.

VSM expresses AMPK α_1 -subunit and both β_1 and β_2 subunits, predominantly β_1 -AMPK [36,39]. AMPK is activated by metabolic stress in arterial smooth muscle and has been involved in endothelium-independent vasodilation of both large and small arteries [33,36,39] and in the regulation of VSM proliferation and inflammation [9,41]. The present findings demonstrate that AMPK activation causes relaxation of renal arteries mainly by reducing VSM $[Ca^{2+}]_i$ and to a lesser extent through Ca^{2+} -independent mechanisms decreasing calcium sensitivity.

While recent reports demonstrate that AMPK activators reduce VSM $[Ca^{2+}]_i$ of resistance arteries through hyperpolarization mediated by smooth muscle BK_{Ca} channels [33], the present findings suggest that stimulation of IK_{Ca} rather than BK_{Ca} channels is involved in the decrease of smooth muscle $[Ca^{2+}]_i$ of renal arteries. Thus, while the inhibitor of BK_{Ca} channels iberiotoxin had no effect on A769662 vascular responses, selective pharmacological blockade of IK_{Ca} channels with TRAM reduced both relaxation of human renal arteries and the decrease in VSM intracellular Ca^{2+} elicited by A769662. The differences between our findings and those reported by Schneider et al. (2015) [33] in small muscle and mesenteric arteries support again vascular tissue-specificity of the A769662 action and are likely to be related to the features of the endothelium-dependent hyperpolarization (EDH)-type dilatation of intrarenal arteries. Thus, EDH-elicited response is initiated by stimulation of intermediate- and small conductance K_{Ca} channels and hyperpolarization of renal endothelial cells which further spreads through myoendothelial gap junctions to the underlying VSM thus inducing hyperpolarization and vasorelaxation, greatly reduced by blockade of IK_{Ca} channels with TRAM both *in vitro* and *in vivo* [31,42,43]. The inhibitory effect of TRAM-34 on both decreases in VSM $[Ca^{2+}]_i$ and relaxation elicited by A-769662 would be consistent with the AMPK activator stimulating endothelial IK_{Ca} channels and further producing VSM relaxation in intrarenal arteries. These findings would be supported by recent studies demonstrating that (EDH)-type dilatation of small arteries is lost after endothelium-specific knock out of the AMPK α_1 -subunit, thus suggesting that AMPK mediates EDH-type responses of microvessels therefore being involved in blood pressure regulation [44].

Interestingly, our findings first provide evidence that AMPK can also activate VSM K_{ATP} channels and thus contribute to renal arterial relaxation, since the sulfonylurea glibenclamide markedly inhibited both vasodilation of human renal artery and the decrease in VSM $[Ca^{2+}]_i$ elicited by A-769662. While AMPK is activated in response to metabolic stress usually associated with ATP depletion and increase in the AMP/ATP ratio [1], sarcolemmal K_{ATP} channels are likewise stimulated by decrease in intracellular ATP, these channels functioning as metabolic sensors which couple intracellular metabolic state to membrane excitability [45]. In the kidney, K_{ATP} channels are functionally expressed in renal arteries and arterioles and K_{ATP} activators dilate afferent arterioles *in vitro* and increase renal blood flow *in vivo* and in the isolated perfused kidney [46–48]. K_{ATP} channels were early involved in metabolic vasodilation of preglomerular arterioles wherein glucose deprivation elicited dilatation that was reversed by glibenclamide [46]. Therefore, stimulation of renal arterioles K_{ATP} channels by AMPK activation, as shown in the present study, might represent a mechanism to couple renal blood flow and metabolism. Relationship between K_{ATP} channels and AMPK activation has been reported in the heart wherein AMPK stimulates sarcolemmal K_{ATP} channel activity and recruitment in cardiac myocytes thus contributing to cardioprotection evoked by preconditioning [49]. In the kidney, both AMPK activators and K_{ATP}

channels openers have independently been reported to provide protection against renal ischemia/reperfusion injury through antioxidant, antiapoptotic and prosurvival actions [17,19,50], while the present findings first show that K_{ATP} channels are downstream targets for the AMPK vasodilator action probably implicated in the metabolic regulation of renal blood flow.

Activation of SERCA has been involved in lowering smooth muscle $[Ca^{2+}]_i$ and relaxation, and both redox regulation and more recently phosphorylation of SERCA2b, the major SERCA isoenzyme in VSM, increase pump activity to introduce Ca^{2+} in the SR and therefore to reduce VSM $[Ca^{2+}]_i$ and relax arterial smooth muscle [33,51–53]. In our study, pharmacological blockade of SERCA and subsequent SR store depletion by treatment with CPA greatly reduced both relaxation of human renal arteries and the VSM $[Ca^{2+}]_i$ decreasing effects induced by AMPK activation, which suggests that SERCA pump is also a target for AMPK phosphorylation in renal VSM accounting for the AMPK-induced vasorelaxation of kidney arteries. This is in agreement with that recently reported for other small arteries wherein AMPK activation augmented VSM calcium transients elicited by SR store depletion with caffeine and inhibition of SERCA reduced the relaxations induced by A769662 [33]. Moreover, in the latter study relaxation induced by A769662 was associated with increased phosphorylation of the SERCA modulator phospholamban at the regulatory T17 site which stimulates SERCA activity [33]. Therefore, the present findings in intrarenal arteries confirm that stimulation of SERCA and reduction of VSM $[Ca^{2+}]_i$ is a powerful universal mechanism for the relaxant effects of AMPK activators in small arteries and arterioles.

In the cardiovascular system, AMPK activity can be regulated by oxidative stress and AMPK in turn is able to modulate both mitochondrial ROS generation and gene expression of antioxidant defenses in endothelial cells [21,54]. Hence, pharmacological activation of AMPK in the vascular endothelium has been proposed to be beneficial in metabolic disease not only because of its bioenergetic effects but also due to its ability to counteract oxidative stress [54]. In the present study, we first provide evidence for Nox subunits being targets of AMPK in kidney vascular tissues and demonstrate that AMPK regulates both Nox expression and ROS generating activity. Up-regulation of Nox4 induced by high glucose in podocytes and high fat diet in renal tubular cells has been reported to be inhibited by activation of AMPK both *in vitro* and *in vivo* [13,20,55]. Nox4, is highly expressed in the kidney and is a source of endothelial vasodilator H_2O_2 and protective of vascular function under physiological conditions [30]. In line with this scenario, we have found that acute treatment of renal interlobar arteries with the AMPK activator A-769662 induced a powerful inhibition of NADPH-derived ROS associated to a marked down-regulation of Nox4 expression and reduced H_2O_2 generation. Nox4 produces H_2O_2 rather than O_2^- and is a functional source of ROS in the mitochondria of kidney cortex and renal endothelium [30,56]. Despite AMPK negatively regulates Nox4-dependent oxidative stress and apoptosis in diabetes and obesity [17,55], the present findings suggest that AMPK can also modulate Nox4-dependent H_2O_2 production and vasoactive actions in the kidney under normal physiological conditions.

On the other hand, AMPK has also been shown to reduce activity and expression of other Nox subunits such as Nox2; thus, AMPK α 1 knockout mice displayed increased vascular oxidative stress, Nox2 up-regulation and endothelial dysfunction mediated by enhanced NF- κ B activation in endothelial cells, these effects being reversed by AICAR [21,57,58]. The present findings also support a role for AMPK as a physiological regulator of Nox2 activity in intrarenal arteries, since acute exposure to A-769662 did not further inhibited Nox-derived ROS production under conditions of Nox2 blockade, whereas it suppressed O_2^- generation stimulated by phorbol esters, which reduces translocation and phosphorylation of p47phox thus inhibiting Nox2 activation, as reported for cardiac myocytes and human neutrophils [59,60].

In summary, we provide evidence here for new physiological targets of AMPK activation in the kidney leading to renal vasodilation and

downregulation of vascular ROS production. These vasorelaxant and antioxidant effects would be consistent with the cardiovascular protective actions of antidiabetic drugs like metformin whose actions have been shown to be mediated by AMPK activation [26,61]. Amelioration of renal fibrosis and inflammation reported for pharmacological AMPK activators [17,25] along with the benefits of vascular AMPK activation suggest that these drugs may be useful therapeutic tools in the treatment of metabolic disease-associated nephropathy and chronic kidney disease.

Sources of support

This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) co-funded by the FEDER Program of EU (grants n° SAF2016-77526-R and RTI2018-101840-B-I00). Claudia Rodríguez was supported by grant FPU16/04582 from MEC (Spain).

Declaration of competing interest

All authors declare no competing interests.

Acknowledgements

We thank Francisco Puente and Manuel Perales for expert technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101575>.

References

- [1] D.G. Hardie, F.A. Ross, S.A. Hawley, AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (4) (2012) 251–262.
- [2] N.B. Ruderman, et al., AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome, *J. Clin. Invest.* 123 (7) (2013) 2764–2772.
- [3] M. Lopez, et al., Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance, *Nat. Rev. Endocrinol.* 12 (7) (2016) 421–432.
- [4] N. Martínez-Sánchez, et al., Hypothalamic AMPK-ER stress-JNK1 Axis mediates the central actions of thyroid hormones on energy balance, *Cell Metabol.* 26 (1) (2017) 212–229 e12.
- [5] J. Li, et al., Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287 (5) (2004) E834–E841.
- [6] Y.C. Levine, G.K. Li, T. Michel, Agonist-modulated regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in endothelial cells. Evidence for an AMPK -> Rac1 -> Akt -> endothelial nitric-oxide synthase pathway, *J. Biol. Chem.* 282 (28) (2007) 20351–20364.
- [7] Z. Chen, et al., AMP-activated protein kinase functionally phosphorylates endothelial nitric oxide synthase Ser633, *Circ. Res.* 104 (4) (2009) 496–505.
- [8] B. Fisslthaler, I. Fleming, Activation and signaling by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells, *Circ. Res.* 105 (2) (2009) 114–127.
- [9] I.P. Salt, D. Grahame, AMP-activated protein kinase-A ubiquitous signalling pathway with key roles in the cardiovascular system, *Circ. Res.* 120 (11) (2017) 1825–1841.
- [10] E.A. Bradley, et al., Activation of AMP-activated protein kinase by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside in the muscle microcirculation increases nitric oxide synthesis and microvascular perfusion, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (6) (2010) 1137–1142.
- [11] Y. Zhang, et al., AMP-activated protein kinase is involved in endothelial NO synthase activation in response to shear stress, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (6) (2006) 1281–1287.
- [12] Q.J. Zhang, et al., Endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in treadmill-running mice: role of vascular signalling kinases, *J. Physiol.* 587 (Pt 15) (2009) 3911–3920.
- [13] K. Sharma, et al., Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice, *J. Clin. Invest.* 118 (5) (2008) 1645–1656.
- [14] K.R. Hallows, et al., Role of the energy sensor AMP-activated protein kinase in renal physiology and disease, *Rev. Lit. Arts Am.* 298 (February 2010) (2010) F1067–F1077.
- [15] Z. Xie, et al., Upregulation of mitochondrial uncoupling protein-2 by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells attenuates oxidative stress in diabetes, *Diabetes* 57 (12) (2008) 3222–3230.
- [16] R. Mishra, et al., AMP-activated protein kinase inhibits transforming growth factor-

- beta-induced Smad3-dependent transcription and myofibroblast transdifferentiation, *J. Biol. Chem.* 283 (16) (2008) 10461–10469.
- [17] A.E. Declèves, K. Sharma, J. Satriano, Beneficial effects of AMP-activated protein kinase agonists in kidney ischemia-reperfusion: autophagy and cellular stress markers, *Nephron Exp. Nephrol.* 128 (2014) 98–110, <https://doi.org/10.1159/000368932>.
- [18] A. Lin, et al., Attenuation of ischemia-reperfusion injury in a canine model of autologous renal transplantation, *Transplantation* 78 (5) (2004) 654–659.
- [19] J. Lempiäinen, et al., AMPK activator AICAR ameliorates ischaemia reperfusion injury in the rat kidney, *Br. J. Pharmacol.* 166 (6) (2012) 1905–1915.
- [20] A.E. Declèves, et al., Regulation of lipid accumulation by AMP-activated kinase [corrected] in high fat diet-induced kidney injury, *Kidney Int.* 85 (3) (2014) 611–623.
- [21] P. Song, M.-H. Zou, Regulation of NAD(P)H oxidases by AMPK in cardiovascular systems, *Free Radic. Biol. Med.* 52 (9) (2012) 1607–1619.
- [22] L.L. Dugan, et al., AMPK dysregulation promotes diabetes-related reduction of superoxide and mitochondrial function, *J. Clin. Invest.* 123 (11) (2013) 4888–4899.
- [23] A.E. Declèves, et al., AMPK mediates the initiation of kidney disease induced by a high-fat diet, *J. Am. Soc. Nephrol.* 22 (10) (2011) 1846–1855.
- [24] J. Satriano, et al., Induction of AMPK activity corrects early pathophysiological alterations in the subtotal nephrectomy model of chronic kidney disease, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 305 (5) (2013) F727–F733.
- [25] H. Kikuchi, et al., Failure to sense energy depletion may be a novel therapeutic target in chronic kidney disease, *Kidney Int.* 95 (1) (2018) 123–137.
- [26] M.A. Ewart, S. Kennedy, AMPK and vasculoprotection, *Pharmacol. Ther.* 131 (2) (2011) 242–253.
- [27] G. Zhou, et al., Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action, *J. Clin. Invest.* 108 (8) (2001) 1167–1174.
- [28] W. Sun, et al., Statins activate AMP-activated protein kinase in vitro and in vivo, *Circulation* 114 (24) (2006) 2655–2662.
- [29] G. Ceolotto, et al., Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase via AMPK-dependent mechanism, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (12) (2007) 2627–2633.
- [30] M. Muñoz, et al., Hydrogen peroxide derived from NADPH oxidase 4- and 2 contribute to the endothelium-dependent vasodilatation of intrarenal arteries, *Redox Biol.* 19 (2018) 92–104.
- [31] M. Muñoz, et al., CYP epoxygenase-derived H₂O₂ is involved in the endothelium-derived hyperpolarization (EDH) and relaxation of intrarenal arteries, *Free Radic. Biol. Med.* 106 (2017) p168–183.
- [32] C. Contreras, et al., Reduction of hypothalamic endoplasmic reticulum stress activates browning of white fat and ameliorates obesity, *Diabetes* 66 (1) (2017) 87–99.
- [33] H. Schneider, et al., AMPK dilates resistance arteries via activation of SERCA and BKCa channels in smooth muscle, *Hypertension* 66 (1) (2015) 108–116.
- [34] M. Zhou, et al., Expression of ATP sensitive K⁺ channel subunit Kir6.1 in rat kidney, *Eur. J. Histochem.* 51 (1) (2007) 43–51.
- [35] N.R. Tykocki, E.M. Boerman, W.F. Jackson, Smooth muscle ion channels and regulation of vascular tone in resistance arteries and arterioles, *Comp. Physiol.* 7 (2) (2017) 485–581.
- [36] F. Goirand, et al., Activation of AMP kinase α 1 subunit induces aortic vasorelaxation in mice, *J. Physiol.* 581 (3) (2007) 1163–1171.
- [37] R.J. Ford, et al., AMP-activated protein kinase activator AICAR acutely lowers blood pressure and relaxes isolated resistance arteries of hypertensive rats, *J. Hypertens.* 30 (4) (2012) 725–733.
- [38] M.J. Sanders, et al., Defining the mechanism of activation of AMP-activated protein kinase by the small molecule A-769662, a member of the thienopyridone family, *J. Biol. Chem.* 282 (45) (2007) 32539–32548.
- [39] L.J. Rubin, et al., Metabolic activation of AMP kinase in vascular smooth muscle, *J. Appl. Physiol.* 98 (1) (2005) 296–306.
- [40] V.A. Morrow, et al., Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric oxide synthesis in human aortic endothelial cells, *J. Biol. Chem.* 278 (34) (2003) 31629–31639.
- [41] M. Igata, et al., Adenosine monophosphate-activated protein kinase suppresses vascular smooth muscle cell proliferation through the inhibition of cell cycle progression, *Circ. Res.* 97 (8) (2005) 837–844.
- [42] E. Bussemaker, et al., Characterization of the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) response in the human interlobar artery, *Kidney Int.* 63 (5) (2003) 1749–1755.
- [43] K.M.B. Rasmussen, et al., Contribution of K⁺ channels to endothelium-derived hyperpolarization-induced renal vasodilation in rats in vivo and in vitro, *Pflügers Archiv* 468 (7) (2016) 1139–1149.
- [44] B. Enkhjargal, et al., Endothelial AMP-activated protein kinase regulates blood pressure and coronary flow responses through hyperpolarization mechanism in mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34 (7) (2014) 1505–1513.
- [45] C.G. Nichols, KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism, *Nature* 440 (7083) (2006) 470–476.
- [46] J.N. Lorenz, et al., Intracellular ATP can regulate afferent arteriolar tone via ATP-sensitive K⁺ channels in the rabbit, *J. Clin. Invest.* 90 (3) (1992) 733–740.
- [47] T. Kawata, et al., The K(ATP) channel opener nicorandil: effect on renal hemodynamics in spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats, *Kidney Int. Suppl.* 67 (1998) S231–S233.
- [48] L. Li, J. Wu, C. Jiang, Differential expression of Kir6.1 and SUR2B mRNAs in the vasculature of various tissues in rats, *J. Membr. Biol.* 196 (1) (2003) 61–69.
- [49] A. Sukhodub, et al., AMP-activated protein kinase mediates preconditioning in cardiomyocytes by regulating activity and trafficking of sarcolemmal ATP-sensitive K⁺ channels, *J. Cell. Physiol.* 210 (1) (2007) 224–236.
- [50] E. Grossini, et al., Levosimendan protection against kidney ischemia/reperfusion injuries in anesthetized pigs, *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 342 (2) (2012) 376–388.
- [51] P.C. Chandrasekera, et al., Determination of apparent calcium affinity for endogenously expressed human sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPase iso-form SERCA3, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296 (5) (2009) C1105–C1114.
- [52] M.E. Kargacin, G.J. Kargacin, Direct measurement of Ca²⁺ uptake and release by the sarcoplasmic reticulum of saponin permeabilized isolated smooth muscle cells, *J. Gen. Physiol.* 106 (3) (1995) 467–484.
- [53] R.A. Cohen, T. Adachi, Nitric oxide-induced vasodilatation: regulation by physiologic s-glutathiolation and pathologic oxidation of the sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase, *Trends Cardiovasc. Med.* 16 (4) (2006) 109–114.
- [54] Sergio L. Colombo, S. Moncada, AMPK α 1 regulates the antioxidant status of vascular endothelial cells, *Biochem. J.* 421 (2) (2009) 163–169, <https://doi.org/10.1042/BJ20090613>.
- [55] A.A. Eid, et al., AMP-activated Protein Kinase (AMPK) negatively regulates Nox4-dependent activation of p53 and epithelial cell apoptosis in diabetes, *J. Biol. Chem.* 285 (48) (2010) 37503–37512.
- [56] K. Block, Y. Gorin, H.E. Abboud, Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (34) (2009) 14385–14390.
- [57] S. Wang, et al., AMPK α 2 deletion causes aberrant expression and activation of NAD(P)H oxidase and consequent endothelial dysfunction in vivo: role of 26S proteasomes, *Circ. Res.* 106 (6) (2010) 1117–1128.
- [58] S. Schuhmacher, et al., α 1AMP-activated protein kinase preserves endothelial function during chronic angiotensin II treatment by limiting Nox2 upregulation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (3) (2011) 560–566.
- [59] G. Alba, et al., Stimulators of AMP-activated protein kinase inhibit the respiratory burst in human neutrophils, *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 573 (1–3) (2004) 219–225.
- [60] M. Balteau, et al., AMPK activation by glucagon-like peptide-1 prevents NADPH oxidase activation induced by hyperglycemia in adult cardiomyocytes, *Aust. J. Pharm.: Heart Circ. Physiol.* 307 (8) (2014) H1120–H1133.
- [61] J.W. Calvert, et al., Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling, *Diabetes* 57 (3) (2008) 696–705.

4.2 AMPK activation ameliorates kidney vascular dysfunction, oxidative stress and inflammation in obesity

Claudia Rodríguez, Ana Sánchez, Javier Sáenz-Medina, Mercedes Muñoz, Medardo Hernández, Miguel López, Luis Rivera, Cristina Contreras and Dolores Prieto



AMPK ACTIVATION AMELIORATES KIDNEY VASCULAR DYSFUNCTION, OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION IN OBESITY

Journal:	<i>British Journal of Pharmacology</i>
Manuscript ID	2020-BJP-1832-RP.R2
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Rodríguez, Claudia; Universidad Complutense de Madrid, Physiology Sanchez, Ana; Universidad Complutense de Madrid, Physiology Sáenz-Medina, Javier; Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda Muñoz, Mercedes; Universidad Complutense de Madrid, Physiology Hernández, Medardo; Universidad Complutense de Madrid, Fisiología Lopez, Miguel; Universidade de Santiago de Compostela Rivera, Luis; Universidad Complutense de Madrid, Physiology Contreras, Cristina; Universidad Complutense de Madrid, Physiology Prieto, Dolores; Universidad Complutense de Madrid, Physiology
Major area of pharmacology:	Obesity/metabolic syndrome, Vascular pharmacology
Cross-cutting area:	Intracellular signaling, Inflammation
Additional area(s):	Endothelium, Metabolism, NF-kappa-B, Nitric oxide synthase, Translational Pharmacology

SCHOLARONE™
Manuscripts

08-Jun-2021

ACCEPTANCE LETTER

Dear Professor Prieto,

Re: AMPK ACTIVATION AMELIORATES KIDNEY VASCULAR DYSFUNCTION,
OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION IN OBESITY (2020-BJP-1832-RP.R2)

I am pleased to inform you that **your article has been accepted for publication**, subject to any revisions that might be required by the Press Editor. This may involve minor language revisions or if more extensive revisions are required you will be contacted directly by one of the Press Editors, Dr. Y. S. Bakhle or Dr A. Ramage.

Please note that on rare occasions it is possible that the Press Editor will identify some fundamental concern regarding your article, which may require further action with respect to additional editorial changes to be implemented by the authors. If the editorial intervention results in identifying irredeemable problems with the article, the authors and Editors may decide that a retraction is required.

In addition we require authors to link all key targets and ligands in their manuscript to the Guide to Pharmacology database, and also to provide a Declaration of Transparency and Scientific Rigour. Instructions for completing both these requirements will be sent to you shortly.

Once you have fulfilled these requirements your article will be transferred to Production. Please note that your accepted manuscript will immediately be published online as an Accepted Article as soon as it is received in Production, before it has been copyedited, press edited or typeset. At this point it is officially published and fully citable using the unique digital object identifier (DOI) that will be assigned to the article. The Accepted Article will later be replaced by the final Version of Record once your article has completed production and is published online Early View, ahead of its inclusion in an issue of the journal.

Your article will be copyedited before it is sent to one of the Press Editors for review. Once the Press Editing stage is complete, you will receive an email giving you access to the edited, typeset proof of the article for review. We ask authors to endeavour to complete their review of the proof within 3 working days.

As soon as your article reaches Production you will receive an email from our Author Services system. This system allows authors to track the progress of their article through production and provides free access to the article online. Although the journal is published online only, authors are able to order printed offprints of their articles. Details of this are provided in Author Services.

You will be required to complete a license agreement for your article via Author Services. This will appear as an action on your Authors Services dashboard once the article reaches Production. You will also have the option of ordering Online Open, our Gold Open Access option. The Online Open fee is fixed at \$4,000.

Please see these websites for a summary of BJP's (Wiley) compliance with the open access policies of various organizations:

<https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing-open-access/open-access/author-compliance-tool.html>

You may wish to promote your article, and as such we recommend these promotional resources: <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/Promotion/promotional-toolkit.html>

This journal offers a number of license options for published papers; information about this is available here: <https://authorservices.wiley.com/author-resources/Journal-Authors/licensing/index.html>. The submitting author has confirmed that all co-authors have the necessary rights to grant in the submission, including in light of each co-author's funder policies. If any author's funder has a policy that restricts which kinds of license they can sign, for example if the funder is a member of Coalition S, please make sure the submitting author is aware.

Thank you very much for submitting your work to the British Journal of Pharmacology. We are very pleased to publish your work in BJP, and hope to receive more papers from your laboratory in the future.

Yours sincerely,

Christopher Sobey

Senior Editor, BJP

Correspondence and forms to:
Dr Alice Kallaway

**AMPK ACTIVATION AMELIORATES KIDNEY VASCULAR DYSFUNCTION,
OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION IN OBESITY**

Claudia Rodríguez^a, Ana Sánchez^a, Javier Sáenz-Medina^b, Mercedes Muñoz^a,
Medardo Hernández^a, Miguel López^d, Luis Rivera^a, Cristina Contreras^a and
Dolores Prieto^a

^a*Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense,
Madrid, Spain, ^bDepartamento de Urología, Hospital Universitario Puerta de Hierro-
Majadahonda, Madrid, Spain and ^dNeurObesity Group, Department of Physiology,
CIMUS, Universidad de Santiago de Compostela-Instituto de Investigación Sanitaria,
Santiago de Compostela, Spain*

*Corresponding author:

Prof. Dolores Prieto
Departamento de Fisiología
Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
28040-Madrid
SPAIN
e-mail: dprieto@ucm.es

Funding information

Supported by Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) co-funded by the FEDER Program of EU (grants nº SAF2016-77526-R, PID2019-105689RB and RTI2018-101840-B-I00). Claudia Rodríguez was supported by grant FPU16/04582 from MEC (Spain).

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi:10.1111/bph.15600

This article is protected by copyright. All rights reserved

Abbreviations

[ACC](#), acetyl-CoA carboxylase

ACh, [acetylcholine](#)

[Akt](#), protein kinase B

[AMPK](#): AMP-activated protein kinase

CKD, chronic kidney disease

COX, cyclooxygenase

EC, endothelial cell

ER, endoplasmic reticulum

EDH, endothelium-derived-hyperpolarization

[eNOS](#), endothelial nitric oxide synthase

FA, fatty acids

IK_{Ca} channel, intermediate-conductance calcium-activated K⁺ channel

[IKK, IκB kinase](#)

K_{ATP}, ATP-sensitive potassium channels

LZR, lean Zucker rats

NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NO, nitric oxide

NOS, nitric oxide synthase

[Nox4](#), NADPH oxidase 4

O₂⁻, superoxide

OZR, obese Zucker rats

Phe, [phenylephrine](#)

PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase

PSS, physiological saline solution

ROS, reactive oxygen species

SERCA, sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase

SR, sarcoplasmic reticulum

TNF α , tumor necrosis factor alpha

VSM, vascular smooth muscle

ABSTRACT

Background and Purpose: Obesity is a risk factor for the development of chronic kidney disease independent of diabetes, hypertension and other comorbidities. Obesity-associated nephropathy has been linked to dysregulation of the cell energy sensor AMP-activated protein kinase ([AMPK](#)). We aimed here to assess whether impairment of AMPK activity may cause renal arterial dysfunction in obesity and to evaluate the therapeutic potential of AMPK activation in the kidney.

Experimental Approach: The effects of the AMPK activator [A769662](#) were assessed on intrarenal arteries mounted in microvascular myographs from *ob/ob* mice, obese Zucker rats and their lean littermates. Superoxide and hydrogen peroxide production were measured by chemiluminescence and fluorescence, respectively, and protein expression was analyzed by Western blotting.

Key results: Endothelium-dependent vasodilation and PI3K/[Akt/eNOS](#) pathway were impaired in preglomerular arteries from genetically obese rats and mice, along with impaired arterial AMPK activity and blunted relaxations induced by the AMPK activator A769662. Acute *ex vivo* exposure to A769662 restored endothelial function and enhanced activity of PI3K/Akt/eNOS pathway in obese rats, while *in vivo* treatment with A769662 improved metabolic state and ameliorated endothelial dysfunction, reduced inflammatory markers and vascular oxidative stress in renal arteries and restored redox balance in renal cortex of obese mice.

Conclusions and Implications: These results demonstrate that AMPK dysregulation underlies obesity-associated kidney vascular dysfunction and activation of AMPK improves metabolic state, protects renal endothelial function and exerts potent vascular antioxidant and anti-inflammatory effects. The beneficial effects of vascular AMPK activation might represent a promising therapeutic approach for the treatment of obesity-related- kidney injury.

Keywords: *AMPK, obesity, kidney, endothelial dysfunction, inflammation, oxidative stress*

Bullet points

What is already known

- Obesity is a risk factor for the development of chronic kidney disease independent of diabetes and hypertension.
- AMPK dysregulation has been associated with glomerulopathy, fibrosis and lipotoxicity-induced tubule injury in obesity-associated nephropathy.

What this study adds

- Reduced vascular AMPK activity was associated to endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in rodent models of genetic obesity.
- AMPK activation with A769662 improved metabolic state, ameliorated endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation.

What is the clinical significance

- Vascular AMPK dysregulation may be involved in the pathogenesis of obesity-associated kidney injury.
- Vascular AMPK activation should be considered as a promising therapeutic target for the treatment of metabolic disease-related-nephropathy.

1. INTRODUCTION

Obesity has become a public health problem of increasing prevalence worldwide due to sedentary lifestyle and excess of caloric intake. Obesity and metabolic syndrome are associated with an increased risk of diabetic complications including diabetic nephropathy and chronic kidney disease (CKD) (Abrass, 2004). However, obese non-diabetic individuals can also develop CKD and epidemiological data show that obesity is a risk factor for CKD independent of diabetes, hypertension and other comorbidities (De Vries et al., 2014; Kramer et al., 2005). Obesity-related kidney injury has been associated with structural abnormalities such as glomerular hypertrophy, tubular injury and tubulointerstitial fibrosis that lead to progressive impairment of renal function and microalbuminuria, proteinuria, glomerular hyperfiltration, endothelial and podocyte dysfunction and abnormal renal hemodynamics (Amann & Benz, 2013; De Vries et al., 2014; Sharma, 2014). Underlying pathogenic mechanisms proposed to be the link between kidney disease and obesity include renal lipid accumulation and lipotoxicity, proinflammatory changes, abnormal secretion of adipokines, endothelial dysfunction, hypertension and oxidative stress (Amann & Benz, 2013; De Vries et al., 2014; Muñoz et al., 2018; Muñoz et al., 2015).

Adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) is a key cellular energy sensor that is activated in response to ATP depletion (increased AMP/ATP ratio) in energy deficiency states and stimulates catabolic pathways to restore energy homeostasis. AMPK is abundantly expressed in the kidney (Decleves, Zolkipli, et al., 2014; Hallows et al., 2010), a highly energy-consuming organ, and its activation plays an important role in the regulation of glucose and fatty acid (FA) metabolism, ion transport and podocyte function (Hallows et al., 2010). Furthermore, vascular AMPK activation in the kidney has recently been identified by our group as a new physiological target that induces potent renal vasodilation through endothelium-dependent and independent mechanisms and downregulates reactive oxygen species (ROS) production under physiological conditions (Rodríguez et al., 2020). Therefore, modulation of renal blood flow and vasodilation by AMPK activation may facilitate cellular nutrients uptake to restore energy levels dependent on kidney metabolism state.

AMPK dysregulation has been reported under conditions of metabolic stress such as obesity and diabetes, and also in vascular disorders and chronic kidney disease CKD (Decleves et al., 2011; L. L. Dugan et al., 2013; Kikuchi et al., 2018; Ruderman & Prentki, 2004; Steinberg & Kemp, 2009). At a central level, hypothalamic AMPK integrates peripheral signals to regulate feeding behavior and thermogenesis, and augmented

RESULTADOS

AMPK activity increases feeding while decreasing thermogenesis thus worsening metabolic state in obesity (Lopez et al., 2016). In contrast, overnutrition and metabolic stress induced by obesity are linked to reduced-AMPK activity and dysregulation of lipid metabolism in peripheral organs including kidney (Declèves & Sharma, 2015). AMPK phosphorylates acetyl-CoA carboxylase (ACC) to increase β -oxidation of FA and to decrease lipid synthesis. Reduced activity of AMPK and p-ACC leads to impairment of lipid oxidation by mitochondria in the diabetic kidney (Decleves, Zolkipli, et al., 2014; L. L. Dugan et al., 2013). AMPK dysregulation has also been associated with glomerulopathy, enhanced profibrotic pathways (TGF- β 1 and mesangial matrix expansion) and lipotoxicity-induced proximal tubule injury in high fat diet models of obesity (Decleves et al., 2011; Decleves, Zolkipli, et al., 2014). Furthermore, oxidative stress and inflammation have been linked to AMPK dysregulation in the obese kidney since activation of AMPK was beneficial in reducing inflammation markers and ROS production in renal tissues (L. L. Dugan et al., 2013; Sharma, 2014; Sharma, 2016).

Impaired AMPK vascular activity has been involved in the development of obesity-associated endothelial dysfunction (Concha F. García-Prieto et al., 2015; C. F. García-Prieto, H. Pulido-Olmo, et al., 2015; Lee et al., 2005; Lobato et al., 2013), a hallmark of metabolic disease vascular complications (Prieto et al., 2014). Hence, drugs like metformin commonly used in the treatment of diabetes have been shown to exert cardiovascular protection through activation of vascular AMPK (Calvert et al., 2008; Ewart & Kennedy, 2011; C. F. García-Prieto, M. Gil-Ortega, et al., 2015) resulting in augmented endothelial NO production (Deng et al., 2010; Rossoni et al., 2011; Sun et al., 2006; G. Zhou et al., 2001). The hypothesis of the present study is that vascular AMPK dysregulation is involved in renal endothelial dysfunction and therefore might affect renal function and contribute to obesity-associated kidney injury. Therefore, activation of kidney vascular AMPK could be a potential therapeutic target against metabolic disease-associated nephropathy (Kikuchi et al., 2018; Salatto et al., 2017).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Animal models

Male obese Zucker rats (OZR, *fa/fa*) and their counterparts lean Zucker rats (LZR, *fa/-*) purchased from Charles River Laboratories (Spain) and *ob/ob* mice (obese B6.V-Lep^{*ob/ob*}/JRj) and their lean littermates purchased from Janvier Labs (Spain) were used for the study as models of genetic obesity/metabolic syndrome at 17-19 weeks and 11-13 weeks of age, respectively. The *fa* mutation in the OZR is an autosomal recessive locus on chromosome 5, and homogeneity results in an improperly coded leptin receptor gene leading to hyperphagia, obesity, hyperinsulinemia and poor glucose tolerance although are not overtly diabetic. The *ob/ob* mice are homozygous for the obese spontaneous mutation *Lep^{ob}* and exhibit obesity, hyperphagia, transient hyperglycemia, glucose intolerance, and elevated plasma insulin. Male rats/mice were used since they are not subjected to cyclical hormonal changes. Animals were housed at Complutense University, Pharmacy School animal care facility in separate rooms and maintained on standard chow and water *ad libitum*, under controlled temperature ($23 \pm 1^\circ \text{C}$) and humidity (40-60%) and a 12:12 hr light/dark cycle. Animals were euthanized under CO₂ anaesthesia by decapitation. After euthanasia, kidneys, mesentery or heart were quickly removed and placed in cold physiological saline solution (PSS) of the following composition (mM): NaCl 119, NaHCO₃ 25, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.17, MgSO₄ 1.18, CaCl₂ 1.5, EDTA 0.027 and glucose 11.

Animal care and experimental protocols conformed to the European Union Directive 2010/63/EU on the Protection of Animals Used for Scientific Purposes and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Madrid Complutense University and Comunidad de Madrid (PROEX109/16). All animal experiments are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Percie du Sert et al., 2020) and with the recommendations made by the British Journal of Pharmacology (Lilley et al., 2020).

Pharmacological experiments to assess the effects of AMPK activation on endothelial function, vascular ROS generation and expression of proteins of the AMPK/ACC and Akt/eNOS signaling pathways, were carried out *ex vivo* in isolated renal arteries from OZR compared to LZR controls. To evaluate the *in vivo* effects of AMPK activation on renal vascular dysfunction in obesity, large amounts of A769662 were required for treatment in rats, and interlobar renal arteries from the *ob/ob* mice model of genetic obesity were used to study the effects of the AMPK activation. Since enough amounts of tissue could not be obtained in this model to run ROS measurements and

RESULTADOS

Western Blot analysis in arteries, renal cortex samples were used in parallel with myograph experiments in arteries.

2.2 *In vivo* studies

For the *in vivo* experiments, *ob/ob* (n=12) and lean mice (n=12) were individually housed for daily food-intake and body weight measurements and randomly separated into 4 experimental groups for a 4-day study with 6 animals per group. Furthermore, OZR (n=10) and LZR (n=10) were also randomized into 4 experimental groups and subjected to a 4-day study with 5 animals per group. Treatment groups were as follows: 2 control groups (obese and lean) treated with vehicle (50% saline solution and 50% DMSO, i.p, q.d) and 2 treatment groups (obese and lean) treated with the AMPK activator A769662 (20 mg/kg i.p, q.d for mice and 10 mg/kg i.p, q.d for Zucker rats). Two hours after last treatment administration, blood samples were taken for glucose and lactate levels determination by commercial strips with Accutrend Plus measurer. Animals were euthanized and the kidneys were quickly removed and placed in cold PSS. Biological samples (arteries and cortex samples) were further randomly separated for the various experimental procedures in groups from a number of animals *n* of at least 5 per group.

2.3 Dissection and mounting of microvessels

Renal interlobar arteries, 2nd-3rd order branches of the major renal artery, were isolated from the kidney of Zucker rats and *ob/ob* mice and carefully dissected by removing the surrounding connective and fatty tissue. For some experiments, mesenteric resistance arteries of Zucker rats were also dissected. Small samples of both renal arteries and cortex from rats and mice and samples of myocardium from mice were also dissected out for ROS measurements, as described earlier (Muñoz et al., 2017; Muñoz et al., 2019). Arterial segments were mounted in microvascular myographs (Danish Myotechnology, Denmark) and equilibrated for 30 min in PSS maintained at 37 °C and continuously bubbled with 5% of CO₂ in O₂ to maintain pH at 7. The relationship between passive wall tension and internal circumference was determined for each individual artery and from this, the internal circumference L_{100} corresponding to a transmural pressure of 100 mm Hg for a relaxed vessel *in situ* was calculated. The arteries were set to an internal diameter l_1 equal to 0.9 times l_{100} ($l_1 = 0.9 \times l_{100}$), since force development in intrarenal arteries is close to maximal at this internal lumen diameter (Muñoz et al., 2015).

2.4 Experimental procedures for the functional experiments

At the beginning of each experiment, arteries were stimulated twice with 120 mM K⁺ (KPSS) in order to test vessel viability. Integrity of the vascular endothelium was assessed by the relaxations induced by the endothelial agonist acetylcholine (ACh). Renal arteries from lean animals with a percentage of ACh-induced relaxation lower than 50% of the phenylephrine (Phe)-induced precontraction, and arteries from obese rats with ACh-induced relaxation lower than 30% were discarded (Muñoz et al., 2015). Cumulative concentration-responses curves to ACh and to the β -adrenergic agonist isoprenaline were performed on interlobar arteries from LZR and OZR rats or lean and *ob/ob* mice precontracted with (Phe) (0.1–0.5 μ M). The relaxation evoked by AMPK activation were assessed with 3 μ M and 10 μ M of the AMPK selective activator A769662 (Tocris Cookson, Bristol, UK) in intrarenal arteries and also in mesenteric arteries of LZR and OZR. Arteries were exposed to different drugs until the response reached a plateau. In the case of ACh and isoprenaline, quick acting drugs, times of exposure averaged 3 min, while for the slow acting AMPK activator A769662 time of exposure averaged 10 min (Rodriguez et al., 2020). To assess the relationship between AMPK and the endothelial PI3K-Akt-eNOS pathway, functional responses to isoprenaline and A769662 were obtained in the absence and presence of NOS synthase inhibitor (L-NOARG, 100 μ M) (Sigma-Aldrich, Spain) or the PI3K inhibitor (LY-294002, 3 μ M) (Tocris Cookson, Bristol, UK). Some experiments were performed in endothelium-denuded renal arteries to compare the effect of A769662 in vascular smooth muscle (VSM) of LZR and OZR. The endothelium was mechanically removed by inserting a human hair in the vessel lumen and guiding it back and forwards several times. The absence of functional endothelium was confirmed by lack of the relaxation to acetylcholine (10 μ M).

2.5 Ex vivo acute treatment of Zucker rats preglomerular arteries with A-769662

In order to evaluate the effects of AMPK activation on renal endothelium-dependent relaxations, relaxations to ACh were assessed before and after incubation for 40 min with A769662 (10 μ M) in interlobar arteries from LZR and OZR.

2.6 Measurement of superoxide production by chemiluminescence

Changes in basal and NADPH-stimulated levels of superoxide ($O_2^{\cdot-}$) were measured by lucigenin chemiluminescence in renal arteries and cortex of Zucker rats and in samples of renal cortex and myocardium of lean and obese mice, as earlier reported (Muñoz et

RESULTADOS

al., 2017; Muñoz et al., 2019; Muñoz et al., 2018). Tissue samples were dissected and equilibrated in PSS for 30 min at room temperature and then incubated in the absence (basal) and presence of AMPK selective activator A769662 (30 μ M) for 30 min at 37 °C. Samples were then transferred to microtiter plate wells containing 5 μ M bis-N-methylacridinium nitrate (lucigenin) and stimulated with NADPH (100 μ M) which was added prior to ROS measurements. Chemiluminescence was measured in a luminometer (BMG Fluostar Optima), and for calculation baseline values were subtracted from the counting values under the different experimental conditions and superoxide production was normalized to dry tissue weight.

2.7 Measurement of hydrogen peroxide by Amplex Red

Hydrogen peroxide (H_2O_2) production was measured by Amplex Red assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies SA, Madrid, Spain) in renal arteries and cortex of Zucker rats (Muñoz et al., 2017; Muñoz et al., 2019; Muñoz et al., 2018). Samples were equilibrated in HEPES-physiological saline solution (PSS) for 30 min at room temperature and then incubated in the absence (basal) and presence of AMPK selective activator A769662 (30 μ M) for 30 min at 37 °C. Samples were then transferred to microtiter plate black wells containing 10mM final concentration (Amplex Red) and 10 U/ml final concentration (horseradish peroxidase) and some were stimulated with NADPH (100 μ M) just prior to determination. Fluorescence was measured in a fluorimeter (BMG Fluostar Optima), using an excitation filter of 544 nm and an emission filter of 590 nm. Background fluorescence was subtracted from the counting values under the different experimental conditions and H_2O_2 production was normalized to dry tissue weight.

2.8 Western blot analysis

Interlobar arteries from LZR and OZR incubated 30 min with A769662 or vehicle and renal cortex samples from ob/ob mice and lean treated with vehicle or A769662 were snap frozen in liquid nitrogen, homogenized and lysed in lysis buffer. Protein lysates (13 μ g for renal arteries and 20 μ g for cortex samples) were separated in a 6,5% polyacrylamide gel (SDS-PAGE), electrotransferred on a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane and probed with the following primary antibodies: pACC Ser79 (1:1000; ref 3661, RRID:AB_330337), pAMPK α Thr172 (1:1000; ref 2535, RRID:AB_331250), AMPK α 1/2 (1:1000; ref 2532, RRID:AB_330331), pAkt Ser473 (1:500; ref 9271, RRID: AB_329825), Akt (1:500; ref 9272, RRID: AB_329827), p-eNOS Ser1177 (1:500; ref

RESULTADOS

9571, RRID:AB_329837), eNOS (1:500; ref 32027, RRID:AB_2728756) and TNF- α (1:1000; ref 11948, RRID:AB_2687962) from Cell Signaling Technology (RRID:SCR_004431) (Leiden, The Netherlands); NADPH oxidase 4 (1:500; ref ab154244) from Abcam (RRID:SCR_012931) (Cambridge, UK); p-IKK α/β (Ser 180/Ser 181) (1:1000; ref. 23470), IKK β (P-20) (1:1000; ref 34673), NF κ B p65 (C-20) (1:1000; ref 372) from Santa Cruz Biotechnology (RRID:SCR_008987); β -actin (1:5000; ref A5316) from Sigma (RRID:SCR_008988)(St. Louis, MO, US) (Contreras et al., 2017; Martinez-Sanchez et al., 2017). Bound primary antibody was detected with horseradish peroxidase conjugated secondary antibodies and blots were visualized using enhanced chemiluminescence and quantified by densitometry with ImageJ (RRID:SCR_003070) free software. Protein expression levels were normalized to β -actin, and then the media ratio of the control group (lean versus obese or vehicle-treated versus A769662-treated) was taken as 100%. Original scan images are available in Supporting Information.

2.9 Data presentation and statistical analysis

The data and statistical analysis comply with the recommendations of the British Journal of Pharmacology on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis et al., 2018). For the functional experiments, results are expressed as either Nm of force, Nm⁻¹ of tension or as a percent of the response to Phe in each artery, as means \pm SEM of 6–12 arteries from 5-6 animals. For the measurement of O₂⁻ or H₂O₂ production, results are expressed in counts per minute (cpm) per mg of tissue and relative fluorescence units (RFU) per mg of tissue in arterial segments and cortex samples, respectively, as means \pm SEM of 5–12 arteries/cortex samples from $n= 5–10$ animals. For Western Blot analysis results are expressed as means \pm SEM of 5–11 animals. When 2 samples from the same animal were used, the average value was taken for the statistical analysis and n was the number of animals.

In order to not to employ an unnecessary amount of animals and to get evidence for an effect of reasonable size in experimental groups, the number of experiments was selected during experimental design and based on considerations of the 3R principles. The experience of our previous investigations was also taken into account and the minimum number of animals in each group was at least 5, except for one set of experiments in Figure S2 wherein there are some groups with $n = 4$, and therefore comparisons between groups were not undertaken. The group size is the number of independent values, and statistical analysis was undertaken using these independent values. Outliers were included in data analysis and presentation. Data analysis was performed blinded.

RESULTADOS

Statistically significant differences between means of two groups were analyzed by using paired or unpaired Student's t test where appropriate, or one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test for comparisons involving more than two groups, when F was significant. P values < 0.05 were considered significant. Outliers were included in the analysis. All statistical analysis was calculated using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, RRID:SCR_002798).

2.10 Nomenclature of targets and ligands

Key protein targets and ligands in this article are hyperlinked to corresponding entries in <http://www.guidetopharmacology.org> and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2019/20 (IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology, RRID:SCR_013077).

3. RESULTS

3.1 General parameters

Metabolic parameters of lean and obese rats used in the study are shown in Table 1. OZR exhibited a marked increase in body and kidney weight, moderate hyperglycemia, hyperinsulinemia, hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia compared with LZR. The normalized internal lumen diameters, l_1 , were not significantly different in 2nd-3rd order branches renal interlobar arteries from LZR ($329 \pm 10 \mu\text{m}$, $n=28$ arteries from 15 rats) compared to those of OZR ($322 \pm 11 \mu\text{m}$, $n=27$ arteries from 15 rats). The relaxations to ACh in the OZR group ($51\% \pm 4$, $n=25$ arteries from 15 rats, $p < 0.05$) were significantly impaired compared to those in the LZR group ($67\% \pm 3$, $n=28$ arteries from 15 rats).

Metabolic parameters of lean and *ob/ob* mice are shown in Table 2. Kidney and body weight and daily food intake were significantly higher in *ob/ob* mice than in lean controls. Plasma glucose levels were elevated in obese mice, while plasma triglycerides and cholesterol have been reported to be also higher in this breed compared to lean controls (Cool et al., 2006). Normalized internal lumen diameters, l_1 , were not significantly different in 1st-2nd order branches renal interlobar arteries from *ob/ob* mice ($278 \pm 30 \mu\text{m}$, 10 arteries from $n=5$ mice) compared to those in their lean littermates ($247 \pm 19 \mu\text{m}$, 8 arteries from $n=6$ mice).

3.2 Impaired endothelial Akt/eNOS/NO vasodilator pathway in preglomerular renal arteries in obesity

Endothelial function was evaluated by the relaxations to ACh and to the general β_1 and β_2 -adrenoceptor agonist isoprenaline in renal arteries from LZR and OZR. Activation of β -adrenoceptors, mainly located on vascular smooth muscle (VSM), produces vasodilation mediated by AMPc, although endothelial cells also express β -adrenoceptors whose activation leads to NO production and vasorelaxation via the PI3K/Akt/eNOS pathway (Chruscinski et al., 2001; Ferro et al., 2004). Endothelium-dependent relaxations to both ACh and isoprenaline were significantly reduced in obese compared to lean rats (Figure 1a and b; Table 3). Mechanical endothelium removal and inhibition of eNOS (Figure 1c and d) or PI3K blockade (Figure 1g and h; Table 3) markedly reduced the relaxations induced by isoprenaline in intrarenal arteries of LZR but not in those of OZR, thus indicating that the endothelial Akt/eNOS/NO pathway in preglomerular arteries is impaired in obese rats. Western blot analysis confirmed that basal activity of

this endothelial pathway was markedly reduced in arteries from obese rats since both levels of p-eNOS and p-Akt (Figure 1e and i) and expression of eNOS and Akt (Figure 1f and j) were significantly lower in OZR renal preglomerular arteries than in LZR arteries.

3.2 Impaired AMPK activity and renal and systemic AMPK-induced vasorelaxation in obesity

Relaxations elicited by the selective AMPK activator A769662 (10 and 30 μ M) were significantly reduced in renal interlobar arteries and also mesenteric arteries of OZR compared to LZR (Figure 2a-d). Impaired relaxations to A769662 were associated to reduced AMPK activity in renal arteries of OZR compared to LZR. Thus, Western blot analysis of artery homogenates revealed a decreased AMPK α phosphorylation (Figure 2e) and expression (Figure 2f) of in arteries from OZR. In keeping with those data, p-ACC protein levels were also reduced in OZR renal arteries (Figure 2g).

The involvement of the endothelial PI3K/eNOS/NO pathway in the impaired relaxations elicited by AMPK activation in preglomerular arteries of obese rats was further assessed. Mechanical endothelial cell removal and pharmacological blockade of NOS (by L-NOARG) or PI3K (by LY-294002) significantly reduced the relaxations to A769662 in arteries of LZR (Figure 3a, d, g). In contrast, A769662 induced relaxations after removal of endothelium or inhibition of NOS or PI3K were unchanged or even enhanced in preglomerular arteries of OZR compared to controls (Figure 3b, e, h) and the magnitude of these relaxations was not different from that in LZR arteries after removal of endothelium or blockade of NOS or PI3K (Figure 3c, f and i). Overall, these data indicate that endothelium-dependent vasodilation induced by AMPK activation is altered due to impaired endothelial/PI3K/eNOS pathway in obese rats, while endothelium-independent AMPK VSM-mediated relaxations in preglomerular arteries are preserved in obese rats.

3.4 Acute in vitro AMPK treatment improves metabolic activity and restores endothelial function of intrarenal arteries in obesity

AMPK dysregulation has been identified as a major risk for development of CKD in obesity, metabolic syndrome and diabetes (De Vries et al., 2014; Decleves et al., 2011; L. L. Dugan et al., 2013) and specific AMPK activation in the kidney has been proposed as a potential target to improve renal function (Salatto et al., 2017). Therefore, in order to investigate whether acute treatment with AMPK activator is beneficial for endothelial

RESULTADOS

function in obesity, renal arteries from LZR and OZR were incubated *ex vivo* with A769662 for 40 minutes before a second concentration-response curve for the endothelial agonist ACh was performed. As shown in Figure 4, acute *in vitro* treatment with the AMPK activator A769662 did not significantly change relaxations to ACh in control rats (Figure 4a), but increased ACh-induced vasodilation in arteries from OZR (Figure 4b).

Western blot analysis demonstrated that *ex vivo* incubation of renal preglomerular arteries with A769662 increased phosphorylation of the AMPK downstream target ACC in LZR (Figure 4c) and also in OZR (Figure 4d). Moreover, p-eNOS and eNOS protein levels were markedly enhanced in arteries from lean rats after treatment with A769662 (Figure 4e and g), thus confirming the involvement of the endothelial PI3K/eNOS/NO pathway in AMPK renal arterial dilatation. In arteries from OZR, acute treatment with A769662 increased protein levels of eNOS but not p-eNOS (Figure 4f and h).

In order to further investigate whether AMPK activation may be beneficial for renal endothelial function in obesity, we tested the *in vivo* effects of A769662 administration in genetically obese mice. Endothelial function of preglomerular arteries and β -adrenoceptor and AMPK-mediated vasodilation were assessed in interlobar arteries from *ob/ob* and lean mice. As found for arteries of OZR, endothelium-dependent ACh and isoprenaline vasodilator pathways as well as AMPK-mediated vasorelaxation were impaired in arteries from *ob/ob* compared to those in lean mice (Figure 5a, b, c) (Table 4). Interestingly, in contrast to the impaired endothelial relaxations in preglomerular arteries, there was a pronounced increase in basal p-eNOS and eNOS levels (Supplementary Figure 1c and d) in cortical samples from *ob/ob* mice compared to controls, suggesting an up-regulation of the endothelial eNOS/NO pathway in renal cortex of obese mice. Western blot analysis also revealed that basal phosphorylation of AMPK α (Supplementary Figure 1a) and of its downstream target ACC (Supplementary Figure 1b) were significantly higher in renal cortex of obese compared to lean mice. These data thus show endothelial dysfunction and AMPK dysregulation in renal preglomerular resistance arteries of *ob/ob* mice, while up-regulation of eNOS and AMPK activities in renal cortex of obese animals

3.5 *In vivo* AMPK treatment restores endothelial function in preglomerular arteries and improves metabolic and AMPK activity in renal cortex of *ob/ob* mice

Metabolic parameters of lean and *ob/ob* mice treated with vehicle or A769662 are shown in Table 2. A769662 administration improved plasma glucose and lactate levels, reduced

kidney weight and induced a trend to reduce body weight and daily food intake in *ob/ob* mice (Table 2; Supplementary Figure 2).

After a 4 day-*in vivo*-treatment with A769662 or vehicle, endothelial/vascular function of renal interlobar arteries from *ob/ob* mice and lean controls was assessed in arteries mounted in parallel in microvascular myographs. As shown in Figure 5d and e and Table 4, vasodilator responses to ACh or to the β -adrenoceptor agonist isoprenaline in arteries from lean mice were similar in vehicle- and A769662-treated groups. However, A769662-treatment significantly increased Ach- (Figure 5d) and isoprenaline- (Figure 5e) induced vasorelaxation in renal arteries of *ob/ob* mice compared to those of vehicle-treated obese mice. Comparison of ACh and isoprenaline relaxations in the *ob/ob*-treated group to those in vehicle-treated lean group, confirmed that *in vivo* treatment with the AMPK activator A769662 recovered the loss of both isoprenaline-induced relaxations and ACh endothelium-dependent vasodilation in *ob/ob* mice (Figures 5d and e). On the other hand, A769662 treatment enhanced eNOS phosphorylation at Ser1177 in renal cortex from lean (Figure 5f) but not obese mice (Figure 5g) wherein both eNOS and p-eNOS Ser¹¹⁷⁷ were already up-regulated (Supplementary Figure 1c and d). *In vivo* activation of AMPK improved metabolic activity in renal cortex of both lean and *ob/ob* mice compared to the vehicle group, as depicted by the increased phosphorylation of AMPK α (Figure 5 h,i).

3.6 Anti-inflammatory role of *in vivo* AMPK activation by suppressing NF- κ B signalling in kidney of *ob/ob* mice

Accumulation of the excess of FA in skeletal muscle and other organs in obesity and metabolic syndrome leads to activation of the NF- κ B signaling pathway that increases circulating cytokines and produces systemic inflammation. AMPK activation has been shown to have important anti-inflammatory effects by suppressing the NF- κ B axis (Green, Macrae, et al., 2011; Green, Pedersen, et al., 2011). In order to assess the effect of *in vivo* treatment with A769662 on the kidney inflammatory response of genetically obese mice, we measured p-IKK, IKK, NF- κ B and TNF- α protein levels. Western blot analysis showed that protein levels of p-IKK and TNF- α were significantly increased in renal cortex of *ob/ob* mice compared to controls (Figure 6a and g), but not those of IKK or NF- κ B protein (Figure 6 c and e). *In vivo* treatment with A769662 produced a significant reduction of p-IKK (Figure 6b), IKK (Figure 6d), NF- κ B (Figure 6f) and TNF- α (Figure 6h) protein expression in renal cortex of *ob/ob* mice when compared to *ob/ob* mice treated with vehicle. These data suggest that *in vivo* treatment with A769662 suppresses renal inflammation in obese mice.

3.7 *In vivo* treatment with A769662 restores impaired kidney NADPH-derived ROS production in renal cortex of *ob/ob* mice

To investigate the antioxidant effects of AMPK activation in the kidney, ROS levels were assessed in renal cortex samples of lean and genetically obese mice after *in vivo* administration of A769662. Interestingly, $O_2^{\cdot-}$ levels measured by lucigenin chemiluminescence after stimulation with NADPH were significantly reduced in renal cortex from *ob/ob* mice compared to lean controls, as shown in Figure 7a. *In vivo* treatment with A769662 augmented NADPH-stimulated $O_2^{\cdot-}$ levels in cortical samples of *ob/ob* mice (Figure 7b), while reduced NADPH-stimulated $O_2^{\cdot-}$ levels in lean mice compared to those of vehicle-treated lean mice (Supplementary Figure 3a). These data indicate that *in vivo* AMPK activation restores reduced renal cortex levels of ROS in obese to levels similar to those in lean control mice. Furthermore, western blot analysis showed that protein content of Nox4 was significantly reduced in renal cortex from *ob/ob* compared to lean mice (Figure 7c). *In vivo* treatment with A769662 further significantly reduced Nox4 protein levels in renal cortex from both *ob/ob* mice (Figure 7d), and also those in lean controls (Supplementary Figure 3b).

On the other hand, NADPH-derived ROS production was measured in myocardium samples of lean and *ob/ob* mice in order to compare the effect of *in vivo* AMPK activation on heart to the effect on kidney samples. $O_2^{\cdot-}$ levels detected by chemiluminescence were also significantly reduced in the heart of *ob/ob* mice compared to controls, as shown in Figure 7e. Likewise in renal cortex, *in vivo* treatment with A769662 reduced NADPH-stimulated $O_2^{\cdot-}$ levels in lean mice (Supplementary Figure 3c). However, there were not significant differences in NADPH-stimulated $O_2^{\cdot-}$ levels in the myocardium from A769662-treated and vehicle-treated groups of *ob/ob* mice (Figure 7f).

3.8 Both *ex vivo* and *in vivo* AMPK activation with A769662 reduces NADPH-derived ROS production in renal preglomerular arteries from OZR

The antioxidant effects of both *in vitro* and *in vivo* AMPK activation on kidney vascular tissues in obesity were investigated in interlobar arteries from LZR and OZR. NADPH-stimulated $O_2^{\cdot-}$ levels were markedly increased in isolated preglomerular arteries of OZR compared to LZR (Figure 8a). In contrast, NADPH-stimulated H_2O_2 generation was significantly reduced in arteries of obese rats compared to lean controls (Figure 8b). Acute *in vitro* treatment with A769662 induced a powerful suppression of NADPH-

RESULTADOS

stimulated $O_2^{\cdot-}$ in samples of renal arteries from both LZR and OZR as shown in Figure 8a. A769662 also reduced NADPH-stimulated H_2O_2 production in arteries from LZR, and to a lesser extent in OZR, wherein H_2O_2 production was already reduced compared to lean controls (Figure 8b). These data show that the increase in the overall NADPH-derived $O_2^{\cdot-}$ levels contributes to oxidative stress in renal vasculature in obesity, despite NADPH-derived H_2O_2 levels are reduced in preglomerular arteries. Interestingly, A769662 acts as an effective vascular antioxidant and can counteract and reduce arterial ROS production in obese rats.

Western blot analysis showed that basal protein levels of Nox4 were significantly lower in renal arteries of OZR compared to LZR (Figure 8c). Moreover, acute treatment with A769662 markedly reduced Nox4 protein levels in renal arteries from both LZR and OZR (Supplementary Figure 4a and b) thus suggesting that AMPK activation downregulates Nox4-derived arterial H_2O_2 production from lean and obese Zucker rats.

In vivo experiments showed that NADPH-derived ROS were markedly increased in OZR preglomerular arteries compared to those in LZR arteries from vehicle-treated groups (Figure 8d and e). As in the *in vitro* assay, *in vivo* administration of A769662 also reduced NADPH-stimulated $O_2^{\cdot-}$ levels in renal preglomerular arteries from LZR (Figure 8d) and OZR (Figure 8e) when compared to groups treated with vehicle. These data indicate that *in vivo* AMPK activation has vascular antioxidant effects by reducing superoxide levels in renal arteries in obesity.

4. DISCUSSION

Obesity is risk factor for the development of CKD independent of diabetes, hypertension and other comorbidities and AMPK dysregulation seems to play a key role in inflammation and fibrosis underlying obesity-associated nephropathy (Decleves et al., 2011). Here we first demonstrate that activation of AMPK not only improves metabolic state and reduces inflammation in the kidney of genetically obese animals, but also ameliorates endothelial dysfunction and vascular oxidative stress while restores redox balance in renal cortex.

AMPK activity has been reported to be impaired in muscle, liver and kidney under conditions of metabolic stress such as obesity (Ix & Sharma, 2010; Liu et al., 2005; Motawi et al., 2009). In the kidney, reduced renal AMPK activity was associated with inflammation, increased matrix accumulation, glomerular hypertrophy, tubular injury and albuminuria in high fat diet (HFD)-induced obese mice, and AMPK activation by treatment with AICAR prevented abnormal structural and functional effects of HFD (Decleves et al., 2011; Kume et al., 2007; Szeto et al., 2016). The present findings show that AMPK expression and activity were greatly reduced in renal arteries of genetically obese rats associated with blunted NO-mediated relaxation of the specific AMPK activator A769662, along with reduced phosphorylation of the AMPK downstream target ACC, rate-limiting enzyme for *de novo* FA synthesis that favors mitochondrial FA oxidation. While impaired relaxations suggest endothelial dysfunction, decreased ACC activity may be involved in kidney vascular lipotoxicity, as reported for the aortic endothelium of obese OLEFT rats wherein augmented triglycerides and lipid peroxidation was associated to reduced AMPK activity, reduced NO and endothelial dysfunction (Lee et al., 2005). Therefore, renal dysfunction related to AMPK dysregulation in obesity is not only due to glomerulopathy, fibrosis or lipotoxicity-induced tubular injury (Decleves et al., 2011; Decleves, Sharma, et al., 2014; Szeto et al., 2016), but also notably to impaired AMPK vascular effects.

AMPK has recently been involved in the metabolic regulation of kidney blood flow and causes vasodilation of human renal arteries through both endothelium-dependent and independent mechanisms (Rodríguez et al., 2020). In the present study, reduced relaxant effects of AMPK activation were found in preglomerular arteries associated with endothelial dysfunction and impaired endothelial PI3K/eNOS/NO pathway in obese rats. Thus, relaxations induced by the endothelial agonist ACh and by the β -adrenoceptor agonist isoprenaline were markedly reduced along with diminished basal eNOS and Akt activity and expression in renal arteries of OZR. Endothelial β -adrenoceptors can modulate eNOS and NO-mediated vasodilation through eNOS phosphorylation via different pathways including the PKA/Akt and PI3K/Akt pathways (Banquet et al., 2011;

RESULTADOS

Kou & Michel, 2007), both activated downstream by AMPK. Accordingly, both isoprenaline and AMPK-mediated relaxations were unchanged by endothelial cell removal and resistant to NOS or PI3K blockade in kidney preglomerular arteries of obese rats thus confirming an impaired endothelial PI3K/NOS/NO pathway. Endothelium-mediated AMPK relaxations in renal arteries do not only involve NO but also an endothelium-derived hyperpolarization (EDH)-type component mediated by stimulation of IK_{Ca} channels in endothelial cells (Rodríguez et al., 2020; Rodríguez et al., 2021a). However, it is unlikely that this non-NO non-prostanoid EDH component accounts for the defective AMPK-mediated relaxations, since it is augmented to compensate for endothelial NO impairment in renal arteries in obesity (Muñoz et al., 2019). Therefore, our findings first demonstrate that endothelial dysfunction due to impaired PI3K-Akt-eNOS pathway is associated to defective AMPK-vasodilation in preglomerular arteries of genetically obese rats, as earlier reported for large conductance arteries like aorta from diet-induced models of obesity (Concha F. García-Prieto et al., 2015). In contrast to the blunted endothelial relaxations involving NO, renal AMPK endothelium-independent vasodilation was preserved or even enhanced in OZR, as depicted by the larger relaxations induced by the AMPK activator A769662 in endothelium-denuded preglomerular arteries or arteries treated with blockers of NOS or PI3K in OZR. AMPK is expressed in both endothelial and vascular smooth muscle (VSM) cells in renal arteries and can activate K_{ATP} channels and phosphorylate SERCA pump in VSM thus contributing to arterial relaxation and to the metabolic regulation of renal blood flow (Rodríguez et al., 2020; Rodríguez et al., 2021a). The preserved endothelium-independent relaxations elicited by A769662 in arteries from OZR suggests a therapeutic potential of AMPK activators in vascular complications of metabolic disease wherein endothelium dysfunction and altered eNOS/NO signalling pathway reduce NO availability.

Interestingly, our results confirm the key role of AMPK in kidney vascular function and demonstrate that AMPK activation ameliorates renal endothelial dysfunction in preglomerular arteries in obesity. Acute *ex vivo* treatment of whole arteries with A769662 augmented ACC phosphorylation and markedly enhanced eNOS activity and expression in LZR, thus supporting the involvement of the endothelial PI3K/Akt/NO pathway in AMPK-mediated renal vasodilation (Levine et al., 2007). In preglomerular arteries of obese rats, A769662 restored impaired endothelium-dependent relaxations by enhancing NOS expression. AMPK activation has also been implicated in the EDH-mediated relaxations of resistance arteries, since this EDH type vasodilation is lost after specific knock-out of the endothelial AMPK α_1 subunit (Enkhjargal et al., 2014). Therefore, stimulation of endothelial IK_{Ca} channels and of the EDH-type response as recently

RESULTADOS

reported in intrarenal arteries (Rodríguez et al., 2020; Rodríguez et al., 2021a) could also contribute to the A769662-induced restoration of endothelium-dependent relaxations in intrarenal arteries from obese rats. The beneficial effects of AMPK activation on renal endothelial dysfunction in the obese kidney were further assessed by *in vivo* administration of A769662 in the *ob/ob* model of genetic obesity/metabolic syndrome. We first provide evidence here for endothelial dysfunction and abnormal β -adrenoceptor- and AMPK-mediated relaxations in preglomerular interlobar arteries of genetically obese mice, as depicted by the impaired relaxations to ACh, isoprenaline and A769662. Interestingly, augmented eNOS phosphorylation and expression were found in renal cortex samples (including arterioles, glomeruli and peritubular capillaries) from the same animals thus suggesting a compensatory up-regulation of NOS activity to protect glomerular NO-mediated endothelial function in the kidney of *ob/ob* mice. Moreover, a metabolic protection was also found in renal cortex of obese kidney, as shown by the augmented AMPK and ACC phosphorylation indicative of a higher basal AMPK activity that might reflect a compensation for the obesity-driven FA oversupply and accumulation in renal tubular and endothelial cells, in an attempt to increase ACC-mediated FA incorporation β -oxidation in the mitochondria, as reported for obese human skeletal myocytes (Green, Macrae, et al., 2011).

In the present study, AMPK activation via *in vivo* administration of A769662 improved metabolic state and reduced plasma glucose levels, daily food intake and kidney weight, but also prevented inflammation and notably ameliorated kidney vascular dysfunction in obese animals. Thus, endothelium-dependent relaxations to ACh were restored to levels in lean rats and those to the β -adrenoceptor agonist isoprenaline were improved in preglomerular interlobar arteries after *in vivo* administration of A769662 in *ob/ob* mice, while basal AMPK activity was further enhanced in samples of renal cortex. The beneficial effects of AMPK activation on renal vascular function of obese kidney are consistent with the cardiovascular protective actions of drugs used in the treatment of metabolic disorders that activate AMPK such as AICAR, metformin or thiazolidinediones (Ewart & Kennedy, 2011).

Obesity-related kidney injury has been associated with renal inflammation and oxidative stress that are ameliorated by AMPK activation in diet-induced models of obesity (Decleves et al., 2011; Decleves, Sharma, et al., 2014). In obesity, metabolic unbalance favors a chronic low-grade inflammation and FA accumulation increases circulating levels of proinflammatory cytokines like $\text{TNF}\alpha$ via activation of the transcription factor $\text{NF}\kappa\text{B}$, that impairs insulin signaling in skeletal muscle, adipose tissue and endothelial cells (Green, Macrae, et al., 2011; McLaughlin et al., 2008; Prieto et al., 2014; Weisberg et al., 2003). $\text{TNF}\alpha$ has in turn been involved in the inhibition of AMPK

RESULTADOS

activity in skeletal muscle in obesity through the TNF receptor 1, suppressing FA oxidation and promoting insulin resistance (IR) (Steinberg et al., 2006). The present findings demonstrate an inflammatory response in the kidney of genetically obese mice with increased renal levels of TNF α associated with activation of the NF- κ B signaling pathway, as depicted by the enhanced phosphorylation of IKK which allows NF- κ B translocation into the nucleus and its activation (Hinz et al., 2012). In vivo administration of the thienopyridone A769662 attenuated renal inflammation in *ob/ob* renal cortex by suppressing NF- κ B signaling (reduced IKK phosphorylation and NF κ B expression) leading to decreased levels of the inflammatory cytokine TNF α . These findings support the modulatory role of AMPK activators such as AICAR and metformin in inflammation, as demonstrated in other cells types such as glial (Giri et al., 2004), endothelial cells (Katerelos et al., 2010a) and skeletal myocytes of obese/type 2 diabetic patients (Green, Macrae, et al., 2011) and are consistent with the anti-inflammatory effect earlier reported for AICAR in the kidney of HFD-obese mice (Decleves et al., 2011; Decleves, Sharma, et al., 2014). Moreover, previous studies have shown that AMPK activation exerts its vasoprotective effects not only through augmentation of endothelial NO availability but also through its anti-inflammatory effects on endothelial cells by suppressing NF- κ B, TNF α and adhesion molecules such as VACM-1 and E-selectin (Hattori et al., 2010; Krasner et al., 2014). Accordingly, suppression of the NF- κ B signaling found in renal cortex samples of *ob/ob* mice after in vivo administration of A769662 could be ascribed in part to its anti-inflammatory action on the glomerular endothelium.

ROS overproduction and oxidative stress have consistently been involved in the pathogenesis of diabetes and obesity-related vascular complications including diabetic nephropathy (Decleves et al., 2011; Jha et al., 2014; Muñoz et al., 2019; Muñoz et al., 2015; Sharma, 2016). We demonstrate here that the overall NADPH-dependent superoxide production was markedly reduced in the renal cortex of *ob/ob* mice compared to controls, and this was also the case for superoxide production in the heart of the same animals despite cardiac ROS levels in lean animals were significantly lower than those in kidney. Reduced renal superoxide production in *ob/ob* mice is consistent with the lower levels of both basal and NADPH-dependent H₂O₂ generation recently observed in the renal cortex of the obese Zucker rat (Muñoz et al., 2019). These findings in rodent models of genetic obesity are in agreement with those first reported by the Sharma's group in the diabetic kidney (L. L. Dugan et al., 2013), wherein AMPK dysregulation promoted a reduced mitochondrial superoxide production that was ascribed to impaired electron transport chain activity. Mitochondria are a major source of ROS generation and render 80% of endogenously produced basal superoxide. FA oxidation is a preferred energy

RESULTADOS

source in highly metabolic cells like cardiac myocytes and proximal tubule renal cells, mitochondrial β -oxidation of FA accounting for two thirds of the overall kidney O_2 consumption and taking place mostly in proximal tubule. Therefore, reduced superoxide production in the kidney of rodent models of diabetes (L. L. Dugan et al., 2013; Sharma, 2016) and obesity, as shown in the present study, might reflect mitochondrial dysfunction linked to impaired FA metabolism, which has also been demonstrated to underlie tubuleinterstitial fibrosis in the human kidney (Kang et al., 2015).

Renal lipotoxicity and defective FA oxidation caused by lipid accumulation and the associated kidney damage in obesity have been shown to be related to the reduced AMPK activity (Decleves et al., 2011; Decleves, Zolkipli, et al., 2014; Szeto et al., 2016). In our study, activation of AMPK by *in vivo* treatment with A769662 restored superoxide production in renal cortex but not in the heart of *ob/ob* mice, and enhanced AMPK and ACC activity. By phosphorylating and inhibiting ACC, AMPK decreases lipid synthesis and increases FA import in the mitochondria for β -oxidation which suggests that AMPK treatment restores mitochondrial function and redox balance in the kidney of obese mice, in agreement with that earlier reported for the diabetic kidney wherein activation of AMPK with AICAR enhanced superoxide generation by improving activity of complexes I and III and mitochondrial biogenesis (L. L. Dugan et al., 2013), hence leading to amelioration of inflammation, fibrosis and albuminuria (Declèves & Sharma, 2015; Decleves et al., 2011; L. L. Dugan et al., 2013).

In contrast to the lower superoxide levels found in renal tubular tissues of *ob/ob* mice, ROS overproduction has been reported in mesangial cells and vascular tissues of obese and diabetic kidneys, wherein various sources of ROS generation including COX-2, xanthin oxidase and Nox have been involved in oxidative stress (Elmarakby & Imig, 2010; Jha et al., 2014; Muñoz et al., 2019; Muñoz et al., 2015). Accordingly, the overall NADPH-dependent superoxide production was confirmed to be greatly augmented in preglomerular arteries of obese rats as earlier reported (Muñoz et al., 2018; Muñoz et al., 2015), and both *ex vivo* and *in vivo* activation of AMPK were found to reduce vascular oxidative stress. AMPK reduces Nox4 expression in podocytes (Sharma K, 2008) and modulates redox balance in kidney preglomerular arteries through both downregulation of Nox4 expression and through inhibition of Nox2 activation (Rodríguez et al., 2020; Rodríguez et al., 2021a). The powerful suppression of superoxide generation induced by *ex vivo* treatment with the AMPK activator A769662 in whole renal preglomerular arteries of OZR could mainly be ascribed to inhibition of Nox2, that generates superoxide, rather than downregulation of Nox4. Thus, arterial oxidative stress in the kidney of obese rats is mostly due to augmented superoxide-generating Nox1 and Nox2 activity, in contrast to renal cortex wherein Nox-derived superoxide was mainly produced

RESULTADOS

by Nox1, and both expression and activity of Nox2 were reduced in obese animals (Muñoz et al., 2019), and Nox2 up-regulation and endothelial dysfunction mediated by enhanced NF-κB activation have been shown to be reversed by AICAR in endothelial cells of AMPK α_1 knockout mice (Wang et al., 2010) (Schuhmacher, Foretz, Knorr, Jansen, Hortmann, Wenzel, Oelze, Kleschyov, Daiber, Keaney, Wegener, Lackner, Münzel, et al., 2011). In contrast, Nox4 expression and Nox4-derived H₂O₂ production were reduced in vascular tissues of genetically obese rats (Muñoz et al., 2019) and also in hyperglycemic type I diabetic mice and other models of chronic kidney disease (Babelova et al., 2012; Sáenz-Medina et al., 2019). The present findings confirm that Nox4 protein content was markedly reduced in both renal cortex of *ob/ob* mice and in preglomerular arteries of OZR kidney along with reduced NADPH-dependent H₂O₂ generation and lower inhibitory effects of A769662 on H₂O₂ levels. Therefore, the powerful suppression of ROS production induced by A769662 in whole arteries *ex vivo* could be mostly ascribed to Nox2 rather than Nox4 inhibition and was associated with the restoration of endothelium-dependent relaxations. Here, the beneficial effects of AMPK activation on ameliorating vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in the obese kidney and the therapeutic antioxidant potential of vascular AMPK activation were further supported by the reduced arterial NADPH-derived superoxide levels in renal arteries of OZR after *in vivo* treatment with A769662.

5. CONCLUSION

In conclusion, our findings first provide evidence for endothelial dysfunction involving impaired AMPK-vasodilation and endothelial PI3K/Akt/eNOS pathway associated with inflammation, vascular oxidative stress and abnormal cortical redox balance in the kidney of genetic models of obesity. This suggests that vascular abnormalities and impaired vascular AMPK activity might contribute along with glomerulopathy, interstitial fibrosis and tubular injury to albuminuria and renal dysfunction in obesity. Activation of the energy sensor AMPK with A769662 improved metabolic state and reduced food-intake, but notably ameliorated vascular dysfunction, oxidative stress and inflammation and also restored cortical redox balance in the obese kidney. These findings support that drugs activating AMPK used in the treatment of metabolic disorders may remarkably improve kidney vascular function and therefore represent valuable therapeutic tools to prevent obesity-related kidney injury.

This article is protected by copyright. All rights reserved

DECLARATION OF COMPETING INTEREST

All authors declare no competing interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovacion (Spain) co-funded by the FEDER Program of EU (grants nº SAF2016-77526-R, PID2019-105689RB and RTI2018-101840-B-I00). Claudia Rodríguez was supported by grant FPU16/04582 from MECED (Spain). We thank Francisco Puente and Manuel Perales for expert technical assistance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

D.P., C.C. and C.R. conceived the idea and designed the study. C.R., C.C., A.S and M.M. conducted the experiments and analyzed data. C.R and D.P wrote the manuscript. C.C., J.S-M., M.H., M.L. and L.R. contributed to the Discussion. C.R., L.R., M.L., C.C and D.P, have read and approved the manuscript.

DATA AVAILABILITY

All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its supplementary information files).

DECLARATION OF TRANSPARENCY AND SCIENTIFIC RIGOUR

This Declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research as stated in the BJP guidelines for Design & Analysis, Immunoblotting and Immunochemistry, and Animal Experimentation and as recommended by funding agencies, publishers, and other organizations engaged with supporting research.

ORCID

Dolores Prieto <https://orcid.org/0000-0001-7049-5991>

REFERENCES

Abrass CK (2004). Overview: Obesity: What Does It Have to Do with Kidney Disease? *Journal of the American Society of Nephrology* 15: 2768.

Amann K, & Benz K (2013). Structural renal changes in obesity and diabetes. *Semin Nephrol* 33: 23-33.

Babelova A, Avaniadi D, Jung O, Fork C, Beckmann J, Kosowski J, *et al.* (2012). Role of Nox4 in murine models of kidney disease. *Free Radic Biol Med* 53: 842-853.

Banquet S, Delannoy E, Agouni A, Dessy C, Lacomme S, Hubert F, *et al.* (2011). Role of G(i/o)-Src kinase-PI3K/Akt pathway and caveolin-1 in β_2 -adrenoceptor coupling to endothelial NO synthase in mouse pulmonary artery. *Cellular signalling* 23: 1136-1143.

Calvert JW, Gundewar S, Jha S, Greer JJM, Bestermann WH, Tian R, *et al.* (2008). Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS- mediated signaling. *Diabetes* 57: 696-705.

Chruscinski A, Brede ME, Meinel L, Lohse MJ, Kobilka BK, & Hein L (2001). Differential distribution of beta-adrenergic receptor subtypes in blood vessels of knockout mice lacking beta(1)- or beta(2)-adrenergic receptors. *Mol Pharmacol* 60: 955-962.

Contreras C, Gonzalez-Garcia I, Seoane-Collazo P, Martinez-Sanchez N, Linares-Pose L, Rial-Pensado E, *et al.* (2017). Reduction of Hypothalamic Endoplasmic Reticulum Stress Activates Browning of White Fat and Ameliorates Obesity. *Diabetes* 66: 87-99.

Cool B, Zinker B, Chiou W, Kifle L, Cao N, Perham M, *et al.* (2006). Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metabolism* 3: 403-416.

De Vries APJ, Ruggerenti P, Ruan XZ, Praga M, Cruzado JM, Bajema IM, *et al.* (2014). Fatty kidney: Emerging role of ectopic lipid in obesity-related renal disease. *The Lancet Diabetes and Endocrinology* 2: 417-426.

Declèves A-E, & Sharma K (2015). Obesity and kidney disease: differential effects of obesity on adipose tissue and kidney inflammation and fibrosis. *Current opinion in nephrology and hypertension* 24: 28-36.

Declèves AE, Mathew AV, Cunard R, & Sharma K (2011). AMPK Mediates the Initiation of Kidney Disease Induced by a High-Fat Diet. *Journal of the American Society of Nephrology* 22: 1846-1855.

Declèves AE, Sharma K, & Satriano J (2014). Beneficial Effects of AMP-Activated Protein Kinase Agonists in Kidney Ischemia-Reperfusion: Autophagy and Cellular Stress Markers. *Nephron Exp Nephrol*.

RESULTADOS

Decleves AE, Zolkipli Z, Satriano J, Wang L, Nakayama T, Rogac M, *et al.* (2014). Regulation of lipid accumulation by AMP-activated kinase [corrected] in high fat diet-induced kidney injury. *Kidney Int* 85: 611-623.

Deng G, Long Y, Yu YR, & Li MR (2010). Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK-eNOS Pathway. *International Journal of Obesity* 34: 165-171.

Dugan LL, You YH, Ali SS, Diamond-Stanic M, Miyamoto S, DeClevés AE, *et al.* (2013). AMPK dysregulation promotes diabetes-related reduction of superoxide and mitochondrial function. *J Clin Invest* 123: 4888-4899.

Elmarakby AA, & Imig JD (2010). Obesity is the major contributor to vascular dysfunction and inflammation in high-fat diet hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)* 118: 291-301.

Enkhjargal B, Godo S, Sawada A, Suvd N, Saito H, Noda K, *et al.* (2014). Endothelial AMP-Activated Protein Kinase Regulates Blood Pressure and Coronary Flow Responses Through Hyperpolarization Mechanism in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34: 1505-1513.

Ewart MA, & Kennedy S (2011). AMPK and vasculoprotection. *Pharmacol Ther* 131: 242-253.

Ferro A, Coash M, Yamamoto T, Rob J, Ji Y, & Queen L (2004). Nitric oxide-dependent β 2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt. *British Journal of Pharmacology* 143: 397-403.

García-Prieto CF, Gil-Ortega M, Aránguez I, Ortiz-Besoain M, Somoza B, & Fernández-Alfonso MS (2015). Vascular AMPK as an attractive target in the treatment of vascular complications of obesity. *Vascular Pharmacology* 67-69: 10-20.

García-Prieto CF, Hernández-Nuño F, Rio DD, Ruiz-Hurtado G, Aránguez I, Ruiz-Gayo M, *et al.* (2015a). High-fat diet induces endothelial dysfunction through a down-regulation of the endothelial AMPK-PI3K-Akt-eNOS pathway. *Molecular nutrition & food research* 59: 520-532.

García-Prieto CF, Pulido-Olmo H, Ruiz-Hurtado G, Gil-Ortega M, Aranguez I, Rubio MA, *et al.* (2015b). Mild caloric restriction reduces blood pressure and activates endothelial AMPK-PI3K-Akt-eNOS pathway in obese Zucker rats. *Vascular Pharmacology* 65-66: 3-12.

Giri S, Nath N, Smith B, Viollet B, Singh AK, & Singh I (2004). 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase. *J Neurosci* 24: 479-487.

RESULTADOS

Green CJ, Macrae K, Fogarty S, Hardie DG, Sakamoto K, & Hundal HS (2011). Counter-modulation of fatty acid-induced pro-inflammatory nuclear factor κ B signalling in rat skeletal muscle cells by AMP-activated protein kinase. *Biochem J* 435: 463-474.

Green CJ, Pedersen M, Pedersen BK, & Scheele C (2011). Elevated NF- κ B activation is conserved in human myocytes cultured from obese type 2 diabetic patients and attenuated by AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 60: 2810-2819.

Hallows KR, Mount PF, Pastor-Soler NM, & Power DA (2010). Role of the energy sensor AMP-activated protein kinase in renal physiology and disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 298: F1067-1077.

Hattori Y, Jojima T, Tomizawa A, Satoh H, Hattori S, Kasai K, *et al.* (2010). A glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, liraglutide, upregulates nitric oxide production and exerts anti-inflammatory action in endothelial cells. *Diabetologia* 53: 2256-2263.

Hinz M, Arslan S, & Scheidereit C (2012). It takes two to tango: I κ Bs, the multifunctional partners of NF- κ B. *Immunol Rev* 246: 59-76.

Ix JH, & Sharma K (2010). Mechanisms linking obesity, chronic kidney disease, and fatty liver disease: the roles of fetuin-A, adiponectin, and AMPK. *J Am Soc Nephrol* 21: 406-412.

Jha JC, Gray SP, Barit D, Okabe J, El-Osta A, Namikoshi T, *et al.* (2014). Genetic targeting or pharmacologic inhibition of NADPH oxidase nox4 provides renoprotection in long-term diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 25: 1237-1254.

Kang HM, Ahn SH, Choi P, Ko YA, Han SH, Chinga F, *et al.* (2015). Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nat Med* 21: 37-46.

Katerelos M, Mudge S, Stapleton D, Auwardt R, Fraser S, Chen CG, *et al.* (2010). 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside and AMP-activated protein kinase inhibit signalling through NF- κ B. *Immunology and cell biology* 88: 754-760.

Kikuchi H, Sasaki E, Nomura N, Mori T, Minamishima YA, Yoshizaki Y, *et al.* (2018). Failure to sense energy depletion may be a novel therapeutic target in chronic kidney disease. *Kidney International* 95: 123-137.

Kou R, & Michel T (2007). Epinephrine regulation of the endothelial nitric-oxide synthase: roles of RAC1 and beta3-adrenergic receptors in endothelial NO signaling. *J Biol Chem* 282: 32719-32729.

Kramer H, Luke A, Bidani A, Cao G, Cooper R, & McGee D (2005). Obesity and prevalent and incident CKD: the Hypertension Detection and Follow-Up Program. *Am J Kidney Dis* 46: 587-594.

RESULTADOS

Krasner NM, Ido Y, Ruderman NB, & Cacicedo JM (2014). Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog liraglutide inhibits endothelial cell inflammation through a calcium and AMPK dependent mechanism. *PLoS One* 9: e97554.

Kume S, Uzu T, Araki S-i, Sugimoto T, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, *et al.* (2007). Role of Altered Renal Lipid Metabolism in the Development of Renal Injury Induced by a High-Fat Diet. *Journal of the American Society of Nephrology* 18: 2715.

Lee WJ, Lee IK, Kim HS, Kim YM, Koh EH, Won JC, *et al.* (2005). α -lipoic acid Prevents Endothelial Dysfunction in Obese Rats via Activation of AMP-Activated Protein Kinase. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25: 2488-2494.

Levine YC, Li GK, & Michel T (2007). Agonist-modulated regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in endothelial cells. Evidence for an AMPK \rightarrow Rac1 \rightarrow Akt \rightarrow endothelial nitric-oxide synthase pathway. *J Biol Chem* 282: 20351-20364.

Liu Y, Wan Q, Fau - Guan Q, Guan Q, Fau - Gao L, Gao L, Fau - Zhao J, & Zhao J (2005). High-fat diet feeding impairs both the expression and activity of AMPKa in rats' skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 339: 701-707.

Lobato NS, Filgueira FP, Prakash R, Giachini FR, Ergul A, Carvalho MHC, *et al.* (2013). Reduced Endothelium-Dependent Relaxation to Anandamide in Mesenteric Arteries from Young Obese Zucker Rats. *PLOS ONE* 8: e63449.

Lopez M, Nogueiras R, Tena-Sempere M, & Dieguez C (2016). Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nat Rev Endocrinol* 12: 421-432.

Martinez-Sanchez N, Seoane-Collazo P, Contreras C, Varela L, Villarroya J, Rial-Pensado E, *et al.* (2017). Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance. *Cell Metab* 26: 212-229 e212.

McLaughlin T, Deng A, Gonzales O, Aillaud M, Yee G, Lamendola C, *et al.* (2008). Insulin resistance is associated with a modest increase in inflammation in subcutaneous adipose tissue of moderately obese women. *Diabetologia* 51: 2303-2308.

Motawi TM, Hashem RM, Rashed LA, & El-Razek SM (2009). Comparative study between the effect of the peroxisome proliferator activated receptor-alpha ligands fenofibrate and n-3 polyunsaturated fatty acids on activation of 5'-AMP-activated protein kinase-alpha1 in high-fat fed rats. *J Pharm Pharmacol* 61: 1339-1346.

Muñoz M, López-Oliva ME, Pinilla E, Martínez MP, Sánchez A, Rodríguez C, *et al.* (2017). CYP epoxygenase-derived H₂O₂ is involved in the endothelium-derived hyperpolarization (EDH) and relaxation of intrarenal arteries. *Free Radical Biology and Medicine* 106: 168-183.

RESULTADOS

Muñoz M, López-oliva ME, Rodríguez C, Pilar M, Sáenz-medina J, Sánchez A, *et al.* (2019). Differential contribution of Nox1 , Nox2 and Nox4 to kidney vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in obesity. *Redox Biology* 28: 101330-101330.

Muñoz M, Martínez MP, López-Oliva ME, Rodríguez C, Corbacho C, Carballido J, *et al.* (2018). Hydrogen peroxide derived from NADPH oxidase 4- and 2 contributes to the endothelium-dependent vasodilatation of intrarenal arteries. *Redox Biology* 19: 92-104.

Muñoz M, Sánchez A, Pilar Martínez M, Benedito S, López-Oliva M-E, García-Sacristán A, *et al.* (2015). COX-2 is involved in vascular oxidative stress and endothelial dysfunction of renal interlobar arteries from obese Zucker rats. *Free Radic Biol Med* 84: 77-90.

Prieto D, Contreras C, & Sánchez A (2014). Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. *Curr Vasc Pharmacol* 12: 412-426.

Rodríguez C, Contreras C, Sáenz-Medina J, Muñoz M, Corbacho C, Carballido J, *et al.* (2020). Activation of the AMP-related kinase (AMPK) induces renal vasodilatation and downregulates Nox-derived reactive oxygen species (ROS) generation. *Redox Biol* 34: 101575.

Rodríguez C, Muñoz M, Contreras C, & Prieto D (2021). AMPK, Metabolism and Vascular Function. *The FEBS Journal* n/a Accepted Author Manuscript.

Rossoni Luciana V, Wareing M, Wenceslau Camilla F, Al-Abri M, Cobb C, & Austin C (2011). Acute simvastatin increases endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via AMP-activated protein kinase and reduces contractility of isolated rat mesenteric resistance arteries. *Clinical Science* 121: 449-458.

Ruderman N, & Prentki M (2004). AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov* 3: 340-351.

Sáenz-Medina J, Muñoz M, Sanchez A, Rodriguez C, Jorge E, Corbacho C, *et al.* (2019). Nox1-derived oxidative stress as a common pathogenic link between obesity and hyperoxaluria-related kidney injury. *Urolithiasis* 48: 481-492.

Salatto CT, Miller RA, Cameron KO, Cokorinos E, Reyes A, Ward J, *et al.* (2017). Selective Activation of AMPK β 1-Containing Isoforms Improves Kidney Function in a Rat Model of Diabetic Nephropathy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 361: 303-311.

Schuhmacher S, Foretz M, Knorr M, Jansen T, Hortmann M, Wenzel P, *et al.* (2011). α 1AMP-activated protein kinase preserves endothelial function during chronic angiotensin II treatment by limiting Nox2 upregulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 560-566.

Sharma K (2014). Obesity, oxidative stress, and fibrosis in chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* (2011) 4: 113-117.

RESULTADOS

Sharma K (2016). Obesity and Diabetic Kidney Disease: Role of Oxidant Stress and Redox Balance. *Antioxidants & Redox Signaling* 25: 208-216.

Sharma K RS, Qiu G, Usui HK, Zhu Y, Dunn SR, Ouedraogo R, Hough K, McCue P, Chan L, Falkner B, Goldstein BJ (2008). Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clin Invest* 118: 1645-1656.

Steinberg GR, & Kemp BE (2009). AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev* 89: 1025-1078.

Steinberg GR, Michell BJ, van Denderen BJ, Watt MJ, Carey AL, Fam BC, *et al.* (2006). Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab* 4: 465-474.

Sun W, Lee TS, Zhu M, Gu C, Wang Y, Zhu Y, *et al.* (2006). Statins activate AMP-activated protein kinase in vitro and in vivo. *Circulation* 114: 2655-2662.

Szeto HH, Liu S, Soong Y, Alam N, Prusky GT, & Seshan SV (2016). Protection of mitochondria prevents high-fat diet–induced glomerulopathy and proximal tubular injury. *Kidney International* 90: 997-1011.

Wang S, Zhang M, Liang B, Xu J, Xie Z, Liu C, *et al.* (2010). AMPK α 2 deletion causes aberrant expression and activation of NAD(P)H oxidase and consequent endothelial dysfunction in vivo: role of 26S proteasomes. *Circ Res* 106: 1117-1128.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, & Ferrante AW, Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-1808.

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, *et al.* (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108: 1167-1174.

This article is protected by copyright. All rights reserved

RESULTADOS

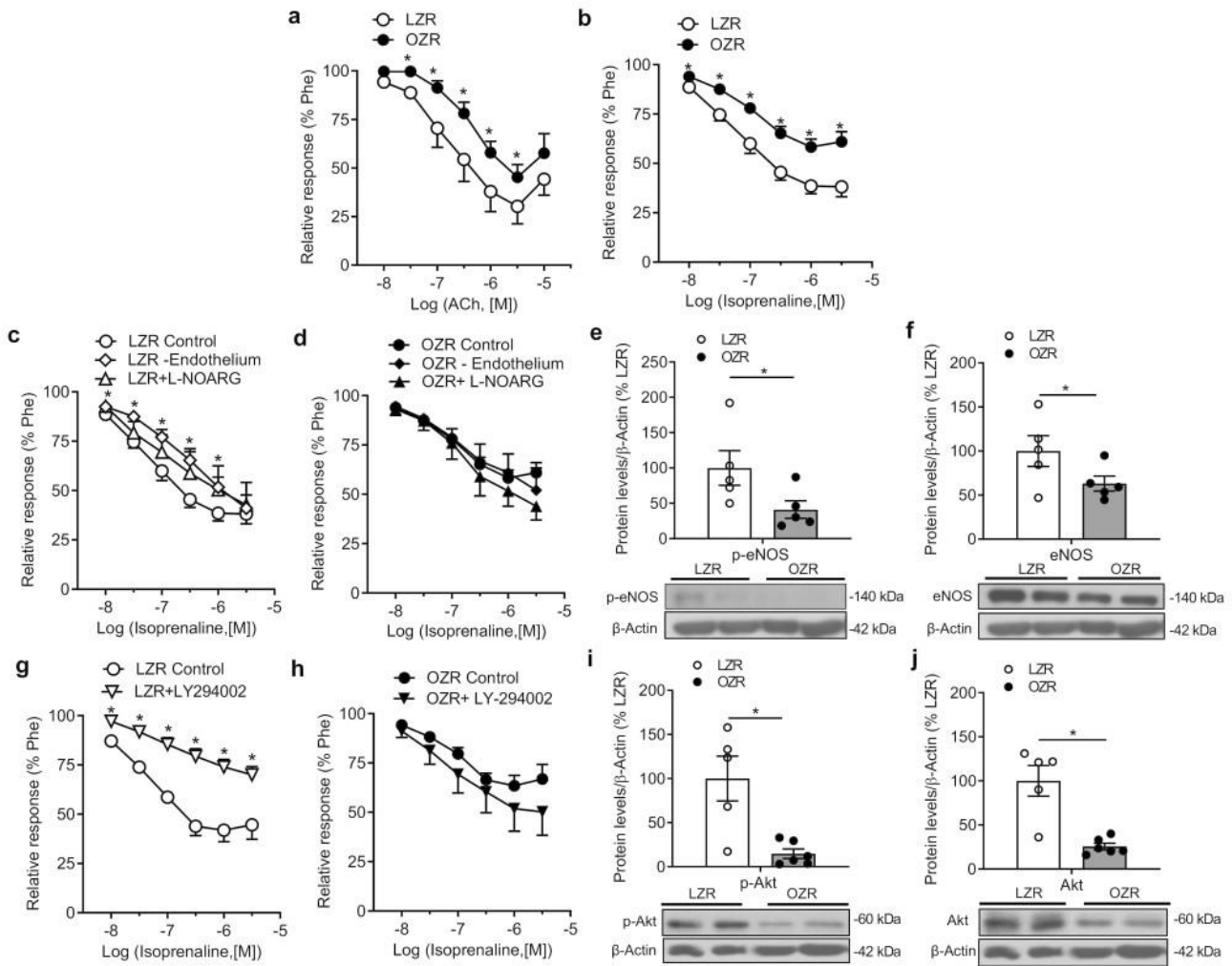


Figure 11 PI3K/Akt/eNOS/NO vasodilator endothelial pathway is impaired in renal preglomerular arteries of OZR along with reduced activity and downregulation of Akt and eNOS

(a-b) Relaxations to ACh **(a)** and isoprenaline **(b)** in renal interlobar arteries from LZR and OZR. **(c,d,g,h)** Vasodilator responses to isoprenaline in renal arteries of LZR and OZR under different experimental conditions: in endothelium-denuded arteries, in the presence of the NOS synthase inhibitor L-NOARG (100 μ M) **(c,d)** and in the presence of inhibitor of PI3K LY-294002 (3 μ M) **(g,h)**. Results are expressed as percentage of the increases in tension induced by phenylephrine (Phe). Data are shown as the mean \pm SEM of 6-10 arteries from $n=5$ LZR and $n=5$ OZR. Significant differences between means were analyzed by Student *t* test for paired observations; * $P < 0.05$ versus LZR or OZR control responses in the absence of inhibitors. **(e,f,i,j)** Western blot analysis for p-eNOS **(e)**, eNOS **(f)**, p-Akt **(i)**, Akt **(j)** in renal arteries from LZR and OZR. Results were normalized to β -actin content in samples. Data represent mean \pm SEM values of $n=5$ LZR and 5 OZR rats **(e,f)** and $n=5$ LZR and 6 OZR rats **(i,j)**. Significant differences between means were analyzed by Student *t* test for unpaired observations * $P < 0.05$ versus LZR.

RESULTADOS

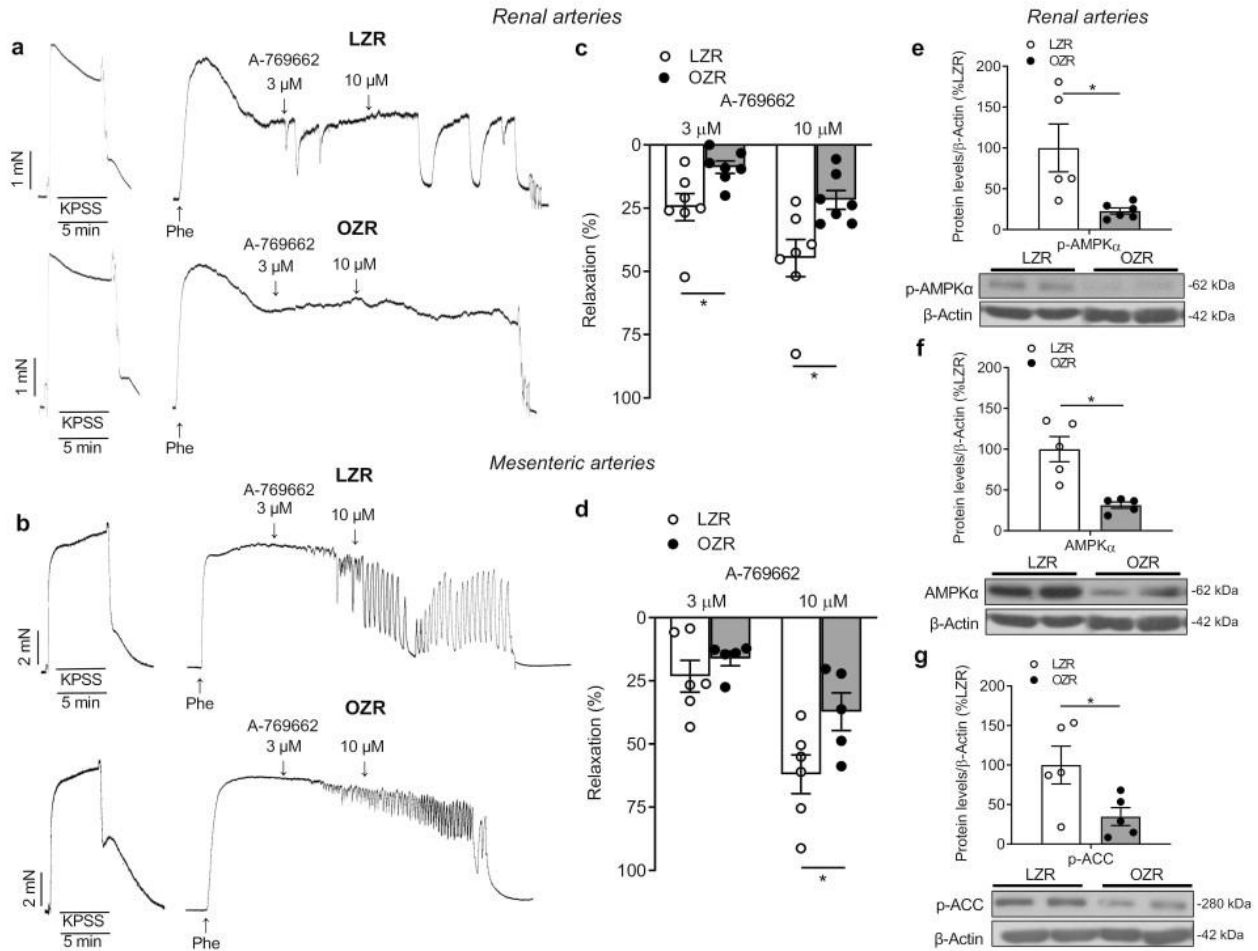


Figure 2I Relaxations induced by the AMPK activator A769662 are reduced in small renal and mesenteric arteries in obesity, which is associated with impaired AMPK activity and expression

(a,b) Original recordings showing A769662-induced relaxations in renal **(a)** and mesenteric **(b)** arteries from LZR and OZR and **(c,d)** average vasodilator effect of A769662 (3 μ M and 10 μ M). Results are expressed as percentage of the increases in tension induced by phenylephrine (Phe). Data are shown as the mean \pm SEM of 5-10 arteries from $n=5$ LZR and $n=5$ OZR. Significant differences between means were analyzed by Student *t* test for paired observations; * $P < 0.05$ versus LZR or OZR control responses. **(e-g)** Western blots analysis for p-AMPK α **(e)**, AMPK α **(f)** y p-ACC **(g)** protein levels in samples of renal arteries from LZR and OZR. Results were quantified by densitometry and presented as a ratio of density of the protein band vs that of β -actin from the sample. Data are shown as the mean \pm SEM of $n=5$ LZR and $n=6$ OZR **(e)**, $n=5$ LZR and $n=5$ OZR **(f,g)**; Significant differences between means were analyzed by Student *t* test for unpaired observations * $P < 0.05$ versus LZR.

RESULTADOS

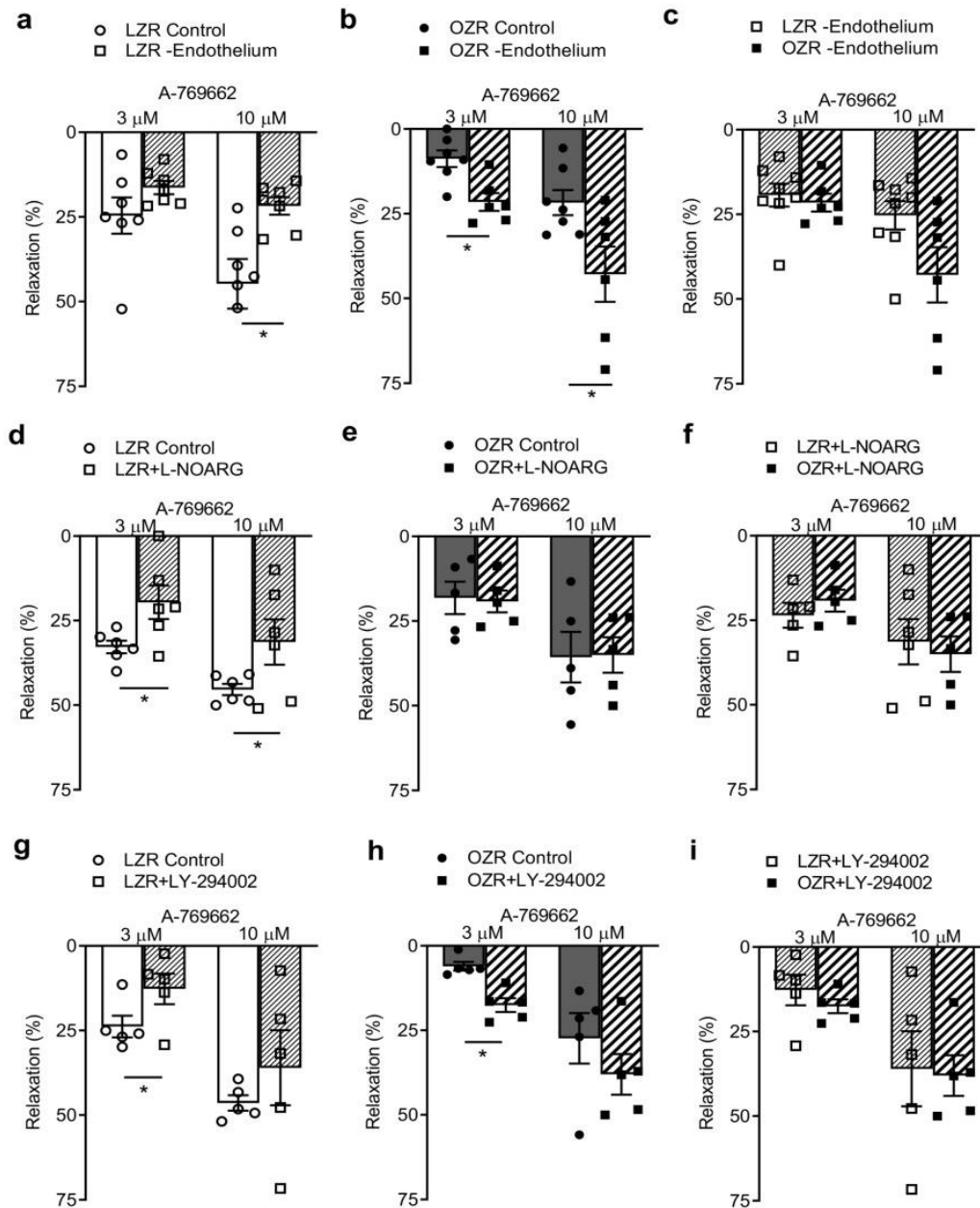


Figure 3I Renal endothelial AMPK-PI3K-eNOS pathway is impaired in obesity

(a-b) Average vasodilator effect of 3 μ M and 10 μ M of A769662 in endothelium-intact and endothelium-denuded renal arteries from LZR (a) and OZR (b). Effect of the NOS synthase inhibitor L-NOARG (100 μ M) and PI3K inhibitor (LY-294002, 3 μ M) on A769662-induced vasodilation in renal arteries from LZR (d,g) and OZR (e,h) before and after treatment with inhibitors. Comparison of vasodilator response to A769662 after removal of endothelium or treatment with both inhibitors in LZR and OZR (c,f,i). Results are expressed as percentage of the increases in tension induced by phenylephrine (Phe). Data are shown as the mean \pm SEM of 5-7 arteries from n= 6 LZR and n=6 OZR. Significant differences between means were analyzed by Student *t* test for paired observations; **P* < 0.05 versus LZR or OZR control responses in the absence of inhibitors.

RESULTADOS

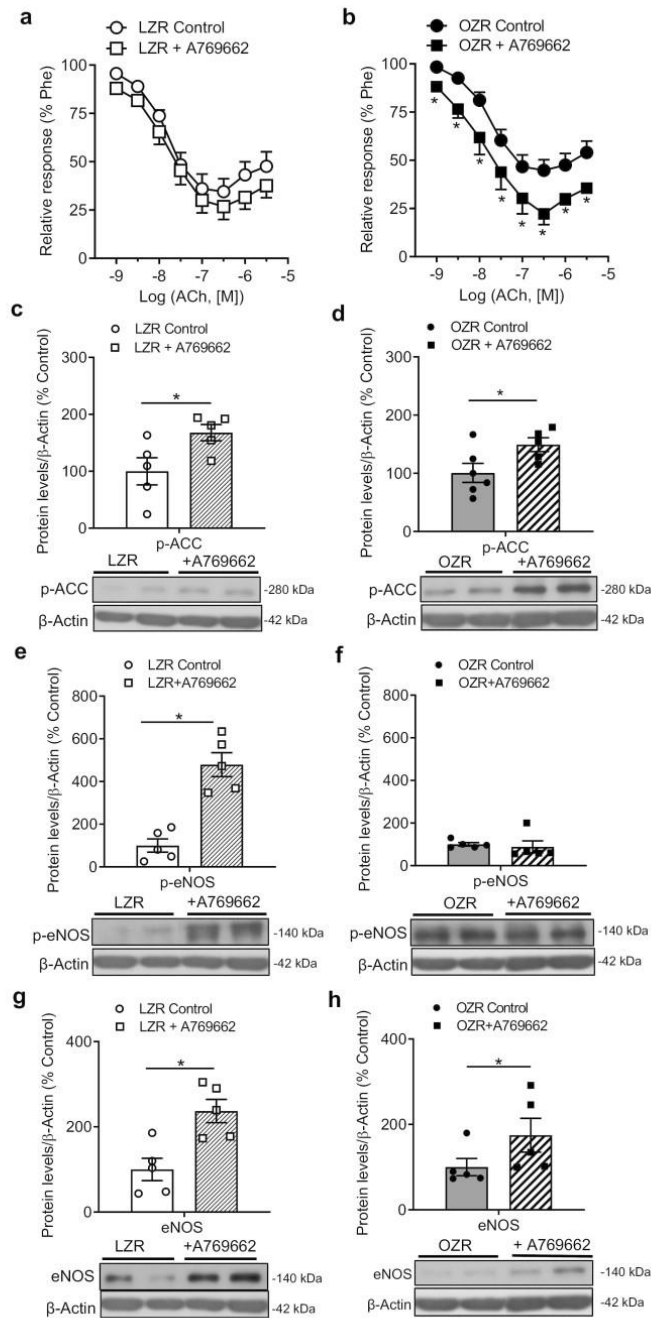


Figure 4I *Ex vivo* acute treatment with A769662 ameliorates endothelial dysfunction and increases eNOS protein levels in OZR preglomerular arteries

(a-b) *In vitro* effect of the AMPK activator A769662 on the relaxations to ACh of LZR **(a)** and OZR **(b)** renal interlobar arteries. Results are expressed as percentage of the precontraction induced by phenylephrine (Phe). Data are shown as the mean \pm SEM of 6-10 arteries from $n=5$ LZR and $n=5$ OZR. Significant differences between means were analyzed by Student *t* test for paired observations. * $P < 0.05$ vs LZR or OZR without treatment with A769662. **(c-h)** Western blot analysis for p-ACC, p-eNOS and eNOS protein levels in samples of renal arteries from LZR **(c,e,g)** and OZR **(d,f,h)** with or without ex vivo treatment with A769662 (10 μ M). Results were normalized to β -actin content in samples. Data represent mean \pm SEM values of $n=5$ LZR and $n=5-6$ OZR. Significant differences between means were analyzed by Student *t* test for unpaired observations * $P < 0.05$ versus LZR or OZR without incubation with A769662.

RESULTADOS

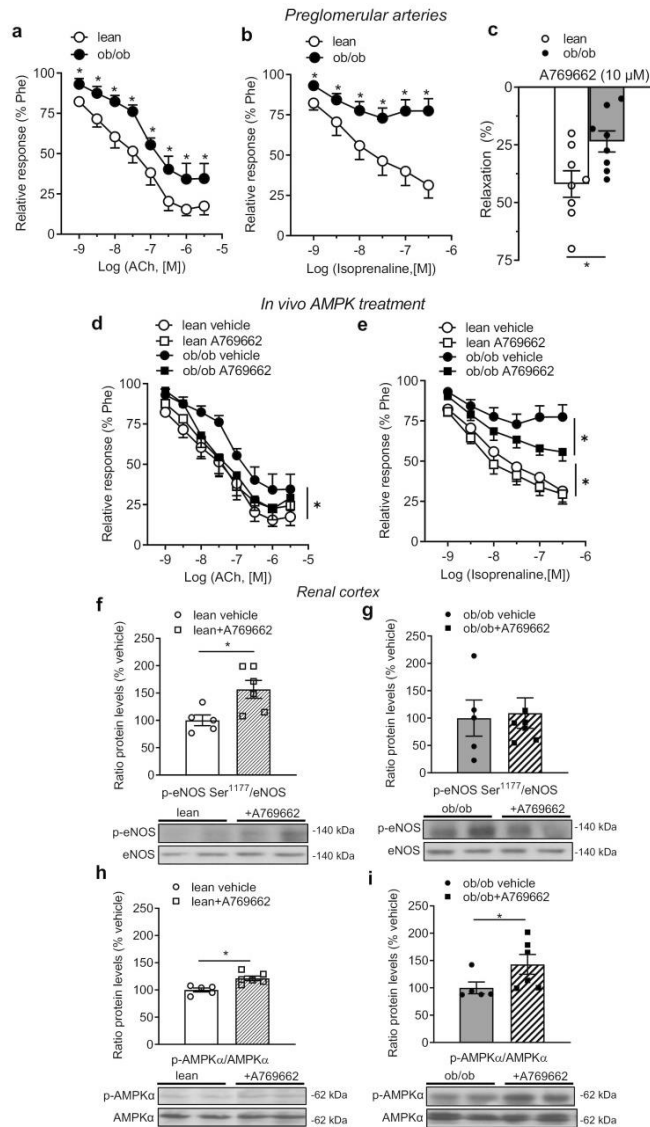


Figure 5I *In vivo* AMPK activation with A769662 improves relaxations to ACh and isoprenaline in preglomerular arteries of *ob/ob* mice

Relaxations to ACh (**a**), isoprenaline (**b**) and A769662 (10 μM) (**c**) in renal interlobar arteries from lean and *ob/ob* mice. Results are expressed as percentage of the precontraction induced by phenylephrine (Phe). (**d-e**) Comparison of the relaxations to isoprenaline and ACh in preglomerular arteries of lean (**d**) and *ob/ob* mice (**e**) treated with vehicle *versus* mice treated with A769662. *In vivo* treatment with the AMPK activator restored the loss of endothelium-dependent vasodilation of obese mice since isoprenaline-induced relaxations (**e**) and vasodilation to ACh (**d**) were larger when compared to relaxations of *ob/ob* mice treated with vehicle. Data are shown as the mean ± SEM of 7-10 arteries of n=5 lean mice and n=7 *ob/ob* mice. Significant differences were analyzed by Student *t* test for unpaired (**a-c**) or by one-way ANOVA followed by Bonferroni as *a posteriori* test (**d,e**); *P< 0.05 *versus* lean mice (**a,b,c**) or vehicle-treated lean or *ob/ob* mice (**d,e**). (**f-i**) Western blot analysis for ratio p-eNOS/ eNOS in samples of renal cortex from lean (**f**) *ob/ob* mice (**g**) with or without A769662 treatment, as well as p-AMPKα/ AMPKα ratio in lean (**h**) *ob/ob* mice (**i**). Results are expressed as percentage vehicle-treated lean or *ob/ob* mice. Data represent mean ± SEM values of n=5 and n=6 (**f,h,i**), n= 5 and n=6 (**g**) vehicle-treated and A769662-treated mice, respectively. Significant differences were analyzed by Student *t* test for unpaired observations. *P< 0.05 *versus* vehicle-treated lean or *ob/ob* mice. Outliers were included in analysis (**g**).

RESULTADOS

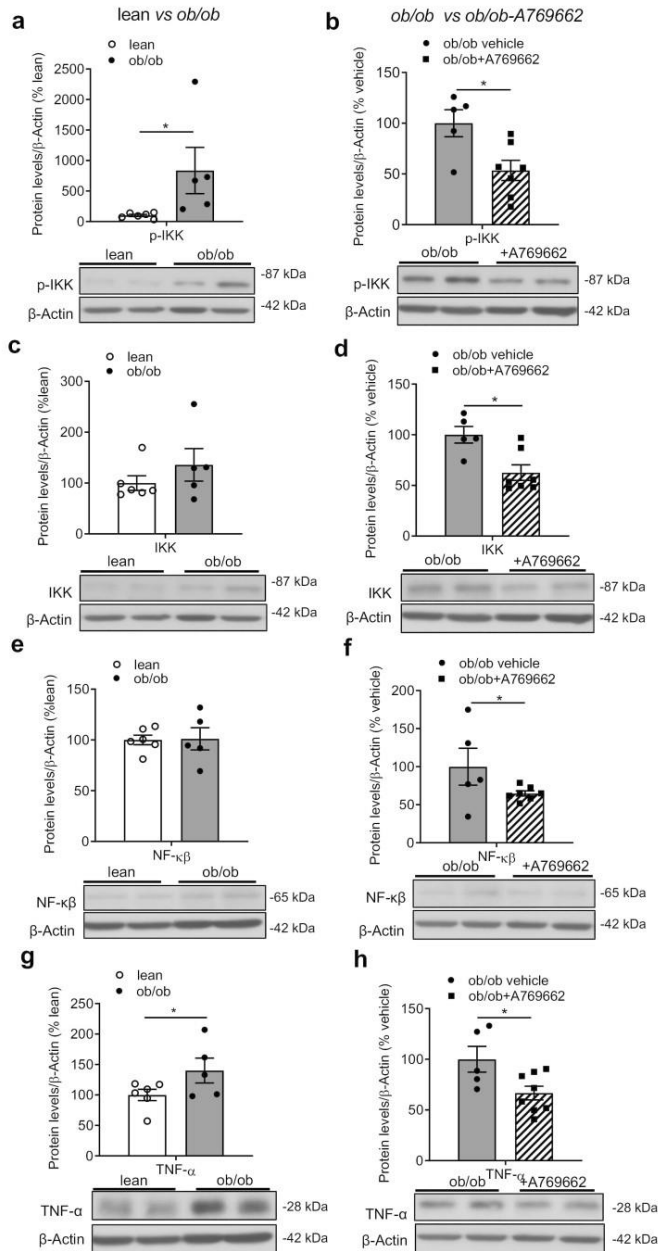


Figure 6I *In vivo* treatment with A769662 reduces inflammatory markers in the kidney of *ob/ob* mice

Western blot analysis for p-IKK (a), IKK (c), NF- κ B (e) and TNF- α (g) protein levels in samples of renal cortex from lean and *ob/ob* mice treated with vehicle. Results were normalized to β -actin content in samples and are expressed as percentage of lean mice. Data represent mean \pm SEM values of n=6 lean and n=5 of *ob/ob* mice (a,c,e,g). Significant differences between means were analyzed by Student *t* test for unpaired observations; *P < 0.05 vs vehicle-treated lean mice. Western blot analysis for p-IKK (b), IKK (d), NF- κ B (f) and TNF- α (h) protein levels in samples of renal cortex from vehicle-treated *ob/ob* mice and A769662-treated *ob/ob* mice. Results were normalized to β -actin content in samples and are expressed as percentage of vehicle-treated *ob/ob* mice. Significant differences between means were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni as *a posteriori* test; Data represent mean \pm SEM values of n=5 and n=7 (b,d,f), and n=5 and n=8 (h) vehicle-treated *ob/ob* mice and A769662-treated *ob/ob* mice, respectively. *P < 0.05 vs vehicle-treated *ob/ob* mice. Outliers were included in analysis

RESULTADOS

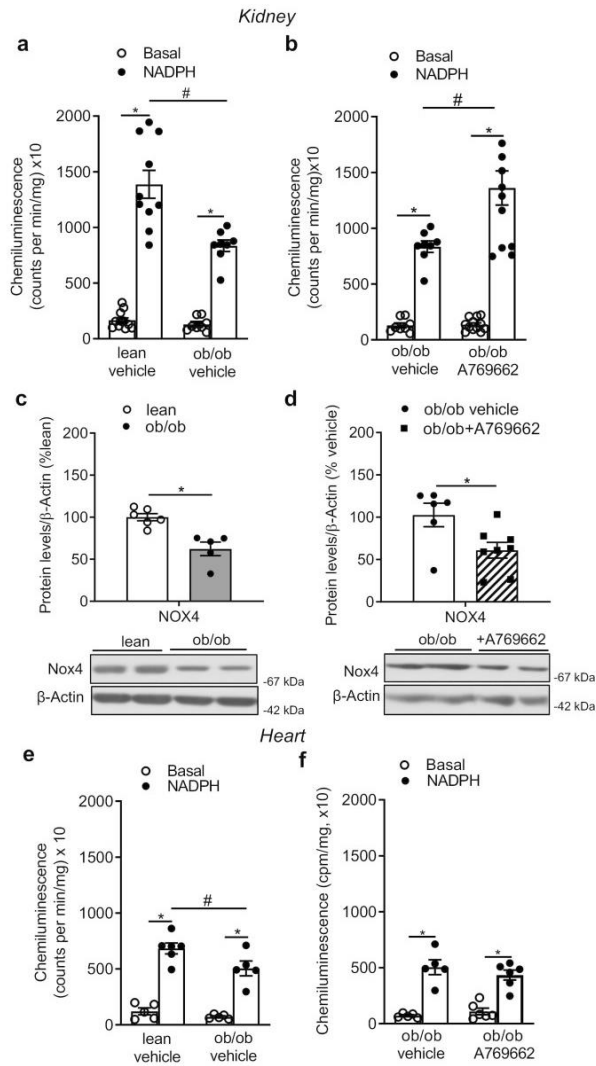


Figure 7I *In vivo* activation of AMPK restores ROS levels in renal cortex of *ob/ob* mice

(a) Basal and NADPH-stimulated $O_2^{\cdot-}$ levels measured by lucigenin-enhanced chemiluminescence in renal cortex samples of vehicle-treated lean and *ob/ob* mice. (b) Comparison between $O_2^{\cdot-}$ levels in renal cortex samples from *ob/ob* mice treated with vehicle or after *in vivo* administration of A769662. Results are expressed in counts per minute (cpm) per mg of tissue. Bars represent mean \pm SEM of $n=5$ lean and $n=5$ *ob/ob* mice (1-2 cortex samples per animal). Significant differences were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni as a *posteriori* test * $P < 0.05$ versus basal levels; # $P < 0.05$ versus vehicle-treated *ob/ob* mice. (c,d) Western blots analysis for Nox4 protein levels in renal cortex from lean versus *ob/ob* mice (c) and downregulation upon chronic *in vivo* treatment with the AMPK activator A769662 in *ob/ob* (d). Results were quantified by densitometry and presented as a ratio of density of the Nox4 band vs that of β -actin from the sample. Data are shown as the mean \pm SEM of $n=6$ and $n=5$ lean and *ob/ob* mice, respectively (c), and of $n=6$ and $n=8$ vehicle-treated and A769662-treated *ob/ob* mice, respectively (d). Statistical significance was calculated by unpaired Student's *t*-test * $P < 0.05$ versus lean (c) and *ob/ob* treated with vehicle (d). (e) Basal and NADPH-stimulated $O_2^{\cdot-}$ levels in myocardium samples of lean and *ob/ob* mice treated with vehicle. (f) Effect of *in vivo* treatment with A769662 on NADPH-stimulated $O_2^{\cdot-}$ levels in myocardium samples from *ob/ob* measured by lucigenin-enhanced chemiluminescence. Results are expressed in counts per minute (cpm) per mg of tissue. Bars represent mean \pm SEM of 1-2 samples of $n=5$ lean and $n=5$ *ob/ob* mice, respectively (e) and $n=5$ vehicle-treated and $n=5$ A769662-treated *ob/ob* mice (f). Significant differences were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni as a *posteriori* test * $P < 0.05$ versus basal levels; # $P < 0.05$ versus vehicle-treated lean

RESULTADOS

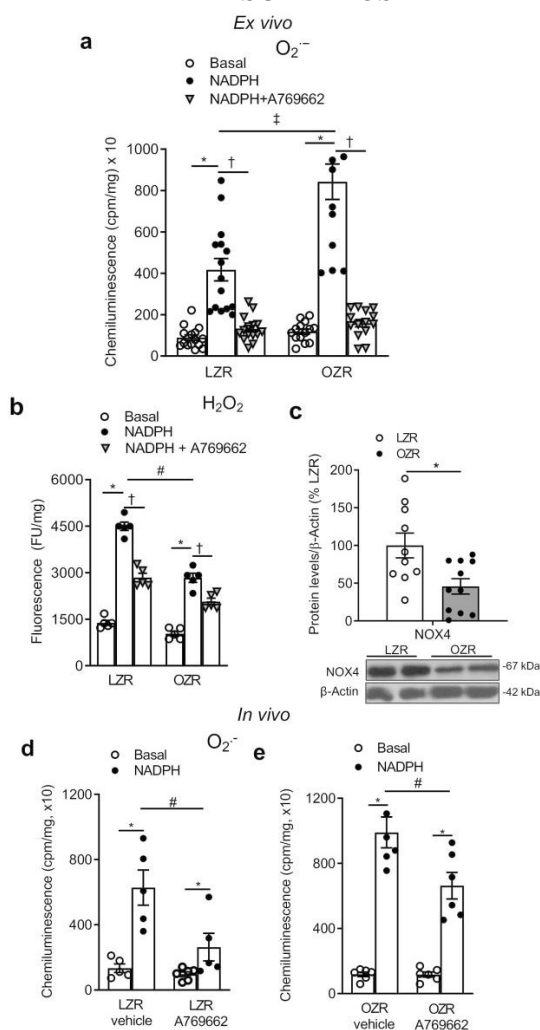


Figure 8 Both acute *in vitro* and *in vivo* AMPK activation reduce Nox-derived ROS generation in preglomerular arteries of lean and obese Zucker rats.

Inhibitory *in vitro* effect of A769662 (30 μ M) on NADPH-stimulated $O_2^{\cdot -}$ (**a**) and H_2O_2 (**b**) levels in renal interlobar arteries of LZR and OZR measured by lucigenin-enhanced chemiluminescence and Amplex Red fluorescence, respectively. Results are expressed in counts per minute (cpm) per mg of tissue for chemiluminescence and in relative fluorescence units (RFU) per mg of tissue for fluorescence. Bars represent mean \pm SEM of 1-2 arteries from n=7 LZR and n=6 OZR (**a**), n=5 LZR and n=5 OZR (**b**). Significant differences were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni as a *posteriori* test *P<0.05 versus basal levels, †P<0.05 versus NADPH-stimulated; #P< 0.05 versus LZR. (**c**) Western blots analysis for Nox4 protein levels in renal arteries from LZR versus OZR. Results were quantified by densitometry and presented as a ratio of density of the Nox4 band vs that of β -actin from the sample. Data are shown as the mean \pm SEM of n=10 LZR and n=11 OZR, respectively. Statistical significance was calculated by unpaired Student's t-test *P<0.05 versus LZR. (**d,e**) Comparison between $O_2^{\cdot -}$ levels measured by lucigenin-enhanced chemiluminescence in basal and NADPH-stimulated isolated renal interlobar arteries from LZR (**d**) and OZR (**e**) after *in vivo* treatment with A769662. Results are expressed in counts per minute (cpm) per mg of tissue. Bars represent mean \pm SEM of n=5 vehicle-treated and n= 5 A76962-treated LZR (**d**) and n=5 vehicle-treated and n= 5 A76962-treated OZR (**e**). Significant differences were analyzed by using one-way ANOVA followed by Bonferroni as a *posteriori* test *P<0.05 versus basal levels and #P< 0.05 versus LZR (**d**) or OZR (**e**) treated with vehicle.

RESULTADOS

Table 1 Metabolic parameters of LZR and OZR

	LZR	n	OZR	n
Body weight (g)	399 ± 5	33	482 ± 6*	35
Kidney weight (g)	2.26 ± 0.07	8	2.55 ± 0.16*	8
[Glucose] (mg/dl)	114 ± 11	16	187 ± 22*	19
[Insulin] (ng/dl)	1.3 ± 0.17	7	3.8 ± 0.34*	8
[Cholesterol] (mg/dl)	92 ± 3	16	189 ± 10*	18
[Tryglicerides] (mg/dl)	94 ± 10	16	320 ± 26*	18

LZR, lean Zucker rats; OZR obese Zucker rats. Data are means ± SEM of the number n of animals. Significant differences were analyzed by an unpaired Student t-test. *P <0.05 vs LZR.

RESULTADOS

Table 2 Metabolic parameters of lean and ob/ob vehicle or A769662- treated mice

	<i>lean vehicle</i>	<i>lean-A769662</i>	<i>ob/ob vehicle</i>	<i>ob/ob-A769662</i>
Body weight (g)	25.6 ± 0.8	27.10 ± 0.5	39 ± 2.9*	37.6 ± 3.1
Daily food intake (g)	2.2 ± 0.13	2.2 ± 0.15	2.9 ± 0.5*	1.1 ± 0.3 [#]
Kidney weight (g)	0.26 ± 0,01	0.24 ± 0.01	0.29 ± 0,01*	0.26 ± 0,03
[Glucose] (mg/dl)	126.6 ± 7.3	133.6 ± 10.5	327.8 ± 64.2*	198.8 ± 11.5 [#]
[Lactate] (mmol/l)	4.08 ± 0.24	4.23 ± 0,72	5.36 ± 0.32*	2.88 ± 0.29 [#]

Data are means ± SEM of n=5-7 animals in each group. Significant differences were analyzed by ANOVA followed by Bonferroni posterior. *P < 0.05 vs lean vehicle mice # P < 0.05 vs ob/ob vehicle mice

RESULTADOS

Table 3 Relaxant effects of isoprenaline in renal interlobar arteries from LZR and OZR before and after mechanical endothelium removal or inhibition of eNOS or PI3K blockade

	LZR					OZR				
	pEC ₅₀	E _{max}	n	I ₁	KPSS	pEC ₅₀	E _{max}	n	I ₁	KPSS
Isoprenaline	6.40 ± 0.14	61.4 ± 3.9	15	311 ± 15	1.55 ± 0.25	5.28 ± 0.33*	41.7 ± 4*	12	321 ± 18	0.70 ± 0.15
- Endothelium	5.89 ± 0.03#	48.3 ± 5.1#	8	293 ± 35	0.77 ± 0.21	5.51 ± 0.11*	39.1 ± 9.5	6	283 ± 18	0.43 ± 0.10
+ L-NOARG	5.96 ± 0.1#	49.6 ± 12.1	7	330 ± 20	1.5 ± 0.5	5.89 ± 0.1	48.3 ± 7.7	6	295 ± 44	0.67 ± 0.16
Isoprenaline	6.30 ± 0.22	58.1 ± 5.9	6	315 ± 31	1.38 ± 0.42	4.88 ± 0.47*	36.5 ± 5*	6	330 ± 34	0.95 ± 0.3
+LY294002	4.53 ± 0.25#	26.1 ± 3.9#	6	394 ± 45	2.10 ± 0.51	5.76 ± 0.16	48.1 ± 11	6	344 ± 35	1.42 ± 0.4

Values represent mean ± S.E.M. of the number n of individual arteries of 5 LZR and 5 OZR (1–2 per animal). pEC₅₀ is -logEC₅₀, EC₅₀ being the agonist concentration giving half-maximal relaxation; E_{max}=maximal relaxation (% Phe); I₁= internal diameter (µm); KPSS (Nm⁻¹). Significant differences were analyzed by unpaired Student t-test. *P < 0.05 vs LZR; #P < 0.05 vs control before treatment

RESULTADOS

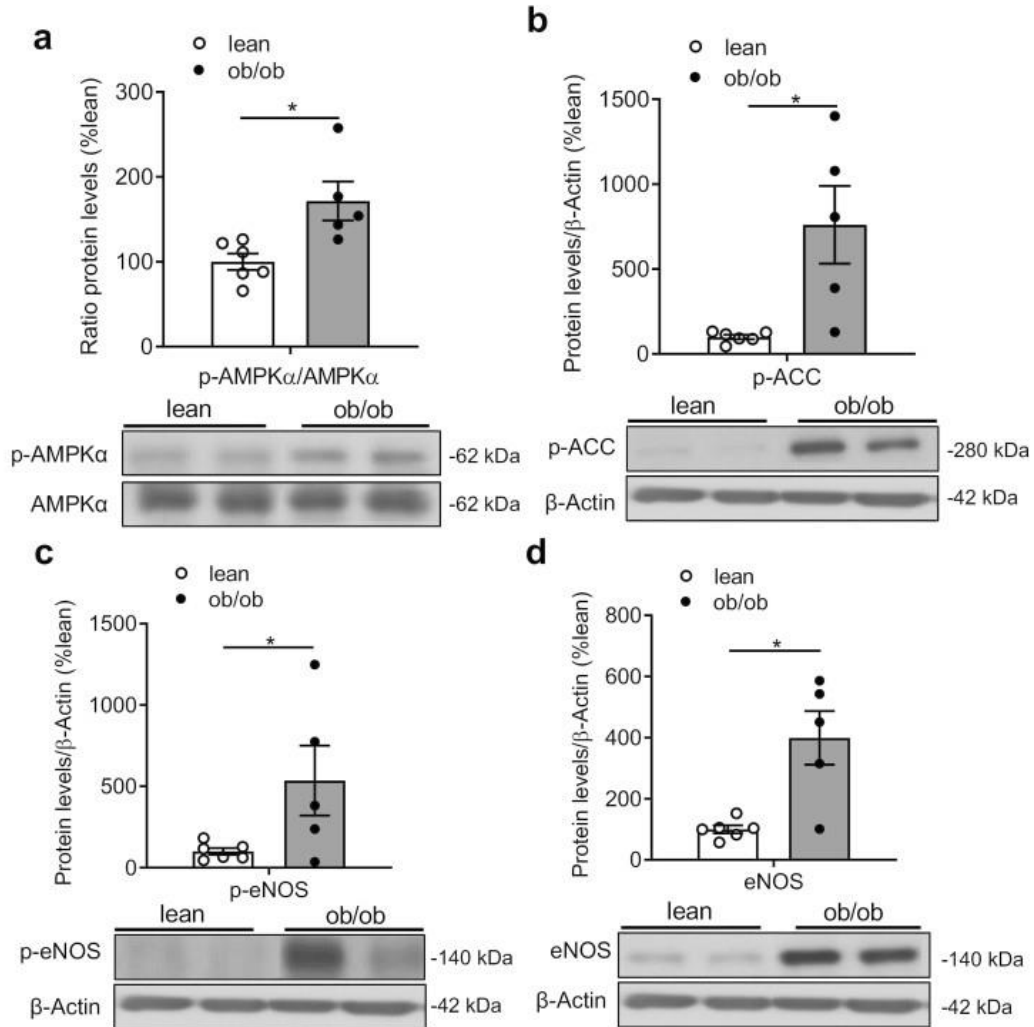
Table 4 Relaxant effects of ACh and isoprenaline in renal interlobar arteries from lean and ob/ob mice vs A769662-treated mice

lean vehicle						lean-A769662				
	pEC ₅₀	E _{max}	n	l ₁	KPSS	pEC ₅₀	E _{max}	n	l ₁	KPSS
ACh	7.54 ± 0.07	84.6 ± 3.9	7	236 ± 18	0.67 ± 0,17	7.34 ± 0.09	77.3 ± 6.5	10	252 ± 27	0.65 ± 0,15
Isoprenaline	7.54 ± 0.08	68.6 ± 8.0	7	249 ± 22	0.67 ± 0,17	7.79 ± 0.11	70.5 ± 4.9	8	259 ± 29	0.65 ± 0,15
ob/ob vehicle						ob/ob-A769662				
	pEC ₅₀	E _{max}	n	l ₁	KPSS	pEC ₅₀	E _{max}	n	l ₁	KPSS
ACh	6.60 ± 0.1 [#]	65.8 ± 9.7 [#]	7	292 ± 36	0.5 ± 0,19	7.15 ± 0,1*	77.6 ± 6.7	7	234 ± 25	0.58 ± 0,14
Isoprenaline	—	22.6 ± 6.9 [#]	7	281 ± 31	0.5 ± 0,19	6.4 ± 0,25	44.3 ± 5.6*	8	234 ± 25	0.58 ± 0,14

Values represent mean ± S.E.M. of 7-10 individual arteries of 5 lean and 5 ob/ob mice (1–2 per animal). pEC₅₀ is $-\log EC_{50}$, EC₅₀ being the agonist concentration giving half-maximal relaxation; E_{max}=maximal relaxation (% Phe); l₁= internal diameter (μm); KPSS (Nm⁻¹). Significant differences were analyzed by unpaired Student t-test. *P < 0.05 vs ob/ob vehicle mice; #P < 0.05 vs lean vehicle mice

RESULTADOS

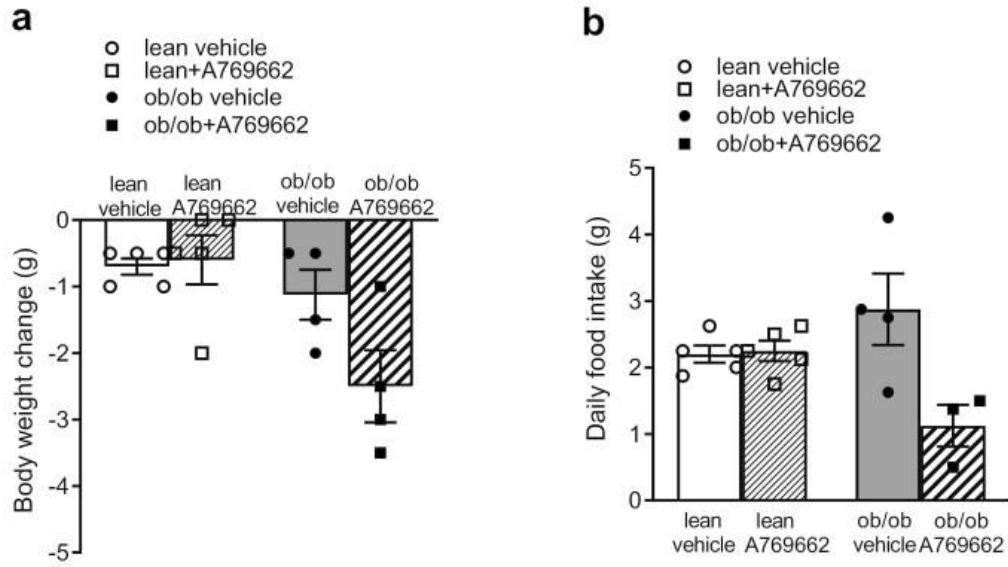
Renal cortex



Supplementary Figure 1I Up-regulation of AMPK activity and the endothelial eNOS/NO pathway in renal cortex from *ob/ob* mice

Western blots analysis for p-AMPK α /AMPK α (**a**), p-ACC (**b**), p-eNOS (**c**) and eNOS (**d**) protein levels in samples of renal cortex from lean and *ob/ob* mice. Results were normalized to β -actin content in samples. Data are shown as the mean \pm SEM of n=6 and n=5 lean and *ob/ob* mice, respectively. Significant differences between means were analyzed by Student *t* test for unpaired observations; *P < 0.05 versus lean control mice.

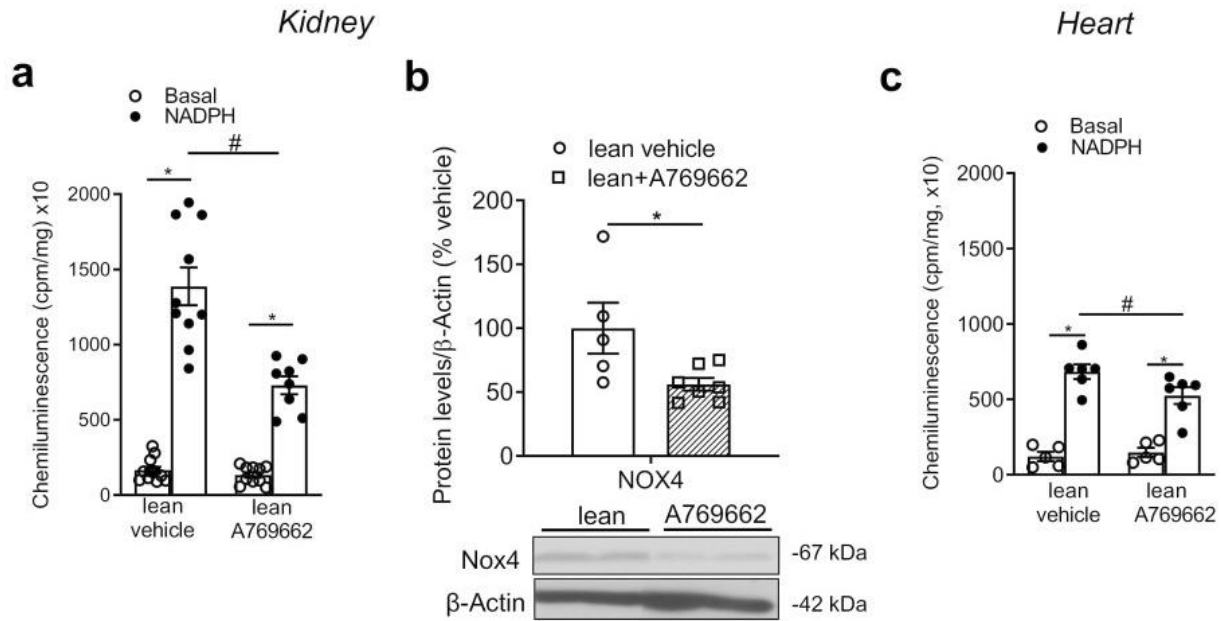
RESULTADOS



Supplementary Figure 2I Effect of *in vivo* treatment with AMPK on body weight and daily food intake in *ob/ob* mice

Effect of administration of A769662 on body weight change (**a**) and average daily food intake (**b**) in lean and *ob/ob* mice. Data are means \pm SEM of $n=5$ lean and $n=4$ *ob/ob* mice.

RESULTADOS

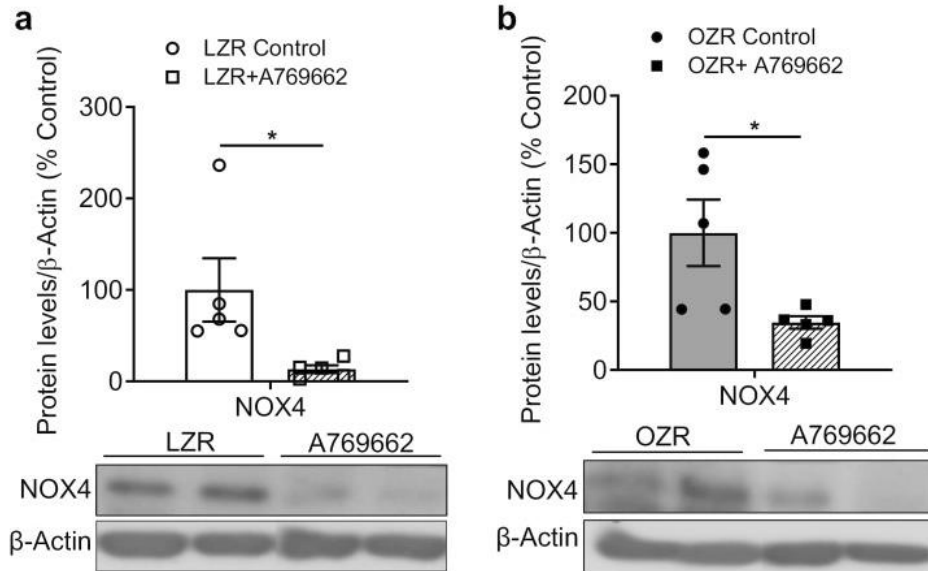


Supplementary Figure 3I *In vivo* activation of AMPK reduces ROS levels in renal cortex and myocardium of lean mice

(a) Comparison between $O_2^{\cdot -}$ levels in renal cortex samples from lean mice treated with vehicle or after *in vivo* administration of A769662. Results are expressed in counts per minute (cpm) per mg of tissue. Bars represent mean \pm SEM of 1-2 samples of n=5 vehicle-treated and n=5 A769662-treated lean mice. Significant differences were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni as a *posteriori* test *P < 0.05 versus basal levels; #P < 0.05 versus lean treated with vehicle. **(b)** Western blots analysis for Nox4 protein levels in renal cortex from lean after chronic *in vivo* treatment with the AMPK activator A769662. Results were quantified by densitometry and presented as a ratio of density of the Nox4 band vs that of β -actin from the sample. Data are shown as the mean \pm SEM of n=5 vehicle-treated and n=7 A769662-treated lean mice. Statistical significance was calculated by unpaired Student's t-test *P < 0.05 versus lean treated with vehicle. **(c)** Effect of *in vivo* treatment with A769662 on NADPH-stimulated $O_2^{\cdot -}$ levels in myocardium samples from lean measured by lucigenin-enhanced chemiluminescence. Results are expressed in counts per minute (cpm) per mg of tissue. Bars represent mean \pm SEM of 1-2 samples of n=5 animals per group. Significant differences were analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni as a *posteriori* test *P < 0.05 versus basal levels; # P < 0.05 versus lean treated with vehicle.

RESULTADOS

Renal arteries



Supplementary Figure 4I *In vitro* treatment with AMPK downregulates Nox4 in renal arteries from LZR and OZR.

Western blots analysis for Nox4 protein levels in renal arteries before and after acute *in vitro* treatment with the AMPK activator A769662 (30 μ M) in LZR (**a**) and OZR (**b**). Results were quantified by densitometry and presented as a ratio of density of the Nox4 band vs that of β -actin from the sample. Data are shown as the mean \pm SEM of n=5 vehicle-treated and n=5 A769662-treated LZR (**a**) and n=5 vehicle-treated and n=5 A769662-treated OZR (**b**). Statistical significance was calculated by unpaired Student's t-test *P<0.05 versus LZR treated with vehicle (**a**) or OZR treated with vehicle (**b**). Outliers were included in analysis.



5. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha evaluado el papel de la AMPK sobre la función vascular renal en condiciones fisiológicas y en modelos experimentales de obesidad genética, así como el papel de un activador de la AMPK sobre la disfunción vascular, el estrés oxidativo y la inflamación en animales obesos. Los datos obtenidos muestran por primera vez que la activación de la AMPK en el riñón produce una potente vasodilatación renal y una disminución de la producción de ROS, además se muestran los mecanismos implicados en estos procesos tanto en ratas Wistar controles como en arterias humanas. Por otra parte, se muestra que la actividad de la AMPK está alterada en la obesidad, lo que se asocia con disfunción endotelial, estrés oxidativo e inflamación de los tejidos vasculares renales de animales obesos, procesos patológicos que se revierten tras el tratamiento con un activador selectivo de la AMPK.

5.1 PAPEL DE LA AMPK EN LA FUNCIÓN VASCULAR RENAL

Estudios anteriores han demostrado que la AMPK desempeña un papel en la fisiología renal al regular la actividad de varios transportadores de células tubulares y mecanismos de supervivencia de células renales tras activarse por isquemia aguda (Decleves, Zolkipli, et al., 2014; Hallows KR, 2010; Sharma et al., 2008; Z. Xie et al., 2008). Además, la activación de la AMPK ejerce acciones protectoras frente a la nefropatía asociada a la enfermedad metabólica, donde la actividad de la AMPK se encuentra reducida (Decleves et al., 2011) En el presente estudio, se demuestra que la AMPK podría estar implicada en la regulación metabólica del flujo sanguíneo renal, ya que la activación de la AMPK produce vasodilatación de arterias renales a través de mecanismos dependientes tanto del endotelio como del MLV; además, nuestros datos muestran que la AMPK también regula la producción de ROS derivada de Nox. Por primera vez se identifican los mecanismos específicos por los cuales se produce la vasodilatación renal mediada por la AMPK, como son la activación de canales IK_{Ca} endoteliales y canales K_{ATP} del MLV.

5.1.1 Papel de la AMPK en la vasodilatación renal

La activación farmacológica de la AMPK con el derivado de la tienopiridina, A769662, indujo potentes relajaciones en las arterias renales de ratas Wistar. Cabe

DISCUSIÓN

destacar que este efecto vasodilatador se reproduce en arterias intrarenales humanas. El A769662 también produjo la relajación en arterias de resistencia mesentéricas, pero no así en arterias coronarias de las mismas ratas, lo que sugiere que la acción vasodilatadora del A769662 es específica del tejido vascular renal. La vasodilatación renal inducida por el A769662 fue 3 órdenes de magnitud más potente que la que se produce por el AICAR, otro activador de la AMPK (Bradley et al., 2010; Ford et al., 2012; Goirand et al., 2007) La mayor potencia como vasodilatador del A769662 frente al AICAR en las arterias intrarrenales confirmaría su alta especificidad hacia la AMPK y estaría de acuerdo con los estudios recientes realizados en otras arterias de resistencia como las arterias musculares y mesentéricas (Schneider et al., 2015)

La relajación producida por el A769662 se asoció con la fosforilación de la AMPK y de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) en arterias interlobares renales. El A769662 se une selectivamente a la subunidad AMPK β_1 y aumenta alostéricamente la actividad de la subunidad catalítica α_1 , sin embargo, este compuesto también puede activar a la AMPK al inhibir su defosforilación en el residuo Thr¹⁷², de la misma forma que el AMP (Sanders MJ, 2007) En consecuencia, la incubación aguda de las arterias renales aisladas con el A769662, aumentó la fosforilación de la AMPK en el residuo de Thr¹⁷² y también la fosforilación (y por lo tanto la inhibición) del ACC, enzima limitante de la velocidad para la síntesis de ácidos grasos, lo que indica que la acción vasodilatadora de la AMPK se produce junto a la actividad reguladora de la AMPK sobre el metabolismo lipídico y el almacenamiento/movilización de energía en los tejidos vasculares renales.

5.1.2 Mecanismos de las acciones vasculares de la AMPK a nivel endotelial

Las acciones cardiovasculares de la AMPK han sido principalmente atribuidas a la activación de la eNOS en células endoteliales y cardiomiocitos, aunque la AMPK se expresa tanto en el endotelio como en el MLV y su activación puede inducir vasodilatación mediante mecanismos independientes del endotelio (Goirand et al., 2007; Rubin et al., 2005; Schneider et al., 2015). La actividad de la AMPK en células endoteliales está regulada por estímulos que afectan a los niveles celulares de ATP como la hipoxia, así como por el *shear stress*, los agonistas que elevan los niveles de Ca²⁺ y algunas hormonas como la insulina, la leptina y la adiponectina, a través de quinasas *upstream* que actúan por encima en la vía de señalización de activación de la AMPK, como la LKB1 o la CAMKK β (Fisslthaler y Fleming 2009, Ruderman, Carling et al.

DISCUSIÓN

2013)(Fisslthaler & Fleming, 2009; Ruderman et al., 2013). Se ha demostrado que la activación de la AMPK por el AICAR en células endoteliales de arterias de resistencia aumenta la fosforilación de la eNOS en los residuos de Ser¹¹⁷⁷ y Ser⁶³⁵, produciendo un aumento en la producción de NO y vasodilatación (Bradley et al., 2010; Chen et al., 2009; Levine et al., 2007; Li et al., 2004; Morrow et al., 2003). De acuerdo con esto, se observó que las relajaciones inducidas por el A769662 en arterias intrarenales humanas y de ratas Wistar se inhibían parcialmente tanto tras la retirada mecánica de endotelio como cuando se produjo el bloqueo farmacológico de la eNOS, lo que sugiere la participación de la vía eNOS/NO en la vasodilatación renal inducida por la AMPK. Sin embargo, una parte significativa de la respuesta relajante inducida por el A769662 persistió en las arterias sin endotelio indicando que la activación de la AMPK puede relajar directamente el MLV de las arterias renales.

5.1.3 Mecanismos de las acciones vasculares de la AMPK a nivel de MLV

En el MLV se expresan las subunidades AMPK α_1 , β_1 y β_2 , siendo la mayoritaria la β_1 (Goirand et al., 2007; Rubin et al., 2005) La AMPK se activa por estrés metabólico en el MLV y está implicada en la vasodilatación independiente del endotelio de arterias grandes y pequeñas (Goirand et al., 2007; Rubin et al., 2005; Schneider et al., 2015) y también en la regulación de la proliferación e inflamación del MLV (Igata et al., 2005; Salt & Hardie, 2017). Los resultados de este trabajo demuestran que la activación de la AMPK produce la relajación de las arterias renales principalmente mediante la reducción de la $[Ca^{2+}]_i$ del MLV y, en menor medida, mediante mecanismos independientes del Ca^{2+} que disminuyen la sensibilidad al calcio (mecanismos de desensibilización). Estudios recientes indican que los activadores de la AMPK reducen la $[Ca^{2+}]_i$ del MLV de arterias de resistencia a través de la hiperpolarización mediada por los canales BK_{Ca} del MLV (Schneider et al., 2015), sin embargo, los resultados del presente estudio sugieren que la activación de los canales IK_{Ca} en lugar de los BK_{Ca} están implicados en la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ del MLV de las arterias renales. Así, mientras que el inhibidor de los canales BK_{Ca}, iberiotoxina, no tuvo ningún efecto sobre las respuestas vasculares del A769662, el bloqueo farmacológico selectivo de los canales IK_{Ca} con TRAM-34, redujo tanto la relajación de las arterias renales humanas como la disminución del Ca^{2+} intracelular del MLV inducida por el A769662. Las diferencias entre nuestros resultados y los descritos por Schneider et al. (2015) (Schneider et al., 2015) en arterias musculares y mesentéricas,

DISCUSIÓN

apoyan de nuevo la especificidad de la acción del A769662 en cada tejido vascular y es probable que estén relacionadas con las características de la respuesta relajante por hiperpolarización dependiente del endotelio (EDH) de las arterias intrarenales. Esta respuesta EDH se inicia mediante la estimulación de los canales de potasio activados por calcio (K_{Ca}) de intermedia (IK_{Ca}) y pequeña (SK_{Ca}), que producen una hiperpolarización en las células endoteliales renales que se propaga a través de uniones mioendoteliales hacia el MLV subyacente, lo que induce hiperpolarización y vasorelajación, respuesta que es inhibida por el bloqueo de los canales IK_{Ca} con TRAM-34 tanto *in vitro* como *in vivo* (Bussemaker et al., 2003; Muñoz et al., 2017; Rasmussen et al., 2016) El efecto inhibitorio del TRAM-34 en la reducción del $[Ca^{2+}]_i$ en el MLV y la relajación provocada por el A769662 explicaría que el activador de la AMPK estimule los canales endoteliales IK_{Ca} , y por consiguiente se produzca la relajación en el MLV de arterias intrarenales. Estos hallazgos estarían respaldados por estudios recientes que demuestran que la dilatación de tipo EDH en arterias de resistencia se pierde en modelos *knock out* de la subunidad $AMPK\alpha_1$ del endotelio, lo que sugiere que la AMPK media las respuestas de tipo EDH y por lo tanto, participa en la regulación de la presión arterial (Enkhjargal et al., 2014)

Por otro lado, nuestros resultados muestran por primera vez que la AMPK también puede activar los canales K_{ATP} del MLV, contribuyendo así a la relajación arterial renal. La glibenclamida inhibió significativamente tanto la vasodilatación en arterias renales humanas como la disminución del $[Ca^{2+}]_i$ del MLV, inducido por el A769662. Mientras que la AMPK se activa en respuesta al estrés metabólico generalmente asociado con el agotamiento de ATP y el aumento en la relación AMP/ATP (Hardie et al., 2012), los canales K_{ATP} del sarcolema también se estimulan por la disminución de los niveles de ATP intracelulares por lo que estos canales funcionan como sensores metabólicos vinculando el estado metabólico intracelular a la excitabilidad de la membrana (Nichols, 2006). En el riñón, los canales K_{ATP} se expresan funcionalmente en arterias renales y arteriolas y los activadores de los canales K_{ATP} producen la vasodilatación de arterias aferentes *in vitro* y aumentan el flujo sanguíneo renal *in vivo* (Kawata et al., 1998; Lorenz et al., 1992; Woods et al., 2003). Los canales K_{ATP} están implicados en la vasodilatación metabólica de las arterias preglomerulares, donde se ha descrito que la privación de glucosa provocó vasodilatación, la cual fue inhibida por la glibenclamida (Lorenz et al.). Por lo tanto, la estimulación de los canales K_{ATP} de las arterias renales por la activación de la AMPK, como se muestra en el presente estudio, podría representar un mecanismo

DISCUSIÓN

para acoplar el flujo sanguíneo renal y el metabolismo. La relación entre los canales K_{ATP} y la activación de la AMPK se ha descrito también en el corazón, en el cual la AMPK estimuló la actividad del canal K_{ATP} en miocitos cardíacos, contribuyendo así a la cardioprotección inducida por el preconditionamiento isquémico (Sukhodub et al., 2007). En el riñón, se ha descrito que tanto los activadores de la AMPK como los activadores de los canales de K_{ATP} proporcionan protección frente a la lesión por isquemia/reperfusión renal, ya que presentan acciones antioxidantes y antipoptóticas (Decleves, Zolkipli, et al., 2014; Grossini et al., 2012; Lempiainen et al., 2012). Los resultados de este trabajo muestran por primera vez que los canales K_{ATP} constituyen un nuevo mecanismo de acción de la AMPK para producir vasodilatación, probablemente estando implicados en la regulación metabólica del flujo sanguíneo renal.

La activación de la SERCA está implicada en la reducción de la $[Ca^{2+}]_i$ del MLV y la relajación, y tanto la regulación redox como, más recientemente, la fosforilación de SERCA2b, la principal isoenzima de SERCA en el MLV, aumentan la actividad de la bomba para introducir Ca^{2+} en el RS y reducir la $[Ca^{2+}]_i$ y relajar el MLV (Chandrasekera et al., 2009; Cohen & Adachi, 2006; Kargacin & Kargacin, 1995; Schneider et al., 2015). En nuestro estudio, el bloqueo farmacológico de la SERCA con el consiguiente vaciamiento del almacén de Ca^{2+} del RS por tratamiento con CPA, inhibió en gran medida tanto la relajación de las arterias renales humanas como la $[Ca^{2+}]_i$ del MLV producida por la activación de la AMPK, lo que sugiere que la bomba SERCA representa otro mecanismo de acción de la AMPK en el MLV renal para producir la vasodilatación inducida por la AMPK en las arterias renales. Esto está de acuerdo con un estudio reciente, que indica que la activación de la AMPK en arterias de resistencia aumentó los niveles de Ca^{2+} del MLV tras la depleción de los depósitos del RS con cafeína, sugiriendo que los depósitos se encontraban más llenos debido a un aumento de la actividad de la SERCA; por otro lado en este mismo estudio la inhibición de la SERCA redujo las relajaciones inducidas por el A769662 (Schneider et al., 2015). Además en este último estudio, la relajación inducida por el A769662 se asoció con un aumento de la fosforilación del fosfolambano en el sitio regulador T17 que estimula la actividad de la SERCA (Schneider et al., 2015). Por lo tanto, los presentes hallazgos en las arterias renales confirman que la estimulación de la SERCA y la reducción del $[Ca^{2+}]_i$ en el MLV es un mecanismo universal para los efectos relajantes de los activadores de la AMPK en arterias pequeñas y arteriolas.

DISCUSIÓN

5.1.4 AMPK y NADPH oxidasas

En el sistema cardiovascular, la actividad de la AMPK puede estar regulada por el estrés oxidativo y la AMPK a su vez es capaz de modular tanto la generación de ROS mitocondrial como la expresión de enzimas antioxidantes en células endoteliales (Colombo & Moncada, 2009; Song & Zou, 2012). Por lo tanto, la activación de la AMPK en el endotelio vascular sería beneficiosa para la enfermedad metabólica no sólo por sus efectos bioenergéticos, sino también por su capacidad para contrarrestar el estrés oxidativo (Colombo & Moncada, 2009). En el presente estudio, demostramos que las subunidades Nox son dianas de la AMPK en tejidos vasculares renales y que la AMPK regula tanto la expresión de Nox como la actividad generadora de ROS. Se ha descrito que la regulación al alza de la Nox4 inducida por altas concentraciones de glucosa en podocitos y por dieta alta en grasas (HFD) en células tubulares renales, se inhibe tras la activación de la AMPK tanto *in vitro* como *in vivo* (Decleves, Zolkipli, et al., 2014; Eid et al., 2010; Sharma et al., 2008). La Nox4, está altamente expresada en el riñón y es una fuente importante de H₂O₂, vasodilatador endotelial y protector de la función vascular en condiciones fisiológicas (Muñoz et al., 2018). De acuerdo con esto, hemos observado que el tratamiento agudo con el activador de la AMPK, A769662 en arterias interlobares renales, indujo una potente inhibición de la producción de ROS derivado de la NADPH, asociado a una disminución en la expresión de la Nox4 y una menor generación de H₂O₂. La Nox4 produce mayormente H₂O₂ en lugar de O₂⁻ y es una fuente importante de ROS en las mitocondrias de la corteza y el endotelio renal (Block et al., 2009; Muñoz et al., 2018). A pesar de que la AMPK regula negativamente el estrés oxidativo dependiente de la Nox4 y la apoptosis en la diabetes y la obesidad (Decleves, Zolkipli, et al., 2014; Eid et al., 2010), los resultados de nuestro estudio sugieren que la AMPK también puede modular la producción de H₂O₂ dependiente de la Nox4 y las acciones vasoactivas en el riñón en condiciones fisiológicas normales.

Por otro lado, se ha descrito que la AMPK puede reducir la actividad y la expresión de otras subunidades de la Nox como la Nox2; los ratones *knockout* de la subunidad AMPK α_1 mostraron un aumento del estrés oxidativo vascular, una regulación al alza de la expresión de la Nox2 y una disfunción endotelial mediada por un aumento en la activación del NF- κ B en células endoteliales, efectos que fueron revertidos por el AICAR (Schuhmacher et al., 2011; Song & Zou, 2012; Wang et al., 2010). Los resultados de nuestra investigación respaldan el papel de la AMPK como regulador fisiológico de la

DISCUSIÓN

actividad de la Nox2 en arterias intrarenales, ya que la incubación con el A769662 no inhibió la producción de ROS derivada de la Nox en condiciones de bloqueo de la Nox2, mientras que sí suprimió significativamente la generación de $O_2^{\cdot-}$ tras el tratamiento con ésteres de forbol, reduciendo la traslocación y la fosforilación de la p47phox e inhibiendo así la activación de la Nox2, como se ha descrito también en miocitos cardíacos y neutrófilos humanos (Alba et al., 2004; Balteau et al., 2014).

5.2 PAPEL DE LA AMPK EN LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL RENAL Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LA OBESIDAD

La obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de ERC independiente de la diabetes, la hipertensión y otras comorbilidades y la alteración de la actividad de la AMPK parece desempeñar un papel clave en la inflamación y la fibrosis subyacente en la nefropatía asociada a la obesidad (Decleves et al., 2011). En este trabajo demostramos por primera vez que la activación de la AMPK no sólo mejora el estado metabólico y reduce la inflamación en el riñón en modelos de obesidad genética sino que también mejora la disfunción endotelial y el estrés oxidativo vascular y restaura el equilibrio redox en la corteza renal en la obesidad.

5.2.1 AMPK y disfunción vascular renal

Se ha descrito que la actividad de la AMPK está alterada en músculo, hígado y riñón en condiciones de estrés metabólico como la obesidad (Ix & Sharma, 2010; Liu et al., 2005; Motawi et al., 2009). En el riñón, la reducción de la actividad de la AMPK se ha asociado con inflamación, hipertrofia glomerular, lesión tubular y albuminuria en ratones obesos con dieta alta en grasas (HFD), mientras que la activación de la AMPK tras el tratamiento con AICAR evitó efectos estructurales y funcionales anormales en animales con HFD (Decleves et al., 2011; Kume et al., 2007; Szeto et al., 2016). Los resultados de este trabajo muestran que la expresión y la actividad de la AMPK estaban reducidas significativamente en arterias renales de ratas genéticamente obesas, junto con una reducción de los efectos relajantes del NO mediados por el activador de la AMPK, A769662, y una disminución de la fosforilación de la ACC, enzima limitante de la velocidad para la síntesis de *ново* de AG que favorece la β -oxidación mitocondrial de AG. Mientras que la disminución de las relajaciones dependientes de endotelio en los

DISCUSIÓN

animales obesos indican disfunción endotelial, la disminución de la actividad de la ACC podría estar involucrada en la lipotoxicidad vascular renal, como se demostró en el endotelio de aortas de ratas OLEFT obesas, donde el aumento de los triglicéridos y la peroxidación lipídica se asoció con la reducción de la actividad de la AMPK, la disminución de la biodisponibilidad del NO y la disfunción endotelial (Lee et al., 2005). Por lo tanto, la disfunción renal relacionada con la disfunción de la AMPK en la obesidad no sólo se debe a la glomerulopatía, la fibrosis o la lesión tubular inducida por lipotoxicidad (Decleves et al., 2011; Decleves, Sharma, et al., 2014; Szeto et al., 2016) sino también a las acciones vasculares deterioradas de la AMPK.

Como se ha comentado anteriormente, la AMPK está implicada en la regulación metabólica del flujo sanguíneo renal y su activación produce la vasodilatación de arterias renales humanas a través de mecanismos tanto dependientes como independientes del endotelio (Rodríguez et al., 2020). Entre los resultados obtenidos en este trabajo, se encontraron que la disminución de los efectos relajantes tras la activación de la AMPK en arterias preglomerulares de ratas obesas, se asoció con disfunción endotelial y una alteración de la vía PI3K/eNOS/NO. Además, las relajaciones inducidas por la ACh y la isoprenalina, agonista endotelial de los receptores β -adrenérgicos, se redujeron significativamente junto con la actividad y la expresión de la eNOS y la Akt en las arterias renales de OZR. Los β -adrenoceptores del endotelio pueden regular la actividad de la eNOS y la vasodilatación mediada por NO, a través de la fosforilación de la eNOS mediante diferentes vías, entre las que se incluyen las vías PKA/Akt y PI3K/Akt (Banquet et al., 2011; Kou & Michel, 2007) ambas vías activadas por la AMPK. En consecuencia, tanto las relajaciones mediadas por la isoprenalina como las mediadas por la AMPK no se vieron afectadas tras la retirada mecánica del endotelio ni tampoco tras el bloqueo de la eNOS o la PI3K, confirmando así la alteración de la vía endotelial PI3K/NOS/NO en arterias preglomerulares renales de ratas obesas. En las relajaciones dependientes del endotelio mediadas por la AMPK en las arterias renales participa el NO pero también la hiperpolarización derivado del endotelio (EDH) mediada por la activación de canales IK_{Ca} (Rodríguez et al., 2020; Rodríguez et al., 2021). Sin embargo, es poco probable que este componente de relajación EDH sea el responsable de la alteración de la vasodilatación mediada por la AMPK, ya que la respuesta EDH está incrementada para compensar la disfunción endotelial en las arterias renales en la obesidad (Muñoz et al., 2019). Por lo tanto, nuestros hallazgos demuestran en primer lugar que la disfunción endotelial se debe a una alteración en la vía PI3K-Akt-eNOS y se

DISCUSIÓN

asocia con la disminución en la vasodilatación inducida por la AMPK en arterias preglomerulares de ratas genéticamente obesas, como también se ha descrito anteriormente en arterias de conductancia como la aorta en modelos de obesidad inducidos por la dieta (Concha F. García-Prieto et al., 2015). Por el contrario, la vasodilatación renal independiente del endotelio mediada por la AMPK, se conservó o incluso aumentó en OZR, como lo demuestran las relajaciones inducidas por el activador AMPK (A769662) en arterias preglomerulares sin endotelio y también en arterias tratadas con inhibidores de la eNOS o la PI3K. La AMPK se expresa tanto en células endoteliales como en células del MLV de arterias renales y puede activar canales K_{ATP} y fosforilar la bomba SERCA del MLV contribuyendo así a la relajación arterial y a la regulación metabólica del flujo sanguíneo renal (Rodríguez et al., 2020; Rodríguez et al., 2021). Las acciones vasodilatadoras de la AMPK a nivel del MLV están preservadas en las arterias de OZR, lo que sugiere un potencial terapéutico para los activadores de la AMPK en las complicaciones vasculares de las enfermedades metabólicas, donde la disfunción del endotelio y la alteración de la vía eNOS/NO reducen la biodisponibilidad del NO.

5.2.2 Efectos beneficiosos de la activación de la AMPK sobre la disfunción vascular renal

Por otro lado, nuestros resultados confirman el papel clave de la AMPK en la función vascular renal y demuestran que la activación de la AMPK mejora la disfunción endotelial renal en las arterias preglomerulares en la obesidad. El tratamiento *ex vivo* agudo con el A769662 en arterias renales, aumentó la fosforilación de la ACC y la actividad y la expresión de la eNOS en LZR, datos que apoyan la participación de la vía PI3K/Akt/NO en la vasodilatación renal mediada por la AMPK (Levine et al., 2007). En arterias preglomerulares de ratas obesas, el A769662 restauró la vasodilatación dependiente del endotelio mediante el aumento de la expresión de la eNOS. La activación de la AMPK también está implicada en las relajaciones mediadas por EDH en arterias de resistencia, ya que está descrito que esta vasodilatación tipo EDH se pierde tras la eliminación específica de la subunidad $AMPK\alpha_1$ endotelial (Enkhjargal et al., 2014). Por lo tanto, la estimulación de los canales IK_{Ca} endoteliales y la respuesta de tipo EDH descrita recientemente en arterias intrarreales (Rodríguez et al., 2020; Rodríguez et al., 2021) también podrían contribuir a la restauración inducida por el A769662 de las relajaciones dependientes del endotelio en arterias intrarrenales de ratas obesas. Los efectos beneficiosos de la activación de la AMPK sobre la disfunción endotelial renal de

DISCUSIÓN

animales obesos se evaluaron además con un ensayo *in vivo* con la administración del A769662 en un modelo *ob/ob* de obesidad genética/síndrome metabólico. Los resultados de este trabajo muestran que existe disfunción endotelial y una alteración en las vías de relajación mediada por los receptores β -adrenérgicos, así como una reducción de la vasodilatación inducida por la AMPK en arterias interlobares preglomerulares de ratones *ob/ob*, como lo representan las relajaciones deterioradas a la ACh, la isoprenalina y el A769662. Curiosamente, se observó que la fosforilación y la expresión de la eNOS estaban aumentadas en las muestras de corteza renal (incluyendo arterias, glomérulos y capilares peritubulares) de los mismos animales, lo que sugiere una regulación compensatoria de la actividad eNOS para proteger la función endotelial glomerular mediada por NO en el riñón de los ratones *ob/ob*. Además, también se encontró que la corteza renal del riñón obeso estaba protegida metabólicamente, como lo demuestra el aumento de la fosforilación de la AMPK y la ACC, indicativos de una mayor actividad basal de la AMPK, que podría reflejar un mecanismo de compensación por el exceso y la acumulación de AG en las células tubulares renales y endoteliales, en un intento de aumentar la incorporación de estos AG a las mitocondrias para su β -oxidación, como ya se ha descrito anteriormente en miocitos de humanos obesos (Green, Macrae, et al., 2011)

En el presente estudio, la activación de la AMPK a través de la administración *in vivo* del A769662 mejoró el estado metabólico y redujo los niveles plasmáticos de glucosa, la ingesta diaria de alimentos y el peso del riñón, pero también evitó la inflamación y en particular mejoró la disfunción vascular renal de los animales obesos. Así, las relajaciones dependientes del endotelio producidas por la ACh de los animales obesos se restablecieron a los niveles de las ratas control y las relajaciones inducidas por la isoprenalina en las arterias interlobares preglomerulares mejoraron tras la administración *in vivo* del A769662 en ratones *ob/ob*, mientras que la actividad basal de la AMPK aumentó mucho más en muestras de corteza renal. Los efectos beneficiosos de la activación de la AMPK en la función vascular renal del riñón obeso son consistentes con las acciones protectoras a nivel cardiovascular de los fármacos utilizados en el tratamiento de trastornos metabólicos que activan a la AMPK como el AICAR, la metformina o las tiazolidinedionas (Ewart & Kennedy, 2011).

5.2.3 Efectos beneficiosos de la activación de la AMPK sobre la inflamación

La lesión renal asociada a la obesidad se ha relacionado con la inflamación renal y el estrés oxidativo, procesos patológicos que son mejorados por la activación de la AMPK en modelos de obesidad inducidos por la dieta (Decleves et al., 2011; Decleves, Sharma, et al., 2014). En la obesidad, el desequilibrio metabólico favorece una inflamación crónica de bajo grado y la acumulación de AG, que aumentan los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias como el TNF α a través de la activación del factor de transcripción NF κ B, afectando a la señalización de insulina en el músculo esquelético, el tejido adiposo y las células endoteliales (Green, Macrae, et al., 2011; McLaughlin et al., 2008; Prieto et al., 2014; Weisberg et al., 2003). El TNF α a su vez ha sido involucrado en la inhibición de la actividad de la AMPK en el músculo esquelético en la obesidad a través del receptor TNF1, suprimiendo la oxidación de AG y promoviendo la resistencia a la insulina (IR) (Steinberg et al., 2006). Los resultados obtenidos demuestran que hay una respuesta inflamatoria en el riñón de ratones genéticamente obesos, ya que hay un aumento de los niveles de TNF α debido a un incremento en la activación de la vía de señalización NF- κ B, como representa el aumento en la fosforilación de IKK, que permite la translocación del NF- κ B al núcleo y su activación (Hinz et al., 2012). La administración *in vivo* del A769662 disminuyó la inflamación en la corteza renal de *ob/ob*, al suprimir la señalización de NF- κ B y reduciendo la fosforilación de IKK, lo que conduce a una disminución de los niveles de la citoquina inflamatoria TNF α . Estos hallazgos respaldan el papel modulador de los activadores de la AMPK como el AICAR y la metformina en la inflamación, como se demostró en otros tipos de células como las gliales (Giri et al., 2004) las células endoteliales (Katerelos et al., 2010) y los miocitos de pacientes obesos/ diabéticos tipo 2 (Green, Macrae, et al., 2011) y son consistentes con el efecto antiinflamatorio descrito anteriormente para el AICAR en riñones de ratones obesos con HFD (Decleves et al., 2011; Decleves, Sharma, et al., 2014). Además, estudios previos han demostrado que la activación de la AMPK ejerce sus efectos vasoprotectores no sólo a través del aumento de la biodisponibilidad del NO endotelial, sino también a través de sus efectos antiinflamatorios sobre las células endoteliales mediante la supresión de NF- κ B, TNF α y moléculas de adherencia como VCAM-1 y la E-selectina (Hattori et al., 2010; Krasner et al., 2014). En consecuencia, la supresión de la señalización de NF- κ B en muestras de

DISCUSIÓN

corteza renal de ratones *ob/ob* después de la administración *in vivo* del A769662 podría atribuirse en parte a su acción antiinflamatoria en el endotelio glomerular.

5.2.4 Efectos beneficiosos de la activación de la AMPK sobre el estrés oxidativo

La sobreproducción de ROS y el estrés oxidativo juegan un factor clave en la patogénesis de la diabetes y las complicaciones vasculares relacionadas con la obesidad, incluyendo nefropatía diabética (Decleves et al., 2011; Jha et al., 2014; Muñoz et al., 2019; Muñoz et al., 2015; Sharma, 2016). Los resultados de este trabajo demuestran que la producción de superóxido dependiente de NADPH estaba reducida significativamente en la corteza renal de ratones *ob/ob* en comparación con los controles, al igual que la producción de superóxido en el corazón de los mismos animales, a pesar de que los niveles de ROS cardíacos en animales sanos eran significativamente más bajos que los del riñón. La reducción en la producción de superóxido renal en ratones *ob/ob* es consistente con la disminución en los niveles de generación de H₂O₂ basal y dependiente de NADPH observados recientemente en la corteza renal de la rata obesa Zucker (Muñoz et al., 2019). Estos hallazgos en modelos de roedores de obesidad genética están de acuerdo con los reportados por primera vez por el grupo de Sharma en el riñón diabético (Dugan et al., 2013), donde la alteración de la AMPK promovió una reducción de la producción de superóxido mitocondrial que se atribuyó al deterioro de la actividad de la cadena de transporte de electrones. Las mitocondrias son una fuente importante de generación de ROS y representan el 80% del superóxido basal producido de forma endógena. La β -oxidación de AG es una fuente de energía principal para las células con un alto gasto metabólico como son los miocitos cardíacos y las células renales del túbulo proximal, representando la β -oxidación de AG en las mitocondrias, dos tercios del consumo de O₂ total del riñón. Por lo tanto, la reducción de la producción de superóxido en el riñón de los modelos de roedores de diabetes (Dugan et al., 2013; Sharma, 2016) y de obesidad, como se muestra en el presente estudio, podrían reflejar una disfunción mitocondrial que estaría relacionada con la alteración en el metabolismo de AG, que también se ha demostrado que se produce en la fibrosis tubulointersticial en el riñón humano (Kang et al., 2015).

Se ha demostrado que la lipotoxicidad renal y la oxidación defectuosa de los AG, causada por la acumulación de lípidos, y la lesión renal en la obesidad están relacionados con una reducción de la actividad de la AMPK (Decleves et al., 2011; Decleves, Zolkipli,

DISCUSIÓN

et al., 2014; Szeto et al., 2016). En nuestro estudio, la activación de la AMPK por el tratamiento *in vivo* con A769662 restauró la producción de superóxido en la corteza renal pero no en el corazón de ratones *ob/ob*, y mejoró la actividad de la AMPK y la ACC. Al fosforilar e inhibir a la ACC, la AMPK disminuye la síntesis lipídica y aumenta la β -oxidación de AG en las mitocondrias, lo que sugiere que el tratamiento con el activador de la AMPK restaura la función mitocondrial y el equilibrio redox en el riñón de ratones obesos, de acuerdo con lo reportado anteriormente para el riñón diabético en el que la activación de la AMPK con AICAR mejoró la generación de superóxido mediante la mejora de la actividad de los complejos I y III y la biogénesis mitocondrial (Dugan et al., 2013) lo que conduce a una mejora de la inflamación, la fibrosis y la albuminuria (Declèves & Sharma, 2015; Declèves et al., 2011; Dugan et al., 2013).

A diferencia de los niveles disminuidos de superóxido que se encuentran en los tejidos tubulares renales de ratones *ob/ob*, la sobreproducción de ROS se ha descrito en células mesangiales y en tejidos vasculares de riñones obesos y diabéticos, en el que varias fuentes de generación de ROS entre las que se incluyen la COX-2, la xantina oxidasa y la Nox han estado involucradas en el estrés oxidativo (Elmarakby & Imig, 2010; Jha et al., 2014; Muñoz et al., 2019; Muñoz et al., 2015). En consecuencia, se confirmó que la producción de superóxido dependiente de NADPH se incrementó considerablemente en las arterias preglomerulares de ratas obesas, como se había descrito anteriormente (Muñoz et al., 2018; Muñoz et al., 2015), y se observó que la activación *ex vivo* e *in vivo* de la AMPK redujo el estrés oxidativo vascular. La AMPK reduce la expresión de Nox4 en podocitos (Sharma et al., 2008) y modula el equilibrio redox en las arterias preglomerulares renales a través de la reducción de la expresión de la Nox4 y la inhibición de la activación de la Nox2 (Rodríguez et al., 2020; Rodríguez et al., 2021). La potente supresión de la generación de superóxido inducida por el tratamiento *ex vivo* con el activador de la AMPK, A769662, en arterias preglomerulares renales de OZR podría atribuirse principalmente a la inhibición de la Nox2, que genera superóxido, en lugar de a la regulación a la baja de la Nox4. El estrés oxidativo arterial en el riñón de las ratas obesas se debe principalmente a la actividad aumentada de las enzimas generadoras de superóxido Nox1 y Nox2, a diferencia de la corteza renal donde el superóxido derivado de la Nox se produce principalmente por Nox1, ya que tanto la expresión como actividad de la Nox2 está disminuida en los animales obesos (Muñoz et al., 2019); además se ha descrito que la sobreexpresión de la Nox2 y la disfunción endotelial mediada por el aumento de la activación del NF- κ B observada en ratones *knockout* para AMPK α_1 , se

DISCUSIÓN

revertían gracias al tratamiento con el AICAR (Schuhmacher et al., 2011; Wang et al., 2010). Por el contrario, se ha descrito que la expresión de la Nox4 y la producción de H₂O₂ derivada de la Nox4, estaban reducidas en tejidos vasculares de ratas genéticamente obesas (Muñoz et al., 2019), así como también en ratones diabéticos hiperglucémicos tipo I y otros modelos de enfermedad renal crónica (Babelova et al., 2012; Sáenz-Medina et al., 2019). Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman que la expresión de la Nox4 se redujo notablemente tanto en la corteza renal de ratones *ob/ob* como en las arterias preglomerulares del riñón OZR junto con una disminución en la generación de H₂O₂ dependiente de NADPH y unos efectos inhibitorios mucho menores por parte del A769662 en los niveles de H₂O₂. Por lo tanto, la potente inhibición de la producción de ROS inducida por el A769662 en arterias renales *ex vivo* podría atribuirse principalmente a la Nox2 en lugar de a la inhibición de la Nox4, que se asocia con la restauración de las relajaciones dependientes de endotelio. Además, los efectos beneficiosos de la activación de la AMPK sobre el estrés oxidativo vascular y la disfunción endotelial en el riñón de animales obesos y el potencial antioxidante terapéutico de la activación de la AMPK vascular fueron confirmados por la reducción de los niveles de superóxido derivados de la NADPH en arterias renales de OZR después del tratamiento *in vivo* con el A769662.



6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En el presente trabajo de Tesis Doctoral, se ha valorado el papel de la AMPK en la función vascular renal en condiciones fisiológicas, así como los efectos de un activador selectivo de AMPK sobre la función endotelial, el estrés oxidativo y la inflamación en modelos de roedores de obesidad genética.

De los resultados obtenidos, se pueden deducir las siguientes conclusiones:

1. La activación de la AMPK produce una potente vasodilatación en arterias renales preglomerulares humanas y de ratas Wistar.
2. La vasodilatación renal inducida por la activación de la AMPK se produce a través de mecanismos dependientes del endotelio mediante la activación de la eNOS y de los canales IK_{Ca} y también a través de la activación de canales K_{ATP} y la SERCA en el MLV.
3. La relajación inducida por la AMPK en el MLV de arterias renales preglomerulares se acompaña de forma simultánea con descensos en la $[Ca^{2+}]_i$ y por otra parte intervienen mecanismos de desensibilización al calcio.
4. La activación de la AMPK reduce la producción de ROS derivadas de la NADPH oxidasa 4 y la NADPH oxidasa 2.
5. Las arterias renales preglomerulares de animales obesos presentan disfunción endotelial asociada a una alteración en la actividad de la AMPK y de la vía endotelial PI3K/eNOS/NO, mientras que las acciones vasodilatadoras de la AMPK a nivel de MLV están preservadas en animales obesos.
6. El tratamiento *in vivo* con A769662, activador selectivo de la AMPK, mejora la función vascular de arterias renales y reduce el estrés oxidativo vascular y la inflamación en arterias renales de animales obesos.
7. El equilibrio redox cortical anormal observado en el riñón de modelos genéticos de obesidad, se restaura tras el tratamiento *in vivo* con el A769662.

CONCLUSIONES

CONCLUSIÓN FINAL

La evidencia experimental de los últimos años señala que la obesidad es un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad renal crónica independiente de la diabetes y la hipertensión y que la alteración de la actividad de la AMPK está relacionada con la nefropatía asociada a la obesidad. Los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran que la actividad de la AMPK vascular a nivel renal está reducida y se asocia con disfunción endotelial, estrés oxidativo e inflamación en modelos de roedores de obesidad genética. Debido a que la AMPK está altamente expresada en el riñón y regula el metabolismo y numerosas funciones renales, un deterioro de la función vascular de la AMPK podría estar implicado en el desarrollo de la lesión renal en la obesidad. Por otro lado, se ha descrito que las acciones protectoras a nivel cardiovascular de muchos fármacos antidiabéticos están mediadas por la AMPK. Por ello, la activación de la AMPK se ha propuesto como una potencial diana terapéutica que proteja al riñón en estas situaciones. Nuestro trabajo proporciona evidencia sobre el papel beneficioso de un activador selectivo de la AMPK, el A769662, sobre el estado metabólico y la función vascular renal, actuando además como antioxidante y antiinflamatorio. Además, nuestra investigación muestra por primera vez los mecanismos implicados a nivel endotelial y de MLV por los cuales la AMPK es un potente vasodilatador y antioxidante renal en modelos animales, efectos que también son reproducibles en arterias humanas, por lo que el potencial terapéutico podría ser transferible y en un futuro situarse como una posible diana terapéutica para la prevención y el tratamiento de enfermedad renal crónica derivada de enfermedades metabólicas, como la obesidad.

CONCLUSIONES

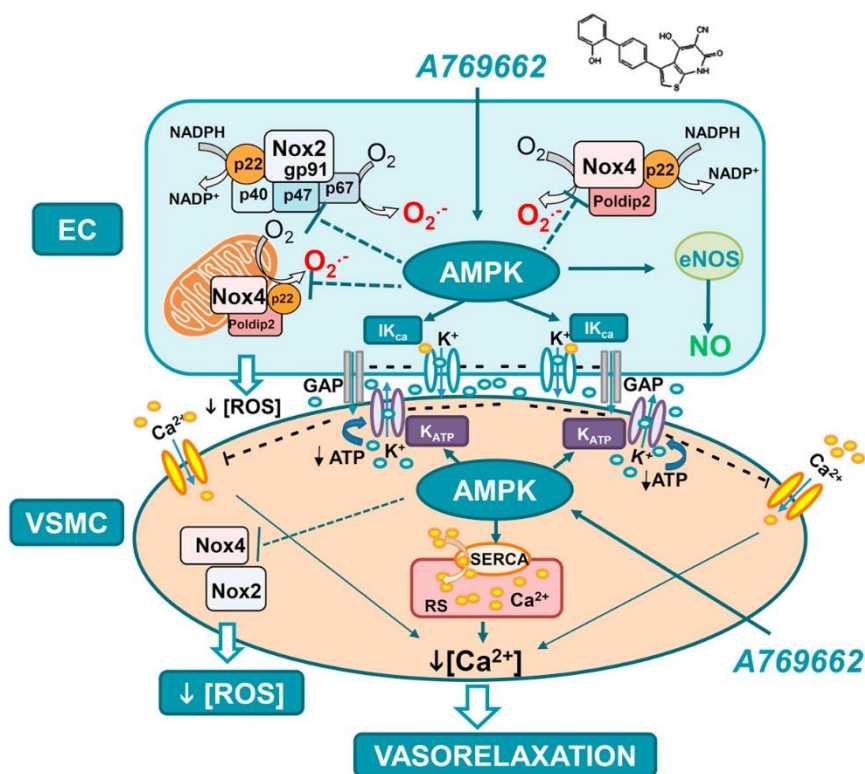


Figura 13: Mecanismos propuestos para el papel de la AMPK en la regulación de la función vascular renal.

La activación de la AMPK por el A769662 estimula a la eNOS y aumenta la producción de NO y activa los canales IK_{Ca} de las células endoteliales, que inician una respuesta hiperpolarizante que se expande hasta el MLV, produciendo una reducción de la $[Ca^{2+}]_i$ y vasodilatación. En el MLV, la AMPK activa los canales K_{ATP} y la SERCA, que contribuyen también a reducir la $[Ca^{2+}]_i$, produciendo relajación. La activación de la AMPK inhibe la producción de ROS por parte de la Nox4 y la Nox2 en arterias renales.

CONCLUSIONES

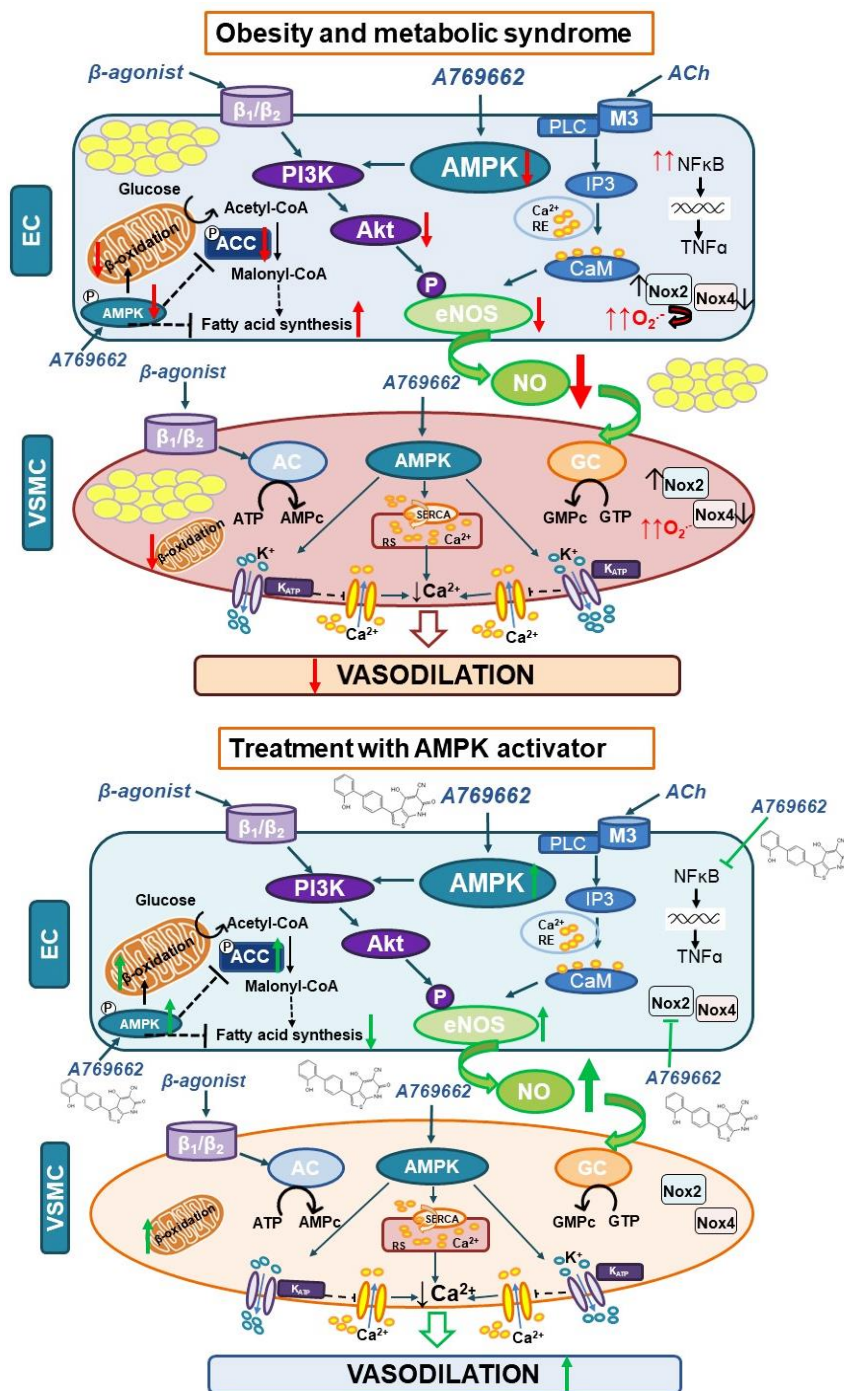


Figura 14: Mecanismos propuestos para el activador selectivo de la AMPK en la mejora de la disfunción vascular, estrés oxidativo e inflamación en la obesidad.

La disfunción vascular renal está asociada a una alteración en la vía AMPK/PI3K/eNOS endotelial, así como un aumento de los marcadores proinflamatorios y del estrés oxidativo vascular. La actividad de la p-AMPK y la p-ACC está disminuida en la obesidad, lo que indica una alteración en la β -oxidación de AG en la mitocondria. El tratamiento con el activador de la AMPK (A769662) mejora la función vascular renal y el estado metabólico, actuando también como antioxidante y antiinflamatorio.



7. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abrass, C. K. (2004). Overview: Obesity: What Does It Have to Do with Kidney Disease? *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(11), 2768. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000141963.04540.3E>
- Achari, A. E., & Jain, S. K. (2017). Adiponectin, a Therapeutic Target for Obesity, Diabetes, and Endothelial Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1321-1321. <https://doi.org/10.3390/ijms18061321>
- Akbar, D. H. (2003). Effect of metformin and sulfonylurea on C-reactive protein level in well-controlled type 2 diabetics with metabolic syndrome. *Endocrine*, 20(3), 215-218. <https://doi.org/10.1385/ENDO:20:3:215>
- Alba, G., El Bekay, R., Álvarez-Maqueda, M., Chacón, P., Vega, A., Monteseirín, J., Santa María, C., Pintado, E., Bedoya, F. J., Bartrons, R., & Sobrino, F. (2004). Stimulators of AMP-activated protein kinase inhibit the respiratory burst in human neutrophils. *FEBS Letters*, 573(1-3), 219-225. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.077>
- Alers, S., Loffler, A. S., Wesselborg, S., & Stork, B. (2012). Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol*, 32(1), 2-11. <https://doi.org/10.1128/MCB.06159-11>
- Allouch, S., & Munusamy, S. (2018). AMP-activated Protein Kinase as a Drug Target in Chronic Kidney Disease. *Curr Drug Targets*, 19(6), 709-720. <https://doi.org/10.2174/1389450118666170601130947>
- Almabrouk, T. A. M., Ewart, M. A., Salt, I. P., & Kennedy, S. (2014). Perivascular fat, AMP-activated protein kinase and vascular diseases. *British Journal of Pharmacology*, 171(3), 595-617. <https://doi.org/10.1111/bph.12479>
- Amann, K., & Benz, K. (2013). Structural renal changes in obesity and diabetes. *Semin Nephrol*, 33(1), 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2012.12.003>
- Aoki, C., Suzuki, K., Yanagi, K., Satoh, H., Niitani, M., & Aso, Y. (2012). Miglitol, an Anti-diabetic Drug, Inhibits Oxidative Stress-Induced Apoptosis and Mitochondrial ROS Over-Production in Endothelial Cells by Enhancement of AMP-Activated Protein Kinase. *Journal of Pharmacological Sciences*, 120(2), 121-128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1254/jphs.12108FP>
- Arad, M., Benson, D. W., Perez-Atayde, A. R., McKenna, W. J., Sparks, E. A., Kanter, R. J., McGarry, K., Seidman, J. G., & Seidman, C. E. (2002). Constitutively active AMP kinase mutations cause glycogen storage disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*, 109(3), 357-362. <https://doi.org/10.1172/JCI14571>
- Babelova, A., Avaniadi, D., Jung, O., Fork, C., Beckmann, J., Kosowski, J., Weissmann, N., Anilkumar, N., Shah, A. M., Schaefer, L., Schröder, K., & Brandes, R. P. (2012). Role of Nox4 in murine models of kidney disease. *Free radical biology & medicine*, 53(4), 842-853. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.027>
- Balteau, M., Van Steenbergen, A., Timmermans, A. D., Dessy, C., Behets-Wydemans, G., Tajeddine, N., Castanares-Zapatero, D., Gilon, P., Vanoverschelde, J. L., Horman, S., Hue, L., Bertrand, L., & Beauloye, C. (2014). AMPK activation by glucagon-like peptide-1 prevents NADPH oxidase activation induced by hyperglycemia in adult cardiomyocytes. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 307(8), H1120-H1133. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00210.2014>
- Banquet, S., Delannoy, E., Agouni, A., Dessy, C., Lacomme, S., Hubert, F., Richard, V., Muller, B., & Leblais, V. (2011). Role of G(i/o)-Src kinase-PI3K/Akt pathway and caveolin-1 in β_2 -adrenoceptor coupling to endothelial NO synthase in mouse pulmonary artery. *Cellular signalling*, 23(7), 1136-1143. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.02.008>
- Beg ZH, A. D., Gibson DM. (1973). Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and wth protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem Biophys Res Commun*, 54(4), 1362-1369. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(73\)91137-6](https://doi.org/10.1016/0006-291x(73)91137-6)
- Bendale, D. S., Karpe, P. A., Chhabra, R., Shete, S. P., Shah, H., & Tikoo, K. (2013). 17- β Oestradiol prevents cardiovascular dysfunction in post-menopausal metabolic syndrome

BIBLIOGRAFÍA

- by affecting SIRT1/AMPK/H3 acetylation. *British Journal of Pharmacology*, 170(4), 779-795. <https://doi.org/10.1111/bph.12290>
- Bess E, F. B., Frömel T, Fleming I. (2011). Nitric oxide-induced activation of the AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ subunit attenuates I κ B kinase activity and inflammatory responses in endothelial cells. *PLoS One*, 6(6), e20848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020848>
- Blagih, J., Coulombe, F., Vincent, Emma E., Dupuy, F., Galicia-Vázquez, G., Yurchenko, E., Raissi, Thomas C., van der Windt, Gerritje J. W., Viollet, B., Pearce, Erika L., Pelletier, J., Piccirillo, Ciriaco A., Krawczyk, Connie M., Divangahi, M., & Jones, Russell G. (2015). The Energy Sensor AMPK Regulates T Cell Metabolic Adaptation and Effector Responses In Vivo. *Immunity*, 42(1), 41-54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.030>
- Blair, E., Redwood, C., Ashrafian, H., Oliveira, M., Broxholme, J., Kerr, B., Salmon, A., Ostman-Smith, I., & Watkins, H. (2001). Mutations in the gamma(2) subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Hum Mol Genet*, 10(11), 1215-1220. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.11.1215>
- Block, K., Gorin, Y., & Abboud, H. E. (2009). Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(34), 14385-14390. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906805106>
- Boyle JG, L. P., Ewart MA, Reihill JA, Ritchie SA, Connell JM, Cleland SJ, Salt IP. (2008). Rosiglitazone stimulates nitric oxide synthesis in human aortic endothelial cells via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 283(17), 11210-11217. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710048200>
- Bradley, E. A., Eringa, E. C., Stehouwer, C. D. A., Korstjens, I., Van Nieuw Amerongen, G. P., Musters, R., Sipkema, P., Clark, M. G., & Rattigan, S. (2010). Activation of AMP-activated protein kinase by 5-aminoimidazole-4- carboxamide-1- β -d-ribofuranoside in the muscle microcirculation increases nitric oxide synthesis and microvascular perfusion. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(6), 1137-1142. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.204404>
- Brandes, R. P., Weissmann, N., & Schröder, K. (2014). Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 76, 208-226. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046>
- Brinkkoetter, P. T., Bork, T., Salou, S., Liang, W., Mizi, A., Özel, C., Koehler, S., Haggmann, H. H., Ising, C., Kuczkowski, A., Schnyder, S., Abed, A., Schermer, B., Benzing, T., Kretz, O., Puellas, V. G., Lagies, S., Schlimpert, M., Kammerer, B., Handschin, C., Schell, C., & Huber, T. B. (2019). Anaerobic Glycolysis Maintains the Glomerular Filtration Barrier Independent of Mitochondrial Metabolism and Dynamics. *Cell Reports*, 27(5), 1551-1566.e1555. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.012>
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), 813-820. <https://doi.org/10.1038/414813a>
- Bussemaker, E., Popp, R., Binder, J., Busse, R., & Fleming, I. (2003). Characterization of the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) response in the human interlobar artery. *Kidney Int*, 63(5), 1749-1755. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00910.x>
- Cacicedo, J. M., Benjachareonwong, S., Chou, E., Yagihashi, N., Ruderman, N. B., & Ido, Y. (2011). Activation of AMP-activated protein kinase prevents lipotoxicity in retinal pericytes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(6), 3630-3639. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5784>
- Cacicedo, J. M., Gauthier, M.-S., Lebrasseur, N. K., Jasuja, R., Ruderman, N. B., & Ido, Y. (2011). Acute exercise activates AMPK and eNOS in the mouse aorta. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 301(4), H1255-1265. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01279.2010>
- Cacicedo, J. M., Yagihashi, N., Keaney, J. F., Ruderman, N. B., & Ido, Y. (2004). AMPK inhibits fatty acid-induced increases in NF-kappaB transactivation in cultured human umbilical

BIBLIOGRAFÍA

- vein endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(4), 1204-1209. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.177>
- Cai, Z., Ding, Y., Zhang, M., Lu, Q., Wu, S., Zhu, H., Song, P., & Zou, M.-H. (2016). Ablation of Adenosine Monophosphate-activated protein kinase $\alpha 1$ in Vascular Smooth Muscle Cells Promotes Diet-Induced Atherosclerotic Calcification In Vivo. *Circulation Research*, 119(3), 422-433. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308301>
- Calabrese, M. F., Rajamohan, F., Harris, M. S., Caspers, N. L., Magyar, R., Withka, J. M., Wang, H., Borzilleri, K. A., Sahasrabudhe, P. V., Hoth, L. R., Geoghegan, K. F., Han, S., Brown, J., Subashi, T. A., Reyes, A. R., Frisbie, R. K., Ward, J., Miller, R. A., Landro, J. A., Londregan, A. T., Carpino, P. A., Cabral, S., Smith, A. C., Conn, E. L., Cameron, K. O., Qiu, X., & Kurumbail, R. G. (2014). Structural basis for AMPK activation: natural and synthetic ligands regulate kinase activity from opposite poles by different molecular mechanisms. *Structure*, 22(8), 1161-1172. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.06.009>
- Calvert, J. W., Gundewar, S., Jha, S., Greer, J. J. M., Bestermann, W. H., Tian, R., & Lefer, D. J. (2008). Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. *Diabetes*, 57(3), 696-705. <https://doi.org/10.2337/db07-1098>
- Cammisotto, P. G., & Bendayan, M. (2008). Adiponectin stimulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha in renal glomeruli. *J Mol Histol*, 39(6), 579-584. <https://doi.org/10.1007/s10735-008-9198-6>
- Cammisotto, P. G., Londono, I., Gingras, D., & Bendayan, M. (2008). Control of glycogen synthase through ADIPOR1-AMPK pathway in renal distal tubules of normal and diabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294(4), F881-889. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00373.2007>
- Cantó, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J. N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J. C., Elliott, P. J., Puigserver, P., & Auwerx, J. (2009). AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 458(7241), 1056-1060. <https://doi.org/10.1038/nature07813>
- Cao, X., Li, H., Tao, H., Wu, N., Yu, L., Zhang, D., Lu, X., Zhu, J., Lu, Z., & Zhu, Q. (2013). Metformin Inhibits Vascular Calcification in Female Rat Aortic Smooth Muscle Cells via the AMPK-eNOS-NO Pathway. *Endocrinology*, 154(10), 3680-3689. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1002>
- Carattino MD, E. R., Grieser HJ, Wise R, Neumann D, Schlattner U, Johnson JP, Kleyman TR, Hallows KR. (2005). Epithelial sodium channel inhibition by AMP-activated protein kinase in oocytes and polarized renal epithelial cells. *J Biol Chem*, 280(18), 17608-17616. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501770200>
- Carling, D. (2017). AMPK signalling in health and disease. *Curr Opin Cell Biol*, 45, 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.01.005>
- Carling, D., Clarke, P. R., Zammit, V. A., & Hardie, D. G. (1989). Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem*, 186(1-2), 129-136. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb15186.x>
- Carling, D., Sanders, M. J., & Woods, A. (2008). The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Int J Obes (Lond)*, 32 Suppl 4, S55-59. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.124>
- Carling, D., & Viollet, B. (2015). Beyond energy homeostasis: the expanding role of AMP-activated protein kinase in regulating metabolism. *Cell Metab*, 21(6), 799-804. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.05.005>
- Carling, D., Zammit, V. A., & Hardie, D. G. (1987). A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Letters*, 223(2), 217-222. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80292-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80292-2)
- Carlson Ca Fau - Kim, K. H., & Kim, K. H. (1973). Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem*, 248(1), 378-380.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*, 6(4), 389-395. <https://doi.org/10.1038/74651>

BIBLIOGRAFÍA

- Ceolotto, G., Gallo, A., Papparella, I., Franco, L., Murphy, E., Iori, E., Pagnin, E., Fadini, G. P., Albiero, M., Semplicini, A., & Avogaro, A. (2007). Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase via AMPK-dependent mechanism. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(12), 2627-2633. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.155762>
- Chandrasekera, P. C., Kargacin, M. E., Deans, J. P., & Lytton, J. (2009). Determination of apparent calcium affinity for endogenously expressed human sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPase isoform SERCA3. *Am J Physiol Cell Physiol*, 296(5), C1105-1114. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00650.2008>
- Chaube, B., Malvi, P., Singh, S. V., Mohammad, N., Viollet, B., & Bhat, M. K. (2015). AMPK maintains energy homeostasis and survival in cancer cells via regulating p38/PGC-1alpha-mediated mitochondrial biogenesis. *Cell Death Discov*, 1, 15063. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2015.63>
- Che, R., Yuan, Y., Huang, S., & Zhang, A. (2013). Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 306(4), F367-F378. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00571.2013>
- Chen H, M. M., Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. (2003). Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 278(45), 45021-45026. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307878200>
- Chen, H., Vanhoutte, P. M., & Leung, S. W. S. (2019). Acute activation of endothelial AMPK surprisingly inhibits endothelium-dependent hyperpolarization-like relaxations in rat mesenteric arteries. *British Journal of Pharmacology*, 176(16), 2905-2921. <https://doi.org/10.1111/bph.14716>
- Chen, L., Wang, J., Zhang, Y. Y., Yan, S. F., Neumann, D., Schlattner, U., Wang, Z. X., & Wu, J. W. (2012). AMP-activated protein kinase undergoes nucleotide-dependent conformational changes. *Nat Struct Mol Biol*, 19(7), 716-718. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2319>
- Chen MH, F. Q. (2020). The Roles of AMPK in Revascularization. *Cardiology Research and Practice*, 2020, 4028635. <https://doi.org/10.1155/2020/4028635>
- Chen, Z., Peng, I. C., Cui, X., Li, Y.-S., Chien, S., & Shyy, J. Y. J. (2010). Shear stress, SIRT1, and vascular homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(22), 10268. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003833107>
- Chen, Z., Peng, I. C., Sun, W., Su, M. I., Hsu, P. H., Fu, Y., Zhu, Y., DeFea, K., Pan, S., Tsai, M. D., & Shyy, J. Y. (2009). AMP-activated protein kinase functionally phosphorylates endothelial nitric oxide synthase Ser633. *Circ Res*, 104(4), 496-505. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.187567>
- Chen ZP, M. K., Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE. (1999). AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Letters*, 443(3), 285-289. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01705-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01705-0)
- Cheng, K. K. Y., Lam, K. S. L., Wang, Y., Huang, Y., Carling, D., Wu, D., Wong, C., & Xu, A. (2007). Adiponectin-Induced Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation and Nitric Oxide Production Are Mediated by APPL1 in Endothelial Cells. *Diabetes*, 56(5), 1387-1394. <https://doi.org/10.2337/db06-1580>
- Cho YE, B. A., Dai A, Heldak M, Makino A. (2013). Coronary endothelial dysfunction and mitochondrial reactive oxygen species in type 2 diabetic mice. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 305(10), C1033-1040. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00234.2013>
- Choi, S. R., Lim, J. H., Kim, M. Y., Kim, E. N., Kim, Y., Choi, B. S., Kim, Y.-S., Kim, H. W., Lim, K.-M., Kim, M. J., & Park, C. W. (2018). Adiponectin receptor agonist AdipoRon decreased ceramide, and lipotoxicity, and ameliorated diabetic nephropathy. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 85, 348-360. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.02.004>

BIBLIOGRAFÍA

- Christou, G. A., & Kiortsis, D. N. (2014). The role of adiponectin in renal physiology and development of albuminuria. *Journal of Endocrinology*, 221(2), R49-R61. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0578>
- Cohen, R. A., & Adachi, T. (2006). Nitric-oxide-induced vasodilatation: regulation by physiologic s-glutathiolation and pathologic oxidation of the sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase. *Trends Cardiovasc Med*, 16(4), 109-114. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2006.02.001>
- Cokorinos, E. C., Delmore, J., Reyes, A. R., Albuquerque, B., Kjøbsted, R., Jørgensen, N. O., Tran, J.-L., Jatkar, A., Cialdea, K., Esquejo, R. M., Meissen, J., Calabrese, M. F., Cordes, J., Moccia, R., Tess, D., Salatto, C. T., Coskran, T. M., Opsahl, A. C., Flynn, D., Blatnik, M., Li, W., Kindt, E., Foretz, M., Viollet, B., Ward, J., Kurumbail, R. G., Kalgutkar, A. S., Wojtaszewski, J. F. P., Cameron, K. O., & Miller, R. A. (2017). Activation of Skeletal Muscle AMPK Promotes Glucose Disposal and Glucose Lowering in Non-human Primates and Mice. *Cell Metabolism*, 25(5), 1147-1159.e1110. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.010>
- Collaboration, G. C. K. D. (2020). Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 395(10225), 709-733. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30045-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30045-3)
- Colombo, S. L., & Moncada, S. (2009). AMPK α 1 regulates the antioxidant status of vascular endothelial cells. *Biochem J*, 421(2), 163-169. <https://doi.org/10.1042/BJ20090613>
- Cool, B., Zinker, B., Chiou, W., Kifle, L., Cao, N., Perham, M., Dickinson, R., Adler, A., Gagne, G., Iyengar, R., Zhao, G., Marsh, K., Kym, P., Jung, P., Camp, H. S., & Frevert, E. (2006). Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metabolism*, 3(6), 403-416. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.05.005>
- Cornier, M.-A., Dabelea, D., Hernandez, T. L., Lindstrom, R. C., Steig, A. J., Stob, N. R., Van Pelt, R. E., Wang, H., & Eckel, R. H. (2008). The Metabolic Syndrome. *Endocrine Reviews*, 29(7), 777-822. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0024>
- Corremans, R., Vervaeke, B. A., D'Haese, P. C., Neven, E., & Verhulst, A. (2019). Metformin: A Candidate Drug for Renal Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1). <https://doi.org/10.3390/ijms20010042>
- Cullinan, S. B., & Diehl, J. A. (2004). PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*, 279(19), 20108-20117. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314219200>
- Daenen, K. A.-O. X., Andries, A., Mekahli, D., Van Schepdael, A., Jouret, F., & Bammens, B. (2019). Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*, 34(6), 975-991. <https://doi.org/10.1007/s00467-018-4005-4>
- Dagher, Z., Ruderman, N., Tornheim, K., & Ido, Y. (2001). Acute Regulation of Fatty Acid Oxidation and AMP-Activated Protein Kinase in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Circulation Research*, 88(12), 1276-1282. <https://doi.org/doi:10.1161/hh1201.092998>
- Davies, M., Fraser, S. A., Galic, S., Choy, S.-W., Katerelos, M., Gleich, K., Kemp, B. E., Mount, P. F., & Power, D. A. (2014). Novel mechanisms of Na⁺ retention in obesity: phosphorylation of NKCC2 and regulation of SPAK/OSR1 by AMPK. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 307(1), F96-F106. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00524.2013>
- Davis BJ, X. Z., Viollet B, Zou MH. (2006). Activation of the AMP-Activated Kinase by Antidiabetes Drug Metformin Stimulates Nitric Oxide Synthesis In Vivo by Promoting the Association of Heat Shock Protein 90 and Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Diabetes*, 55(2), 496-505. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.02.06.db05-1064>
- De Castro, S. (2013). *Manual de patología general* (J. L. P. Arellano, Ed. 7^a ed.). Elsevier Health Sciences. <https://books.google.es/books?id=x99IbHaMokIC>
- De Vries, A. P. J., Ruggenti, P., Ruan, X. Z., Praga, M., Cruzado, J. M., Bajema, I. M., D'Agati, V. D., Lamb, H. J., Barlovic, D. P., Hojs, R., Abbate, M., Rodriguez, R., Mogensen, C. E., & Porrini, E. (2014). Fatty kidney: Emerging role of ectopic lipid in obesity-related

BIBLIOGRAFÍA

- renal disease. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*, 2(5), 417-426. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(14\)70065-8](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70065-8)
- Declèves, A.-E., & Sharma, K. (2015). Obesity and kidney disease: differential effects of obesity on adipose tissue and kidney inflammation and fibrosis. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 24(1), 28-36. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000087>
- Declèves, A. E., Mathew, A. V., Cunard, R., & Sharma, K. (2011). AMPK Mediates the Initiation of Kidney Disease Induced by a High-Fat Diet. *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(10), 1846-1855. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011010026>
- Declèves, A. E., Sharma, K., & Satriano, J. (2014). Beneficial Effects of AMP-Activated Protein Kinase Agonists in Kidney Ischemia-Reperfusion: Autophagy and Cellular Stress Markers. *Nephron Exp Nephrol*, 128, 98-110 <https://doi.org/10.1159/000368932>
- Declèves, A. E., Zolkipli, Z., Satriano, J., Wang, L., Nakayama, T., Rogac, M., Le, T. P., Nortier, J. L., Farquhar, M. G., Naviaux, R. K., & Sharma, K. (2014). Regulation of lipid accumulation by AMP-activated kinase [corrected] in high fat diet-induced kidney injury. *Kidney Int*, 85(3), 611-623. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.462>
- Deepa, S. S., Zhou, L., Ryu, J., Wang, C., Mao, X., Li, C., Zhang, N., Musi, N., DeFronzo, R. A., Liu, F., & Dong, L. Q. (2011). APPL1 Mediates Adiponectin-Induced LKB1 Cytosolic Localization Through the PP2A-PKC ζ Signaling Pathway. *Molecular Endocrinology*, 25(10), 1773-1785. <https://doi.org/10.1210/me.2011-0082>
- Deng, G., Long, Y., Yu, Y. R., & Li, M. R. (2010). Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK-eNOS Pathway. *International Journal of Obesity*, 34, 165–171. <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.205>
- Dikalov, S. (2011). Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(7), 1289-1301. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.033>
- Dimmeler S, F. I., Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399(6736), 601-605. <https://doi.org/10.1038/21224>
- Ding M, W. Y., Sun D, Liu Z, Wang J, Li X, Huo C, Jia X, Chen W, Fu F, Wang (2017). Punicalagin Pretreatment Attenuates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury via Activation of AMPK. *The American Journal of Chinese Medicine*, 45(1), 53-66. <https://doi.org/10.1142/s0192415x17500057>
- Ding, R., Wu, W., Sun, Z., & Li, Z. (2020). AMP-activated protein kinase: An attractive therapeutic target for ischemia-reperfusion injury. *European Journal of Pharmacology*, 888, 173484. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173484>
- Domenech, E., Maestre, C., Esteban-Martinez, L., Partida, D., Pascual, R., Fernandez-Miranda, G., Seco, E., Campos-Olivas, R., Perez, M., Megias, D., Allen, K., Lopez, M., Saha, A. K., Velasco, G., Rial, E., Mendez, R., Boya, P., Salazar-Roa, M., & Malumbres, M. (2015). AMPK and PFKFB3 mediate glycolysis and survival in response to mitophagy during mitotic arrest. *Nat Cell Biol*, 17(10), 1304-1316. <https://doi.org/10.1038/ncb3231>
- Dong, Y., Zhang, M., Wang, S., Liang, B., Zhao, Z., Liu, C., Wu, M., Choi, H. C., Lyons, T. J., & Zou, M.-H. (2010). Activation of AMP-activated protein kinase inhibits oxidized LDL-triggered endoplasmic reticulum stress in vivo. *Diabetes*, 59(6), 1386-1396. <https://doi.org/10.2337/db09-1637>
- Dong Y, Z. M., Liang B, Xie Z, Zhao Z, Asfa S, Choi H. C, Zou M. H. (2010). Reduction of AMP-activated Protein Kinase Alpha 2 Increases Endoplasmic Reticulum Stress and Atherosclerosis In Vivo. *Circulation*, 121(6), 792-803. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.900928.Reduction>
- Drummond, G. R., & Sobey, C. G. (2014). Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(9), 452-463. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.06.012>
- Drummond GR, S. S., Griendling KK, Sobey CG. (2011). Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 10(6), 453-471. <https://doi.org/10.1038/nrd3403>

BIBLIOGRAFÍA

- Dryer, S. E., & Reiser, J. (2010). TRPC6 channels and their binding partners in podocytes: role in glomerular filtration and pathophysiology. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 299(4), F689-F701. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00298.2010>
- Duan, J., Guan, Y., Mu, F., Guo, C., Zhang, E., Yin, Y., Wei, G., Zhu, Y., Cui, J., Cao, J., Weng, Y., Wang, Y., Xi, M., & Wen, A. (2017). Protective effect of butin against ischemia/reperfusion-induced myocardial injury in diabetic mice: involvement of the AMPK/GSK-3 β /Nrf2 signaling pathway. *Scientific Reports*, 7(1), 41491. <https://doi.org/10.1038/srep41491>
- Dugan, L. L., You, Y. H., Ali, S. S., Diamond-Stanic, M., Miyamoto, S., DeClevés, A. E., Andreyev, A., Quach, T., Ly, S., Shekhtman, G., Nguyen, W., Chepetan, A., Le, T. P., Wang, L., Xu, M., Paik, K. P., Fogo, A., Viollet, B., Murphy, A., Brosius, F., Naviaux, R. K., & Sharma, K. (2013). AMPK dysregulation promotes diabetes-related reduction of superoxide and mitochondrial function. *Journal of Clinical Investigation*, 123(11), 4888-4899. <https://doi.org/10.1172/JCI66218>
- Dumas, S. J., Meta, E., Borri, M., Luo, Y., Li, X., Rabelink, T. J., & Carmeliet, P. (2021). Phenotypic diversity and metabolic specialization of renal endothelial cells. *Nature Reviews Nephrology*. <https://doi.org/10.1038/s41581-021-00411-9>
- Edwards, A. G., Donato, A. J., Lesniewski, L. A., Gioscia, R. A., Seals, D. R., & Moore, R. L. (2010). Life-long caloric restriction elicits pronounced protection of the aged myocardium: a role for AMPK. *Mechanisms of ageing and development*, 131(11-12), 739-742. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.09.007>
- Egan, D. F., Shackelford, D. B., Mihaylova, M. M., Gelino, S., Kohnz, R. A., Mair, W., Vasquez, D. S., Joshi, A., Gwinn, D. M., Taylor, R., Asara, J. M., Fitzpatrick, J., Dillin, A., Viollet, B., Kundu, M., Hansen, M., & Shaw, R. J. (2011). Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*, 331(6016), 456-461. <https://doi.org/10.1126/science.1196371>
- Eid, A. A., Ford, B. M., Block, K., Kasinath, B. S., Gorin, Y., Ghosh-Choudhury, G., Barnes, J. L., & Abboud, H. E. (2010). AMP-activated Protein Kinase (AMPK) negatively regulates Nox4-dependent activation of p53 and epithelial cell apoptosis in diabetes. *Journal of Biological Chemistry*, 285(48), 37503-37512. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.136796>
- Elmarakby, A. A., & Imig, J. D. (2010). Obesity is the major contributor to vascular dysfunction and inflammation in high-fat diet hypertensive rats. *Clinical science (London, England : 1979)*, 118(4), 291-301. <https://doi.org/10.1042/cs20090395>
- Emerling, B. M., Weinberg, F., Snyder, C., Burgess, Z., Mutlu, G. M., Viollet, B., Budinger, G. R. S., & Chandel, N. S. (2009). Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. *Free radical biology & medicine*, 46(10), 1386-1391. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.019>
- Enkhjargal, B., Godo, S., Sawada, A., Suvd, N., Saito, H., Noda, K., Satoh, K., & Shimokawa, H. (2014). Endothelial AMP-Activated Protein Kinase Regulates Blood Pressure and Coronary Flow Responses Through Hyperpolarization Mechanism in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(7), 1505-1513. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303735>
- Ewart MA, K. C., Salt IP. (2008). Inhibition of tumor necrosis factor alpha-stimulated monocyte adhesion to human aortic endothelial cells by AMP-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(12), 2255-2257. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.175919>
- Ewart, M. A., & Kennedy, S. (2011). AMPK and vasculoprotection. *Pharmacol Ther*, 131(2), 242-253. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2010.11.002>
- Ferri, N. (2012). AMP-activated protein kinase and the control of smooth muscle cell hyperproliferation in vascular disease. *Vascular Pharmacology*, 56(1-2), 9-13. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2011.10.003>
- Fisslthaler, B., & Fleming, I. (2009). Activation and signaling by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circ Res*, 105(2), 114-127. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.201590>

BIBLIOGRAFÍA

- Fisslthaler, B., Fleming, I., Keserü, B., Walsh, K., & Busse, R. (2007). Fluid Shear Stress and NO Decrease the Activity of the Hydroxy-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase in Endothelial Cells via the AMP-Activated Protein Kinase and FoxO1. *Circulation Research*, *100*(2), e12-e21. <https://doi.org/doi:10.1161/01.RES.0000257747.74358.1c>
- Ford, R. J., Teschke, S. R., Reid, E. B., Durham, K. K., Kroetsch, J. T., & Rush, J. W. E. (2012). AMP-activated protein kinase activator AICAR acutely lowers blood pressure and relaxes isolated resistance arteries of hypertensive rats. *Journal of hypertension*, *30*(4), 725-733. <https://doi.org/10.1097/hjh.0b013e32835050ca>
- Fraser, S., Mount, P., Hill, R., Levidiotis, V., Katsis, F., Stapleton, D., Kemp, B. E., & Power, D. A. (2005). Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase in the kidney by dietary salt intake and osmolality. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *288*(3), F578-F586. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00190.2004>
- Fraser SA, G. I., Cook N, Jennings I, Katerelos M, Katsis F, Levidiotis V, Kemp BE, Power DA. (2007). Regulation of the renal-specific Na⁺-K⁺-2Cl⁻ co-transporter NKCC2 by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Biochem J*, *405*(1), 85-93. <https://doi.org/10.1042/BJ20061850>
- Fullerton, M. D., Galic, S., Marcinko, K., Sikkema, S., Pulinilkunnil, T., Chen, Z.-P., O'Neill, H. M., Ford, R. J., Palanivel, R., O'Brien, M., Hardie, D. G., Macaulay, S. L., Schertzer, J. D., Dyck, J. R. B., van Denderen, B. J., Kemp, B. E., & Steinberg, G. R. (2013). Single phosphorylation sites in ACC1 and ACC2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nature medicine*, *19*(12), 1649-1654. <https://doi.org/10.1038/nm.3372>
- Galic S, F. M., Schertzer JD, Sikkema S, Marcinko K, Walkley CR, Izon D, Honeyman J, Chen ZP, van Denderen BJ, Kemp BE, Steinberg GR. (2011). Hematopoietic AMPK β 1 reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity. *The Journal of Clinical Investigation*, *121*(12), 4903-4915. <https://doi.org/10.1172/JCI58577>
- Galvan, D. L., Green, N. H., & Danesh, F. R. (2017). The hallmarks of mitochondrial dysfunction in chronic kidney disease. *Kidney International*, *92*(5), 1051-1057. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2017.05.034>
- García-Prieto, C. F., Gil-Ortega, M., Aránguez, I., Ortiz-Besoain, M., Somoza, B., & Fernández-Alfonso, M. S. (2015). Vascular AMPK as an attractive target in the treatment of vascular complications of obesity. *Vascular Pharmacology*, *67-69*, 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.02.017>
- García-Prieto, C. F., Hernández-Nuño, F., Rio, D. D., Ruiz-Hurtado, G., Aránguez, I., Ruiz-Gayo, M., Somoza, B., & Fernández-Alfonso, M. S. (2015). High-fat diet induces endothelial dysfunction through a down-regulation of the endothelial AMPK-PI3K-Akt-eNOS pathway. *Molecular nutrition & food research*, *59*(3), 520-532. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25421217>
- Garofalo, C., Borrelli, S., Minutolo, R., Chiodini, P., De Nicola, L., & Conte, G. (2017). A systematic review and meta-analysis suggests obesity predicts onset of chronic kidney disease in the general population. *Kidney International*, *91*(5), 1224-1235. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.12.013>
- Gauthier MS, O. B. E., Bigornia S, Mott M, Cacicedo JM, Xu XJ, Gokce N, Apovian C, Ruderman N. (2011). Decreased AMP-activated protein kinase activity is associated with increased inflammation in visceral adipose tissue and with whole-body insulin resistance in morbidly obese humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *404*(1), 382-387. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.11.127>
- Giri, S., Nath, N., Smith, B., Viollet, B., Singh, A. K., & Singh, I. (2004). 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase. *J Neurosci*, *24*(2), 479-487. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4288-03.2004>
- Godo, S., & Shimokawa, H. (2017). Divergent roles of endothelial nitric oxide synthases system in maintaining cardiovascular homeostasis. *Free Radical Biology and Medicine*, *109*(December 2016), 4-10. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.019>

BIBLIOGRAFÍA

- Goirand, F., Solar, M., Athesa, Y., Viollet, B., Mateo, P., Fortin, D., Leclerc, J., Hoerter, J., Ventura-Clapier, R., & Garnier, A. (2007). Activation of AMP kinase alpha1 subunit induces aortic vasorelaxation in mice. *J Physiol*, 581(Pt 3), 1163-1171. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.132589>
- Gollob, M. H., Green, M. S., Tang, A. S., Gollob, T., Karibe, A., Ali Hassan, A. S., Ahmad, F., Lozado, R., Shah, G., Fananapazir, L., Bachinski, L. L., & Roberts, R. (2001). Identification of a gene responsible for familial Wolff-Parkinson-White syndrome. *N Engl J Med*, 344(24), 1823-1831. <https://doi.org/10.1056/NEJM200106143442403>
- Gollob, M. H., Seger, J. J., Gollob, T. N., Tapscott, T., Gonzales, O., Bachinski, L., & Roberts, R. (2001). Novel PRKAG2 mutation responsible for the genetic syndrome of ventricular preexcitation and conduction system disease with childhood onset and absence of cardiac hypertrophy. *Circulation*, 104(25), 3030-3033. <https://doi.org/10.1161/hc5001.102111>
- Göransson, O., McBride, A., Hawley, S. A., Ross, F. A., Shpiro, N., Foretz, M., Viollet, B., Hardie, D. G., & Sakamoto, K. (2007). Mechanism of Action of A-769662, a Valuable Tool for Activation of AMP-activated Protein Kinase *Journal of Biological Chemistry*, 282(45), 32549-32560. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706536200>
- Grahame Hardie, D. (2016). Regulation of AMP-activated protein kinase by natural and synthetic activators. *Acta Pharm Sin B*, 6, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.06.002>
- Green, C. J., Macrae, K., Fogarty, S., Hardie, D. G., Sakamoto, K., & Hundal, H. S. (2011). Counter-modulation of fatty acid-induced pro-inflammatory nuclear factor κ B signalling in rat skeletal muscle cells by AMP-activated protein kinase. *Biochem J*, 435(2), 463-474. <https://doi.org/10.1042/BJ20101517>
- Green, C. J., Pedersen, M., Pedersen, B. K., & Scheele, C. (2011). Elevated NF- κ B activation is conserved in human myocytes cultured from obese type 2 diabetic patients and attenuated by AMP-activated protein kinase. *Diabetes*, 60(11), 2810-2819. <https://doi.org/10.2337/db11-0263>
- Greer, E. L., Oskoui, P. R., Banko, M. R., Maniar, J. M., Gygi, M. P., Gygi, S. P., & Brunet, A. (2007). The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J Biol Chem*, 282(41), 30107-30119. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705325200>
- Grossini, E., Molinari, C., Pollesello, P., Bellomo, G., Valente, G., Mary, D., Vacca, G., & Caimmi, P. (2012). Levosimendan protection against kidney ischemia/reperfusion injuries in anesthetized pigs. *J Pharmacol Exp Ther*, 342(2), 376-388. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.193961>
- Gutiérrez, O. M., Muntner, P., Rizk, D. V., McClellan, W. M., Warnock, D. G., Newby, P. K., & Judd, S. E. (2014). Dietary Patterns and Risk of Death and Progression to ESRD in Individuals With CKD: A Cohort Study. *American Journal of Kidney Diseases*, 64(2), 204-213. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2014.02.013>
- Habets, D. D., Coumans, W. A., El Hasnaoui, M., Zarrinpashneh, E., Bertrand, L., Viollet, B., Kiens, B., Jensen, T. E., Richter, E. A., Bonen, A., Glatz, J. F., & Luiken, J. J. (2009). Crucial role for LKB1 to AMPKalpha2 axis in the regulation of CD36-mediated long-chain fatty acid uptake into cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1791(3), 212-219. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2008.12.009>
- Hallows, K. R. (2005). Emerging role of AMP-activated protein kinase in coupling membrane transport to cellular metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 14(5), 464-471. <https://doi.org/10.1097/01.mnh.0000174145.14798.64>
- Hallows KR, M. P., Pastor-Soler NM, Power DA. (2010). Role of the energy sensor AMP-activated protein kinase in renal physiology and disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298(5), F1067-F1077. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00005.2010>
- Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Current opinion in cell biology*, 21(6), 894-899. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.08.005>
- Han, Y., Wang, Q., Song, P., Zhu, Y., & Zou, M.-H. (2010). Redox Regulation of the AMP-Activated Protein Kinase. *PLoS One*, 5(11), e15420. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015420>

BIBLIOGRAFÍA

- Hardie, D. G. (2014a). AMP-activated protein kinase: maintaining energy homeostasis at the cellular and whole-body levels. *Annu Rev Nutr*, 34, 31-55. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161148>
- Hardie, D. G. (2014b). AMPK--sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metab*, 20(6), 939-952. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.09.013>
- Hardie, D. G. (2018). Keeping the home fires burning: AMP-activated protein kinase. *Journal of the Royal Society, Interface*, 15(138), 20170774. <https://doi.org/10.1098/rsif.2017.0774>
- Hardie, D. G., & Hawley, S. A. (2001). AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. *BioEssays*, 23(12), 1112-1119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bies.10009>
- Hardie, D. G., Ross, F. A., & Hawley, S. A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(4), 251-262. <https://doi.org/10.1038/nrm3311>
- Hardie, D. G., Schaffer, B. E., & Brunet, A. (2016). AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends in Cell Biology*, 26(3), 190-201. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.013>
- Hattori Y, A. K., Nishikimi T, Matsuoka H, Kasai K. (2006). Activation of AMP-activated protein kinase enhances angiotensin II-induced proliferation in cardiac fibroblasts. *Hypertension*, 47(2), 265-270. <https://doi.org/doi:10.1161/01.HYP.0000198425.21604.aa>
- Hattori, Y., Jojima, T., Tomizawa, A., Satoh, H., Hattori, S., Kasai, K., & Hayashi, T. (2010). A glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, liraglutide, upregulates nitric oxide production and exerts anti-inflammatory action in endothelial cells. *Diabetologia*, 53(10), 2256-2263. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1831-8>
- Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Makela, T. P., Alessi, D. R., & Hardie, D. G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol*, 2(4), 28. <https://doi.org/10.1186/1475-4924-2-28>
- Hawley, S. A., Fullerton, M. D., Ross, F. A., Schertzer, J. D., Chevtzoff, C., Walker, K. J., Peggie, M. W., Zibrova, D., Green, K. A., Mustard, K. J., Kemp, B. E., Sakamoto, K., Steinberg, G. R., & Hardie, D. G. (2012). The Ancient Drug Salicylate Directly Activates AMP-Activated Protein Kinase. *Science*, 336(6083), 918. <https://doi.org/10.1126/science.1215327>
- Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., Frenguelli, B. G., & Hardie, D. G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab*, 2(1), 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.009>
- He, C., Li, H., Viollet, B., Zou, M.-H., & Xie, Z. (2015). AMPK Suppresses Vascular Inflammation In Vivo by Inhibiting Signal Transducer and Activator of Transcription-1. *Diabetes*, 64(12), 4285-4297. <https://doi.org/10.2337/db15-0107>
- He, T., Xiong, J., Nie, L., Yu, Y., Guan, X., Xu, X., Xiao, T., Yang, K., Liu, L., Zhang, D., Huang, Y., Zhang, J., Wang, J., Sharma, K., & Zhao, J. (2016). Resveratrol inhibits renal interstitial fibrosis in diabetic nephropathy by regulating AMPK/NOX4/ROS pathway. *J Mol Med*, 94(12), 1359-1371. <https://doi.org/10.1007/s00109-016-1451-y>
- Heathcote, H. R., Mancini, S. J., Strembitska, A., Jamal, K., Reihill, J. A., Palmer, T. M., Gould, G. W., & Salt, I. P. (2016). Protein kinase C phosphorylates AMP-activated protein kinase α 1 Ser487. *The Biochemical journal*, 473(24), 4681-4697. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160211>
- Heil, M., Eitenmüller, I., Schmitz-Rixen, T., & Schaper, W. (2006). Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(1), 45-55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00290.x>
- Hill NR, F. S., Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, Hobbs FD. (2016). Global Prevalence of Chronic Kidney Disease - A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*, 11(7), e0158765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158765>
- Himmelfarb, J. (2005). Relevance of oxidative pathways in the pathophysiology of chronic kidney disease. *Cardiol Clin*, 23(3), 319-330. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2005.03.005>

BIBLIOGRAFÍA

- Hinchey, E. C., Gruszczczyk, A. V., Willows, R., Navaratnam, N., Hall, A. R., Bates, G., Bright, T. P., Krieg, T., Carling, D., & Murphy, M. P. (2018). Mitochondria-derived ROS activate AMP-activated protein kinase (AMPK) indirectly. *The Journal of biological chemistry*, 293(44), 17208-17217. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra118.002579>
- Hinz, M., Arslan, S., & Scheidereit, C. (2012). It takes two to tango: IκBs, the multifunctional partners of NF-κB. *Immunol Rev*, 246(1), 59-76. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01102.x>
- Hoppe, S., Bierhoff, H., Cado, I., Weber, A., Tiebe, M., Grummt, I., & Voit, R. (2009). AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(42), 17781-17786. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909873106>
- Hurley, R. L., Anderson, K. A., Franzone, J. M., Kemp, B. E., Means, A. R., & Witters, L. A. (2005). The Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinases are AMP-activated protein kinase kinases. *J Biol Chem*, 280(32), 29060-29066. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503824200>
- IDF. (2020, 29/07/2020). *IDF Consensus Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome*. Retrieved 22/02/2021 from <https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definition-of-the-metabolic-syndrome.html>
- Ido, Y., Carling, D., & Ruderman, N. (2002). Hyperglycemia-Induced Apoptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Inhibition by the AMP-Activated Protein Kinase Activation*, 51(1), 159-167. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.1.159>
- Igata, M., Motoshima, H., Tsuruzoe, K., Kojima, K., Matsumura, T., Kondo, T., Taguchi, T., Nakamaru, K., Yano, M., Kukidome, D., Matsumoto, K., Toyonaga, T., Asano, T., Nishikawa, T., & Araki, E. (2005). Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Suppresses Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Through the Inhibition of Cell Cycle Progression. *Circulation Research*, 97(8), 837-844. <https://doi.org/doi:10.1161/01.RES.0000185823.73556.06>
- Inoguchi, T., Li, P., Umeda, F., Yu, H. Y., Kakimoto, M., Imamura, M., Aoki, T., Etoh, T., Hashimoto, T., Naruse, M., Sano, H., Utsumi, H., & Nawata, H. (2000). High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*, 49(11), 1939-1945. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.11.1939>
- Inoki, K., Zhu, T., & Guan, K.-L. (2003). TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell*, 115(5), 577-590. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00929-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00929-2)
- Irazabal, M. V., & Torres, V. E. (2020). Reactive Oxygen Species and Redox Signaling in Chronic Kidney Disease. *Cells*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/cells9061342>
- Ix, J. H., & Sharma, K. (2010). Mechanisms linking obesity, chronic kidney disease, and fatty liver disease: the roles of fetuin-A, adiponectin, and AMPK. *J Am Soc Nephrol*, 21(3), 406-412. <https://doi.org/10.1681/asn.2009080820>
- Jakobsen, S. N., Hardie, D. G., Morrice, N., & Tornqvist, H. E. (2001). 5'-AMP-activated Protein Kinase Phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in Mouse C2C12 Myotubes in Response to 5-Aminoimidazole-4-carboxamide Riboside. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 46912-46916. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.C100483200>
- Jansen, T., Kröller-Schön, S., Schönfelder, T., Foretz, M., Viollet, B., Daiber, A., Oelze, M., Brandt, M., Steven, S., Kvandová, M., Kalinovic, S., Lagrange, J., Keaney, J. F., Jr, Münzel, T., Wenzel, P., & Schulz, E. (2018). α1AMPK deletion in myelomonocytic cells induces a pro-inflammatory phenotype and enhances angiotensin II-induced vascular dysfunction. *Cardiovascular Research*, 114(14), 1883-1893. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy172>
- Jansen, T., Kvandov, M., Daiber, A., Stamm, P., Frenis, K., Schulz, E., Münzel, T., & Kröller-schön, S. (2020). The AMP-Activated Protein Kinase Plays a Role in Antioxidant Defense and Regulation of Vascular Inflammation. *Antioxidants*, 9(6), 525. <https://doi.org/10.3390/antiox9060525>

BIBLIOGRAFÍA

- Jeong, H. W., Hsu, K. C., Lee, J.-W., Ham, M., Huh, J. Y., Shin, H. J., Kim, W. S., & Kim, J. B. (2009). Berberine suppresses proinflammatory responses through AMPK activation in macrophages. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296(4), E955-E964. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90599.2008>
- Jha, J. C., Banal, C., Chow, B. S. M., Cooper, M. E., & Jandeleit-Dahm, K. (2016). Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. *Antioxidants & redox signaling*, 25(12), 657-684. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6664>
- Jha, J. C., Gray, S. P., Barit, D., Okabe, J., El-Osta, A., Namikoshi, T., Thallas-Bonke, V., Winkler, K., Szyndralewicz, C., Heitz, F., Touyz, R. M., Cooper, M. E., Schmidt, H. H. W., & Jandeleit-Dahm, K. A. (2014). Genetic targeting or pharmacologic inhibition of NADPH oxidase nox4 provides renoprotection in long-term diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 25(6), 1237-1254. <https://doi.org/10.1681/asn.2013070810>
- Jiang, F., Lim, H. K., Morris, M. J., Prior, L., Velkoska, E., Wu, X., & Dusting, G. J. (2011). Systemic upregulation of NADPH oxidase in diet-induced obesity in rats. *Redox Report*, 16(6), 223-229. <https://doi.org/10.1179/174329211X13049558293713>
- Jiang, F., Liu, G.-S., Dusting, G. J., & Chan, E. C. (2014). NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF- β -mediated fibrotic responses. *Redox Biology*, 2, 267-272. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.01.012>
- Jiang, S., Li, T., Ji, T., Yi, W., Yang, Z., Wang, S., Yang, Y., & Gu, C. (2018). AMPK: Potential Therapeutic Target for Ischemic Stroke. *Theranostics*, 8(16), 4535-4551. <https://doi.org/10.7150/thno.25674>
- Jin, Y., Liu, S., Ma, Q., Xiao, D., & Chen, L. (2017). Berberine enhances the AMPK activation and autophagy and mitigates high glucose-induced apoptosis of mouse podocytes. *European Journal of Pharmacology*, 794, 106-114. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.11.037>
- Joo, M. S., Kim, W. D., Lee, K. Y., Kim, J. H., Koo, J. H., & Kim, S. G. (2016). AMPK Facilitates Nuclear Accumulation of Nrf2 by Phosphorylating at Serine 550. *Molecular and Cellular Biology*, 36(14), 1931-1942. <https://doi.org/10.1128/MCB.00118-16>
- Jorgensen, S. B., Trebak, J. T., Viollet, B., Schjerling, P., Vaulont, S., Wojtaszewski, J. F., & Richter, E. A. (2007). Role of AMPK α 2 in basal, training-, and AICAR-induced GLUT4, hexokinase II, and mitochondrial protein expression in mouse muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292(1), E331-339. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00243.2006>
- Jorgensen, S. B., Wojtaszewski, J. F., Viollet, B., Andreelli, F., Birk, J. B., Hellsten, Y., Schjerling, P., Vaulont, S., Neuffer, P. D., Richter, E. A., & Pilegaard, H. (2005). Effects of alpha-AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle. *FASEB J*, 19(9), 1146-1148. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3144fje>
- Joseph, B. K., Liu, H. Y., Francisco, J., Pandya, D., Donigan, M., Gallo-Ebert, C., Giordano, C., Bata, A., & Nickels, J. T., Jr. (2015). Inhibition of AMP Kinase by the Protein Phosphatase 2A Heterotrimer, PP2A^{ppp2r2d}. *J Biol Chem*, 290(17), 10588-10598. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.626259>
- Juszczak F, C. N., Mathew AV, Declèves AE. (2020). Critical Role for AMPK in Metabolic Disease-Induced Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci*, 21(21), 7994.
- Juszczak, F., Vlassembrouck, M., Botton, O., Zwakhals, T., Decarioncle, M., Tassin, A., Caron, N., & Declèves, A.-E. (2021). Delayed Exercise Training Improves Obesity-Induced Chronic Kidney Disease by Activating AMPK Pathway in High-Fat Diet-Fed Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 350. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/1/350>
- Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D., & Hardie, D. G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab*, 1(1), 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2004.12.003>
- Kang, H. M., Ahn, S. H., Choi, P., Ko, Y. A., Han, S. H., Chinga, F., Park, A. S., Tao, J., Sharma, K., Pullman, J., Bottinger, E. P., Goldberg, I. J., & Susztak, K. (2015). Defective fatty

BIBLIOGRAFÍA

- acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nat Med*, 21(1), 37-46. <https://doi.org/10.1038/nm.3762>
- Kargacin, M. E., & Kargacin, G. J. (1995). Direct measurement of Ca²⁺ uptake and release by the sarcoplasmic reticulum of saponin permeabilized isolated smooth muscle cells. *J Gen Physiol*, 106(3), 467-484. <https://doi.org/10.1085/jgp.106.3.467>
- Kashihara, N., Haruna, Y., Kondeti, V. K., & Kanwar, Y. S. (2010). Oxidative stress in diabetic nephropathy. *Current medicinal chemistry*, 17(34), 4256-4269. <https://doi.org/10.2174/092986710793348581>
- Katerelos, M., Mudge, S. J., Stapleton, D., Auwardt, R. B., Fraser, S. A., Chen, C.-G., Kemp, B. E., & Power, D. A. (2010). 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside and AMP-activated protein kinase inhibit signalling through NF-κB. *Immunology & Cell Biology*, 88(7), 754-760. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/icb.2010.44>
- Kaushal, G. P., Chandrashekar, K., & Juncos, L. A. (2019). Molecular Interactions Between Reactive Oxygen Species and Autophagy in Kidney Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15). <https://doi.org/10.3390/ijms20153791>
- Kaushal, G. P., Chandrashekar, K., Juncos, L. A., & Shah, S. V. (2020). Autophagy Function and Regulation in Kidney Disease. *Biomolecules*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/biom10010100>
- Kawata, T., Mimuro, T., Onuki, T., Tsuchiya, K., Nihei, H., & Koike, T. (1998). The K(ATP) channel opener nicorandil: effect on renal hemodynamics in spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. *Kidney Int Suppl*, 67, S231-233. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.06758.x>
- Kikuchi, H., Sasaki, E., Nomura, N., Mori, T., Minamishima, Y. A., Yoshizaki, Y., Takahashi, N., Furusho, T., Arai, Y., Mandai, S., Yamashita, T., Ando, F., Maejima, Y., Isobe, K., Okado, T., Rai, T., Uchida, S., & Sohara, E. (2018). Failure to sense energy depletion may be a novel therapeutic target in chronic kidney disease. *Kidney International*, 95(1), 123-137. <https://doi.org/10.1186/1475-9276-12-40>
- Kim, A. S., Miller, E. J., Wright, T. M., Li, J., Qi, D., Atsina, K., Zaha, V., Sakamoto, K., & Young, L. H. (2011). A small molecule AMPK activator protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(1), 24-32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.03.003>
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K. L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13(2), 132-141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>
- Kim, J., Yang, G., Kim, Y., Kim, J., & Ha, J. (2016). AMPK activators: Mechanisms of action and physiological activities. *Experimental and Molecular Medicine*, 48, e224. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.16>
- Kim, J. E., Song, S. E., Kim, Y. W., Kim, J. Y., Park, S. C., Park, Y. K., Baek, S. H., Lee, I. K., & Park, S. Y. (2010). Adiponectin inhibits palmitate-induced apoptosis through suppression of reactive oxygen species in endothelial cells: Involvement of cAMP/protein kinase A and AMP-activated protein kinase. *Journal of Endocrinology*, 207(1), 35-44. <https://doi.org/10.1677/JOE-10-0093>
- Kim, M., Shen, M., Ngoy, S., Karamanlidis, G., Liao, R., & Tian, R. (2012). AMPK isoform expression in the normal and failing hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 52(5), 1066-1073. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.01.016>
- Kim, S. A., & Choi, H. C. (2012). Metformin inhibits inflammatory response via AMPK-PTEN pathway in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 425(4), 866-872. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.165>
- Kjøbsted, R., Hingst, J. R., Fentz, J., Foretz, M., Sanz, M. N., Pehmøller, C., Shum, M., Marette, A., Mounier, R., Treebak, J. T., Wojtaszewski, J. F. P., Viollet, B., & Lantier, L. (2018). AMPK in skeletal muscle function and metabolism. *FASEB Journal*, 32(4), 1741-1777. <https://doi.org/10.1096/fj.201700442R>
- Kobayashi, S. (2015). Choose Delicately and Reuse Adequately: The Newly Revealed Process of Autophagy. *Biol Pharm Bull*, 38(8), 1098-1103. <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00096>

BIBLIOGRAFÍA

- Kou, R., & Michel, T. (2007). Epinephrine regulation of the endothelial nitric-oxide synthase: roles of RAC1 and beta3-adrenergic receptors in endothelial NO signaling. *J Biol Chem*, 282(45), 32719-32729. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706815200>
- Koyama, T., Kume, S., Koya, D., Araki, S.-i., Isshiki, K., Chin-Kanasaki, M., Sugimoto, T., Haneda, M., Sugaya, T., Kashiwagi, A., Maegawa, H., & Uzu, T. (2011). SIRT3 attenuates palmitate-induced ROS production and inflammation in proximal tubular cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(6), 1258-1267. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.028>
- Krall, P., Canales, C. P., Kairath, P., Carmona-Mora, P., Molina, J., Carpio, J. D., Ruiz, P., Mezzano, S. A., Li, J., Wei, C., Reiser, J., Young, J. I., & Walz, K. (2010). Podocyte-Specific Overexpression of Wild Type or Mutant Trpc6 in Mice Is Sufficient to Cause Glomerular Disease. *PLoS One*, 5(9), e12859. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012859>
- Kramer, H., Luke, A., Bidani, A., Cao, G., Cooper, R., & McGee, D. (2005). Obesity and prevalent and incident CKD: the Hypertension Detection and Follow-Up Program. *Am J Kidney Dis*, 46(4), 587-594. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2005.06.007>
- Krasner, N. M., Ido, Y., Ruderman, N. B., & Cacicedo, J. M. (2014). Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) Analog Liraglutide Inhibits Endothelial Cell Inflammation through a Calcium and AMPK Dependent Mechanism. *PLoS One*, 9(5), e97554. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097554>
- Kröller-Schön, S., Jansen, T., Tran, T. L. P., Kvandová, M., Kalinovic, S., Oelze, M., Keaney, J. F., Foretz, M., Viollet, B., Daiber, A., Kossmann, S., Lagrange, J., Frenis, K., Wenzel, P., Münzel, T., & Schulz, E. (2019). Endothelial α 1AMPK modulates angiotensin II-mediated vascular inflammation and dysfunction. *Basic Research in Cardiology*, 114(2), 8. <https://doi.org/10.1007/s00395-019-0717-2>
- Kukidome, D., Nishikawa, T., Sonoda, K., Imoto, K., Fujisawa, K., Yano, M., Motoshima, H., Taguchi, T., Matsumura, T., & Araki, E. (2006). Activation of AMP-Activated Protein Kinase Reduces Hyperglycemia-Induced Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production and Promotes Mitochondrial Biogenesis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Diabetes*, 55(1), 120-127. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.01.06.db05-0943>
- Kume, S., Thomas, M. C., & Koya, D. (2012). Nutrient Sensing, Autophagy, and Diabetic Nephropathy. *Diabetes*, 61(1), 23. <https://doi.org/10.2337/db11-0555>
- Kume, S., Uzu, T., Araki, S.-i., Sugimoto, T., Isshiki, K., Chin-Kanasaki, M., Sakaguchi, M., Kubota, N., Terauchi, Y., Kadowaki, T., Haneda, M., Kashiwagi, A., & Koya, D. (2007). Role of Altered Renal Lipid Metabolism in the Development of Renal Injury Induced by a High-Fat Diet. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(10), 2715. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007010089>
- Laderoute, K. R., Amin, K., Calaoagan, J. M., Knapp, M., Le, T., Orduna, J., Foretz, M., & Viollet, B. (2006). 5'-AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Is Induced by Low-Oxygen and Glucose Deprivation Conditions Found in Solid-Tumor Microenvironments. *Molecular and Cellular Biology*, 26(14), 5336-5347. <https://doi.org/10.1128/mcb.00166-06>
- Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 181-189. <https://doi.org/10.1038/nri1312>
- Lan F, C. J. M., Ruderman N, Ido Y. (2008). SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*, 283(41), 27628-27635. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805711200>
- Larsen, B. T., Bubolz, A. H., Mendoza, S. A., Pritchard, K. A., Jr., & Gutterman, D. D. (2009). Bradykinin-induced dilation of human coronary arterioles requires NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(5), 739-745. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.169367>
- LeBrasseur, N. K., Kelly, M., Tsao, T.-S., Farmer, S. R., Saha, A. K., Ruderman, N. B., & Tomas, E. (2006). Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in

BIBLIOGRAFÍA

- mammalian tissues. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 291(1), E175-E181. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00453.2005>
- Lee, H., Zandkarimi, F., Zhang, Y., Meena, J. K., Kim, J., Zhuang, L., Tyagi, S., Ma, L., Westbrook, T. F., Steinberg, G. R., Nakada, D., Stockwell, B. R., & Gan, B. (2020). Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis. *Nature Cell Biology*, 22(2), 225-234. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0461-8>
- Lee, K. Y., & Choi, H. C. (2013). Acetylcholine-induced AMP-activated protein kinase activation attenuates vasoconstriction through an LKB1-dependent mechanism in rat aorta. *Vascular Pharmacology*, 59(3), 96-102. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vph.2013.07.007>
- Lee MJ, F. D., Mariappan MM, Sataranatarajan K, Mahimainathan L, Musi N, Foretz M, Viollet B, Weinberg JM, Choudhury GG, Kasinath BS. (2007). A role for AMP-activated protein kinase in diabetes-induced renal hypertrophy. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 292(2), F617-F627. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00278.2006>
- Lee, M. S., Han, H. J., Han, S. Y., Kim, I. Y., Chae, S., Lee, C. S., Kim, S. E., Yoon, S. G., Park, J. W., Kim, J. H., Shin, S., Jeong, M., Ko, A., Lee, H. Y., Oh, K. J., Lee, Y. H., Bae, K. H., Koo, S. H., Kim, J. W., Seong, J. K., Hwang, D., & Song, J. (2018). Loss of the E3 ubiquitin ligase MKRN1 represses diet-induced metabolic syndrome through AMPK activation. *Nat Commun*, 9(1), 3404. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05721-4>
- Lee SY, K. J., Kim DJ, Park SH, Jeong HY, Lee YH, Kim YG, Yang DH, Lee SH. (2017). PGC1 α Activators Mitigate Diabetic Tubulopathy by Improving Mitochondrial Dynamics and Quality Control. *Journal of Diabetes Research*, 2017, 6483572. <https://doi.org/10.1155/2017/6483572>
- Lee, W. J., Lee, I. K., Kim, H. S., Kim, Y. M., Koh, E. H., Won, J. C., Han, S. M., Kim, M.-S., Jo, I., Oh, G. T., Park, I.-S., Youn, J. H., Park, S.-W., Lee, K.-U., & Park, J.-Y. (2005). α -lipoic acid Prevents Endothelial Dysfunction in Obese Rats via Activation of AMP-Activated Protein Kinase. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(12), 2488-2494. <https://doi.org/doi:10.1161/01.ATV.0000190667.33224.4c>
- Lempiainen, J., Finckenberg, P., Levijoki, J., & Mervaala, E. (2012). AMPK activator AICAR ameliorates ischaemia reperfusion injury in the rat kidney. *Br J Pharmacol*, 166(6), 1905-1915. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01895.x>
- Lennon, R., Pons, D., Sabin, M. A., Wei, C., Shield, J. P., Coward, R. J., Tavaré, J. M., Mathieson, P. W., Saleem, M. A., & Welsh, G. I. (2009). Saturated fatty acids induce insulin resistance in human podocytes: implications for diabetic nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(11), 3288-3296. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp302>
- Leprivier, G., Remke, M., Rotblat, B., Dubuc, A., Mateo, A. R., Kool, M., Agnihotri, S., El-Naggar, A., Yu, B., Somasekharan, S. P., Faubert, B., Bridon, G., Tognon, C. E., Mathers, J., Thomas, R., Li, A., Barokas, A., Kwok, B., Bowden, M., Smith, S., Wu, X., Korshunov, A., Hielscher, T., Northcott, P. A., Galpin, J. D., Ahern, C. A., Wang, Y., McCabe, M. G., Collins, V. P., Jones, R. G., Pollak, M., Delattre, O., Gleave, M. E., Jan, E., Pfister, S. M., Proud, C. G., Derry, W. B., Taylor, M. D., & Sorensen, P. H. (2013). The eEF2 kinase confers resistance to nutrient deprivation by blocking translation elongation. *Cell*, 153(5), 1064-1079. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.055>
- Leung, S. W. S., & Vanhoutte, P. M. (2017). Endothelium-dependent hyperpolarization: age, gender and blood pressure, do they matter? *Acta Physiologica*, 219(1), 108-123. <https://doi.org/10.1111/apha.12628>
- Levine, Y. C., Li, G. K., & Michel, T. (2007). Agonist-modulated regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in endothelial cells. Evidence for an AMPK \rightarrow Rac1 \rightarrow Akt \rightarrow endothelial nitric-oxide synthase pathway. *J Biol Chem*, 282(28), 20351-20364. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702182200>
- Li, J., Hu, X., Selvakumar, P., Russell, R. R., 3rd, Cushman, S. W., Holman, G. D., & Young, L. H. (2004). Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 287(5), E834-841. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00234.2004>

BIBLIOGRAFÍA

- Li, J., Wang, Y., Wang, Y., Wen, X., Ma, X.-N., Chen, W., Huang, F., Kou, J., Qi, L.-W., Liu, B., & Liu, K. (2015). Pharmacological activation of AMPK prevents Drp1-mediated mitochondrial fission and alleviates endoplasmic reticulum stress-associated endothelial dysfunction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 86, 62-74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.07.010>
- Li XN, S. J., Zhang L, LeMaire SA, Hou X, Zhang C, Coselli JS, Chen L, Wang XL, Zhang Y, Shen YH. (2009). Activation of the AMPK-FOXO3 pathway reduces fatty acid-induced increase in intracellular reactive oxygen species by upregulating thioredoxin. *Diabetes*, 58(10), 2246-2257. <https://doi.org/10.2337/db08-1512>
- Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M. M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J. Y., Gao, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T. J., Shaw, R. J., Cohen, R. A., & Zang, M. (2011). AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab*, 13(4), 376-388. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.03.009>
- Li, Z., Li, J., Miao, X., Cui, W., Miao, L., & Cai, L. (2021). A minireview: Role of AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling in obesity-related renal injury. *Life Sciences*, 265, 118828. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118828>
- Lieberthal, W., & Levine, J. S. (2009). The Role of the Mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) in Renal Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(12), 2493. <https://doi.org/10.1681/ASN.2008111186>
- Lifschitz-Mercer B, S. Y., Ben-Meir D, Bramante-Schreiber L, Leider-Trejo L, Karby S, Smorodinsky NI, Lavi S. (2001). Protein phosphatase 2Ca expression in normal human tissues: an immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol*, 116(1), 31-39. <https://doi.org/10.1007/s004180100291>
- Lin, J., Handschin, C., & Spiegelman, B. M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*, 1(6), 361-370. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.004>
- Lin YC, W. M., Lin YF, Chen CR, Chen CY, Chen CJ, Shen CC, Chen KC, Peng CC. (2019). Nifedipine Modulates Renal Lipogenesis via the AMPK-SREBP Transcriptional Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7). <https://doi.org/10.3390/ijms20071570>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2, 17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Liu XM, P. K., Shebib AR, Wang H, Korthuis RJ, Durante W. (2011). Activation of AMPK stimulates heme oxygenase-1 gene expression and human endothelial cell survival. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 300(1), H84-H93. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00749.2010>
- Liu, Y., Wan Q Fau - Guan, Q., Guan Q Fau - Gao, L., Gao L Fau - Zhao, J., & Zhao, J. (2005). High-fat diet feeding impairs both the expression and activity of AMPKα in rats' skeletal muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339(2), 701-707. <https://doi.org/doi:10.1016/j.bbrc.2005.11.068>
- Loffler, A. S., Alers, S., Dieterle, A. M., Keppeler, H., Franz-Wachtel, M., Kundu, M., Campbell, D. G., Wesselborg, S., Alessi, D. R., & Stork, B. (2011). Ulk1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop. *Autophagy*, 7(7), 696-706. <https://doi.org/10.4161/auto.7.7.15451>
- Lopez, M., Nogueiras, R., Tena-Sempere, M., & Dieguez, C. (2016). Hypothalamic AMPK: a canonical regulator of whole-body energy balance. *Nat Rev Endocrinol*, 12(7), 421-432. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.67>
- Lorenz, J. N., Schnermann, J., Brosius, F. C., Briggs, J. P., & Furspan, P. B. (1992). Intracellular ATP can regulate afferent arteriolar tone via ATP-sensitive K⁺ channels in the rabbit. *J Clin Invest*, 90(3), 733-740. <https://doi.org/10.1172/JCI115945>
- Lu, Q., Li, X., Liu, J., Sun, X., Rousselle, T., Ren, D., Tong, N., & Li, J. (2019). AMPK is associated with the beneficial effects of antidiabetic agents on cardiovascular diseases. *Bioscience reports*, 39(2), BSR20181995. <https://doi.org/10.1042/BSR20181995>

BIBLIOGRAFÍA

- Luo, Z., Saha, A. K., Xiang, X., & Ruderman, N. B. (2005). AMPK, the metabolic syndrome and cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(2), 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.12.011>
- Mahlapuu, M., Johansson, C., Lindgren, K., Hjälm, G., Barnes, B. R., Krook, A., Zierath, J. R., Andersson, L., & Marklund, S. (2004). Expression profiling of the γ -subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggests a major role for γ 3 in white skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 286(2), E194-E200. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00147.2003>
- Marsin, A. S., Bertrand, L., Rider, M. H., Deprez, J., Beauloye, C., Vincent, M. F., Van den Berghe, G., Carling, D., & Hue, L. (2000). Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol*, 10(20), 1247-1255. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00742-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00742-9)
- Marsin, A. S., Bouzin, C., Bertrand, L., & Hue, L. (2002). The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem*, 277(34), 30778-30783. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205213200>
- Martinez-Sanchez, N., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., Varela, L., Villarroya, J., Rial-Pensado, E., Buque, X., Aurrekoetxea, I., Delgado, T. C., Vazquez-Martinez, R., Gonzalez-Garcia, I., Roa, J., Whittle, A. J., Gomez-Santos, B., Velagapudi, V., Tung, Y. C. L., Morgan, D. A., Voshol, P. J., Martinez de Morentin, P. B., Lopez-Gonzalez, T., Linares-Pose, L., Gonzalez, F., Chatterjee, K., Sobrino, T., Medina-Gomez, G., Davis, R. J., Casals, N., Oresic, M., Coll, A. P., Vidal-Puig, A., Mittag, J., Tena-Sempere, M., Malagon, M. M., Dieguez, C., Martinez-Chantar, M. L., Aspichueta, P., Rahmouni, K., Nogueiras, R., Sabio, G., Villarroya, F., & Lopez, M. (2017). Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance. *Cell Metab*, 26(1), 212-229 e212. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.014>
- Matsumoto, S., Gotoh, N., Hishinuma, S., Abe, Y., Shimizu, Y., Katano, Y., & Ishihata, A. (2014). The role of hypertriglyceridemia in the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction. *Nutrients*, 6(3), 1236-1250. <https://doi.org/10.3390/nu6031236>
- McCarty, M. F. (2005). AMPK activation as a strategy for reversing the endothelial lipotoxicity underlying the increased vascular risk associated with insulin resistance syndrome. *Med Hypotheses*, 64(6), 1211-1215. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.01.042>
- McLaughlin, T., Deng, A., Gonzales, O., Aillaud, M., Yee, G., Lamendola, C., Abbasi, F., Connolly, A. J., Sherman, A., Cushman, S. W., Reaven, G., & Tsao, P. S. (2008). Insulin resistance is associated with a modest increase in inflammation in subcutaneous adipose tissue of moderately obese women. *Diabetologia*, 51(12), 2303-2308. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1148-z>
- Michell BJ, C. Z., Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT, Kemp BE. (2001). Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 276(21), 17625-17629. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100122200>
- Milan, D., Jeon, J. T., Looft, C., Amarger, V., Robic, A., Thelander, M., Rogel-Gaillard, C., Paul, S., Iannuccelli, N., Rask, L., Ronne, H., Lundstrom, K., Reinsch, N., Gellin, J., Kalm, E., Roy, P. L., Chardon, P., & Andersson, L. (2000). A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. *Science*, 288(5469), 1248-1251. <https://doi.org/10.1126/science.288.5469.1248>
- Miller, E. R., Juraschek, S. P., Anderson, C. A., Guallar, E., Henoch-Ryugo, K., Charleston, J., Turban, S., Bennett, M. R., & Appel, L. J. (2013). The Effects of n-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation on Biomarkers of Kidney Injury in Adults With Diabetes. *Diabetes Care*, 36(6), 1462. <https://doi.org/10.2337/dc12-1940>
- Mizrachy-Schwartz, S., Cohen, N., Klein, S., Kravchenko-Balasha, N., & Levitzki, A. (2011). Up-regulation of AMP-activated protein kinase in cancer cell lines is mediated through c-Src activation. *J Biol Chem*, 286(17), 15268-15277. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.211813>

BIBLIOGRAFÍA

- Montezano, A. C., & Touyz, R. M. (2014). Reactive oxygen species, vascular Noxs, and hypertension: focus on translational and clinical research. *Antioxidants & redox signaling*, 20(1), 164-182. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5302>
- Morigi, M., Perico, L., Rota, C., Longaretti, L., Conti, S., Rottoli, D., Novelli, R., Remuzzi, G., & Benigni, A. (2015). Sirtuin 3-dependent mitochondrial dynamic improvements protect against acute kidney injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(2), 715-726. <https://doi.org/10.1172/JCI77632>
- Morrow, V. A., Foufelle, F., Connell, J. M., Petrie, J. R., Gould, G. W., & Salt, I. P. (2003). Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem*, 278(34), 31629-31639. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212831200>
- Motawi, T. M., Hashem, R. M., Rashed, L. A., & El-Razek, S. M. (2009). Comparative study between the effect of the peroxisome proliferator activated receptor-alpha ligands fenofibrate and n-3 polyunsaturated fatty acids on activation of 5'-AMP-activated protein kinase-alpha1 in high-fat fed rats. *J Pharm Pharmacol*, 61(10), 1339-1346. <https://doi.org/10.1211/jpp/61.10.0010>
- Mounier, R., Théret, M., Arnold, L., Cuvellier, S., Bultot, L., Göransson, O., Sanz, N., Ferry, A., Sakamoto, K., Foretz, M., Viollet, B., & Chazaud, B. (2013). AMPK α 1 Regulates Macrophage Skewing at the Time of Resolution of Inflammation during Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Metabolism*, 18(2), 251-264. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.06.017>
- Mount, P. F., Hill, R. E., Fraser, S. A., Levidiotis, V., Katsis, F., Kemp, B. E., & Power, D. A. (2005). Acute renal ischemia rapidly activates the energy sensor AMPK but does not increase phosphorylation of eNOS-Ser1177. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 289(5), F1103-F1115. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00458.2004>
- Mungai, P. T., Waypa, G. B., Jairaman, A., Prakriya, M., Dokic, D., Ball, M. K., & Schumacker, P. T. (2011). Hypoxia Triggers AMPK Activation through Reactive Oxygen Species-Mediated Activation of Calcium Release-Activated Calcium Channels. *Molecular and Cellular Biology*, 31(17), 3531-3545. <https://doi.org/10.1128/mcb.05124-11>
- Muñoz, M., López-Oliva, M. E., Pinilla, E., Martínez, M. P., Sánchez, A., Rodríguez, C., García-Sacristán, A., Hernández, M., Rivera, L., & Prieto, D. (2017). CYP epoxygenase-derived H₂O₂ is involved in the endothelium-derived hyperpolarization (EDH) and relaxation of intrarenal arteries. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.031>
- Muñoz, M., López-Oliva, M. E., Rodríguez, C., Pilar, M., Sáenz-medina, J., Sánchez, A., Climent, B., Benedito, S., García-sacristán, A., Rivera, L., Hernández, M., & Prieto, D. (2019). Differential contribution of Nox1, Nox2 and Nox4 to kidney vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in obesity. *Redox Biology*, 28, 101330. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101330>
- Muñoz, M., Martínez, M. P., López-Oliva, M. E., Rodríguez, C., Corbacho, C., Carballido, J., García-Sacristán, A., Hernández, M., Rivera, L., Sáenz-Medina, J., & Prieto, D. (2018). Hydrogen peroxide derived from NADPH oxidase 4- and 2 contributes to the endothelium-dependent vasodilatation of intrarenal arteries. *Redox Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.08.004>
- Muñoz, M., Sánchez, A., Pilar Martínez, M., Benedito, S., López-Oliva, M.-E., García-Sacristán, A., Hernández, M., & Prieto, D. (2015). COX-2 is involved in vascular oxidative stress and endothelial dysfunction of renal interlobar arteries from obese Zucker rats. *Free radical biology & medicine*, 84, 77-90. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.024>
- Muoio, D. M., Seefeld, K., Witters, L. A., & Coleman, R. A. (1999). AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J*, 338 (Pt 3), 783-791. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10051453>
- Myers, R. W., Guan, H.-P., Ehrhart, J., Petrov, A., Prahallada, S., Tozzo, E., Yang, X., Kurtz, M. M., Trujillo, M., Gonzalez Trotter, D., Feng, D., Xu, S., Eiermann, G., Holahan, M. A.,

BIBLIOGRAFÍA

- Rubins, D., Conarello, S., Niu, X., Souza, S. C., Miller, C., Liu, J., Lu, K., Feng, W., Li, Y., Painter, R. E., Milligan, J. A., He, H., Liu, F., Ogawa, A., Wisniewski, D., Rohm, R. J., Wang, L., Bunzel, M., Qian, Y., Zhu, W., Wang, H., Bennet, B., LaFranco Scheuch, L., Fernandez, G. E., Li, C., Klimas, M., Zhou, G., van Heek, M., Biftu, T., Weber, A., Kelley, D. E., Thornberry, N., Erion, M. D., Kemp, D. M., & Sebbat, I. K. (2017). Systemic pan-AMPK activator MK-8722 improves glucose homeostasis but induces cardiac hypertrophy. *Science*, *357*(6350), 507. <https://doi.org/10.1126/science.aah5582>
- Nagata D, M. M., Walsh K. (2003). AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling in endothelial cells is essential for angiogenesis in response to hypoxic stress. *J Biol Chem*, *278*(33), 31000-31006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300643200>
- Nagata D, T. R., Sata M, Satonaka H, Suzuki E, Nagano T, Hirata Y. (2004). AMP-activated protein kinase inhibits angiotensin II-stimulated vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*, *110*(4), 444-451. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000136025.96811.76>
- Nichols, C. G. (2006). KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. *Nature*, *440*(7083), 470-476. <https://doi.org/10.1038/nature04711>
- Ning, J., Xi, G., & Clemmons, D. R. (2011). Suppression of AMPK Activation via S485 Phosphorylation by IGF-I during Hyperglycemia Is Mediated by AKT Activation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Endocrinology*, *152*(8), 3143-3154. <https://doi.org/10.1210/en.2011-0155>
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S.-i., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M. A., Beebe, D., Oates, P. J., Hammes, H.-P., Giardino, I., & Brownlee, M. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, *404*(6779), 787-790. <https://doi.org/10.1038/35008121>
- O'Neill, S., & O'Driscoll, L. (2015). Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obesity Reviews*, *16*(1), 1-12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/obr.12229>
- Obici, S., Feng, Z., Arduini, A., Conti, R., & Rossetti, L. (2003). Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat Med*, *9*(6), 756-761. <https://doi.org/10.1038/nm873>
- OMS. (2020, 1/04/2020). *Obesidad y sobrepeso. Datos y cifras*. Retrieved 22/02 from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Ouchi, N., Kobayashi H Fau - Kihara, S., Kihara S Fau - Kumada, M., Kumada M Fau - Sato, K., Sato K Fau - Inoue, T., Inoue T Fau - Funahashi, T., Funahashi T Fau - Walsh, K., & Walsh, K. (2004). Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem*, *279*(2), 1304-1309. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310389200>
- Papadimitriou, A., Peixoto, E. B. M. I., Silva, K. C., Lopes de Faria, J. M., & Lopes de Faria, J. B. (2014). Increase in AMPK brought about by cocoa is renoprotective in experimental diabetes mellitus by reducing NOX4/TGFβ-1 signaling. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *25*(7), 773-784. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.03.010>
- Prieto, D., Contreras, C., & Sánchez, A. (2014). Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. *Curr Vasc Pharmacol*, *12*(3), 412-426. <https://doi.org/10.2174/1570161112666140423221008>
- Procopio, C., Andreozzi, F., Laratta, E., Cassese, A., Beguinot, F., Arturi, F., Hribal, M. L., Perticone, F., & Sesti, G. (2009). Leptin-Stimulated Endothelial Nitric-Oxide Synthase via an Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase/Akt Signaling Pathway Is Attenuated by Interaction with C-Reactive Protein. *Endocrinology*, *150*(8), 3584-3593. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0921>

BIBLIOGRAFÍA

- Qi, D., & Young, L. H. (2015). AMPK: energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 26(8), 422-429. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.05.010>
- Qi, J., Gong, J., Zhao, T., Zhao, J., Lam, P., Ye, J., Li, J. Z., Wu, J., Zhou, H. M., & Li, P. (2008). Downregulation of AMP-activated protein kinase by Cidea-mediated ubiquitination and degradation in brown adipose tissue. *EMBO J*, 27(11), 1537-1548. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.92>
- Rajani, R., Pastor-Soler, N. M., & Hallows, K. R. (2017). Role of AMP-activated protein kinase in kidney tubular transport, metabolism, and disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 26(5), 375-383. <https://doi.org/10.1097/mnh.0000000000000349>
- Ramos LF, S. A., Ikizler TA, Himmelfarb J. (2008). Oxidative stress and inflammation are associated with adiposity in moderate to severe CKD. *J Am Soc Nephrol*, 19(3), 593-599. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007030355>
- Rangan, G., Wang Y Fau - Harris, D., & Harris, D. (2009). NF-kappaB signalling in chronic kidney disease. *Front Biosci*, 14, 3496-3522. <https://doi.org/10.2741/3467>
- Rasmussen, K. M. B., Braunstein, T. H., Salomonsson, M., Brasen, J. C., & Sorensen, C. M. (2016). Contribution of K(+) channels to endothelium-derived hypolarization-induced renal vasodilation in rats in vivo and in vitro. *Pflugers Arch*, 468(7), 1139-1149. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1805-x>
- Ravindran, S., Kuruvilla, V., Wilbur, K., & Munusamy, S. (2017). Nephroprotective Effects of Metformin in Diabetic Nephropathy. *Journal of Cellular Physiology*, 232(4), 731-742. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcp.25598>
- Recio, C., Oguiza, A., Lazaro, I., Mallavia, B., Egido, J., & Gomez-Guerrero, C. (2014). Suppressor of Cytokine Signaling 1-Derived Peptide Inhibits Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription Pathway and Improves Inflammation and Atherosclerosis in Diabetic Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(9), 1953-1960. <https://doi.org/doi:10.1161/ATVBAHA.114.304144>
- Reisin, E., Liao, J., Lee, B. S., Larroque, M., Aguilar, E. A., Morse, S. A., Ebenezer, P. J., Francis, J., & Hu, X. (2009). Effect of the HMG-CoA Reductase Inhibitor Rosuvastatin on Early Chronic Kidney Injury in Obese Zucker Rats Fed With an Atherogenic Diet. *The American Journal of the Medical Sciences*, 338(4), 301-309. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3181b27195>
- Roach, P. J. (2011). AMPK -> ULK1 -> autophagy. *Molecular and Cellular Biology*, 31(15), 3082-3084. <https://doi.org/10.1128/MCB.05565-11>
- Rochlani, Y., Pothineni, N. V., Kovelamudi, S., & Mehta, J. L. (2017). Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic advances in cardiovascular disease*, 11(8), 215-225. <https://doi.org/10.1177/1753944717711379>
- Rodríguez, C., Contreras, C., Sáenz-Medina, J., Muñoz, M., Corbacho, C., Carballido, J., García-Sacristán, A., Hernandez, M., López, M., Rivera, L., & Prieto, D. (2020). Activation of the AMP-related kinase (AMPK) induces renal vasodilatation and downregulates Nox-derived reactive oxygen species (ROS) generation. *Redox Biol*, 34, 101575. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101575>
- Rodríguez, C., Muñoz, M., Contreras, C., & Prieto, D. (2021). AMPK, metabolism, and vascular function. *The FEBS Journal*, 288, 3746-3771. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/febs.15863>
- Rogacka, D., Piwkowska, A., Audzeyenka, I., Angielski, S., & Jankowski, M. (2014). Involvement of the AMPK-PTEN pathway in insulin resistance induced by high glucose in cultured rat podocytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 51, 120-130. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.04.008>
- Rohde, K., Keller, M., la Cour Poulsen, L., Blüher, M., Kovacs, P., & Böttcher, Y. (2019). Genetics and epigenetics in obesity. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 92, 37-50. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.10.007>

BIBLIOGRAFÍA

- Rolf, J., Zarrouk, M., Finlay, D. K., Foretz, M., Viollet, B., & Cantrell, D. A. (2013). AMPK α 1: a glucose sensor that controls CD8 T-cell memory. *European journal of immunology*, 43(4), 889-896. <https://doi.org/10.1002/eji.201243008>
- Ross, F. A., Jensen, T. E., & Hardie, D. G. (2016). Differential regulation by AMP and ADP of AMPK complexes containing different gamma subunit isoforms. *Biochem J*, 473(2), 189-199. <https://doi.org/10.1042/BJ20150910>
- Rubin, L. J., Magliola, L., Feng, X., Jones, A. W., & Hale, C. C. (2005). Metabolic activation of AMP kinase in vascular smooth muscle. *Journal of Applied Physiology*, 98(1), 296-306. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00075.2004>
- Ruderman, N., & Prentki, M. (2004). AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 340-351. <https://doi.org/10.1038/nrd1344>
- Ruderman, N. B., Carling, D., Prentki, M., & Cacicedo, J. M. (2013). AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 123(7), 2764-2772. <https://doi.org/10.1172/JCI67227>
- Ruderman, N. B., Julia Xu, X., Nelson, L., Cacicedo, J. M., Saha, A. K., Lan, F., & Ido, Y. (2010). AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(4), E751-E760. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00745.2009>
- Russell, R. R., III, Li, J., Coven, D. L., Pypaert, M., Zechner, C., Palmeri, M., Giordano, F. J., Mu, J., Birnbaum, M. J., & Young, L. H. (2004). AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(4), 495-503. <https://doi.org/10.1172/JCI19297>
- Rutherford, C., Speirs, C., Williams, J. J. L., Ewart, M.-A., Mancini, S. J., Hawley, S. A., Delles, C., Viollet, B., Costa-Pereira, A. P., Baillie, G. S., Salt, I. P., & Palmer, T. M. (2016). Phosphorylation of Janus kinase 1 (JAK1) by AMP-activated protein kinase (AMPK) links energy sensing to anti-inflammatory signaling. *Science signaling*, 9(453), ra109. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf8566>
- Sáenz-Medina, J., Muñoz, M., Sanchez, A., Rodriguez, C., Jorge, E., Corbacho, C., Izquierdo, D., Santos, M., Donoso, E., Virumbrales, E., Sanchez, A., Ramil, E., Coronado, M. J., Prieto, D., & Carballido, J. (2019). Nox1-derived oxidative stress as a common pathogenic link between obesity and hyperoxaluria-related kidney injury. *Urolithiasis*, 48(6), 481-492. <https://doi.org/10.1007/s00240-019-01170-w>
- Saiki, A., Nagayama, D., Ohhira, M., Endoh, K., Ohtsuka, M., Koide, N., Oyama, T., Miyashita, Y., & Shirai, K. (2005). Effect of weight loss using formula diet on renal function in obese patients with diabetic nephropathy. *International Journal of Obesity*, 29(9), 1115-1120. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803009>
- Salatto, C. T., Miller, R. A., Cameron, K. O., Cokorinos, E., Reyes, A., Ward, J., Calabrese, M. F., Kurumbail, R. G., Rajamohan, F., Kalgutkar, A. S., Tess, D. A., Shavnya, A., Genung, N. E., Edmonds, D. J., Jatkar, A., Maciejewski, B. S., Amaro, M., Gandhok, H., Monetti, M., Cialdea, K., Bollinger, E., Kreeger, J. M., Coskran, T. M., Opsahl, A. C., Boucher, G. G., Birnbaum, M. J., DaSilva-Jardine, P., & Rolph, T. (2017). Selective Activation of AMPK β 1-Containing Isoforms Improves Kidney Function in a Rat Model of Diabetic Nephropathy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 361(2), 303-311. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.237925>
- Salminen, A., Kaarniranta, K., & Kauppinen, A. (2016). Age-related changes in AMPK activation: Role for AMPK phosphatases and inhibitory phosphorylation by upstream signaling pathways. *Ageing Research Reviews*, 28, 15-26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.04.003>
- Salt I, C. J., Hawley SA, Prescott A, Woods A, Carling D, Hardie DG. (1998). AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *Biochem J*, 334((Pt 1)(Pt 1)), 177-187. <https://doi.org/10.1042/bj3340177>

BIBLIOGRAFÍA

- Salt, I. P., & Hardie, D. G. (2017). AMP-Activated Protein Kinase: An Ubiquitous Signaling Pathway with Key Roles in the Cardiovascular System. *Circulation Research*, 120(11), 1825-1841. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.309633>
- Sanders MJ, A. Z., Hegarty BD, Heath R, Snowden MA, Carling D. (2007). Defining the mechanism of activation of AMP-activated protein kinase by the small molecule A-769662, a member of the thienopyridone family. *J Biol Chem*, 282(45), 32539-32548. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706543200>
- Sanders, M. J., Grondin, P. O., Hegarty, B. D., Snowden, M. A., & Carling, D. (2007). Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J*, 403(1), 139-148. <https://doi.org/10.1042/BJ20061520>
- Santiago, E., Martínez, M. P., Climent, B., Muñoz, M., Briones, A. M., Salices, M., García-Sacristán, A., Rivera, L., & Prieto, D. (2016). Augmented oxidative stress and preserved vasoconstriction induced by hydrogen peroxide in coronary arteries in obesity: role of COX-2. *British Journal of Pharmacology*, 173(22), 3176-3195. <https://doi.org/10.1111/bph.13579>
- Sanz, P. (2008). AMP-activated protein kinase: structure and regulation. *Curr Protein Pept Sci*, 9(5), 478-492. <https://doi.org/10.2174/138920308785915254>
- Sanz, P., Rubio, T., & Garcia-Gimeno, M. A. (2013). AMPKbeta subunits: More than just a scaffold in the formation of AMPK complex. *FEBS Journal*, 280(16), 3723-3733. <https://doi.org/10.1111/febs.12364>
- Satriano, J., & Sharma, K. (2013). Autophagy and metabolic changes in obesity-related chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28(suppl_4), iv29-iv36. <https://doi.org/10.1093/ndt/gft229>
- Schneider, H., Schubert, K. M., Blodow, S., Kreutz, C. P., Erdogmus, S., Wiedenmann, M., Qiu, J., Fey, T., Ruth, P., Lubomirov, L. T., Pfitzer, G., Mederos Y Schnitzler, M., Hardie, D. G., Gudermann, T., & Pohl, U. (2015). AMPK dilates resistance arteries via activation of SERCA and BKCa channels in smooth muscle. *Hypertension*, 66(1), 108-116. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05514>
- Schubert, K. M., Qiu, J., Blodow, S., Wiedenmann, M., Lubomirov, L. T., Pfitzer, G., Pohl, U., & Schneider, H. (2017). The AMP-Related Kinase (AMPK) Induces Ca²⁺-Independent Dilation of Resistance Arteries by Interfering With Actin Filament Formation. *Circulation Research*, 121(2), 149-161. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309962>
- Schuhmacher, S., Foretz, M., Knorr, M., Jansen, T., Hortmann, M., Wenzel, P., Oelze, M., Kleschyov, A. L., Daiber, A., Keaney, J. F., Jr., Wegener, G., Lackner, K., Munzel, T., Viollet, B., & Schulz, E. (2011). alpha1AMP-activated protein kinase preserves endothelial function during chronic angiotensin II treatment by limiting Nox2 upregulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(3), 560-566. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.219543>
- Scott JW, v. D. B., Jorgensen SB, Honeyman JE, Steinberg GR, Oakhill JS, Iseli TJ, Koay A, Gooley PR, Stapleton D, Kemp BE. (2008). Thienopyridone drugs are selective activators of AMP-activated protein kinase beta1-containing complexes. *Chem Biol*, 15(11), 1220-1230. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.10.005>
- Sedeek, M., Callera, G., Montezano, A., Gutsol, A., Heitz, F., Szyndralewicz, C., Page, P., Kennedy, C. R. J., Burns, K. D., Touyz, R. M., & Hébert, R. L. (2010). Critical role of Nox4-based NADPH oxidase in glucose-induced oxidative stress in the kidney: implications in type 2 diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 299(6), F1348-F1358. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00028.2010>
- Sedeek, M., Nasrallah, R., Touyz, R. M., & Hebert, R. L. (2013). NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and the Kidney: Friend and Foe. *Journal of the American Society of Nephrology*. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012111112>
- Seo-Mayer, P. W., Thulin, G., Zhang, L., Alves, D. S., Ardito, T., Kashgarian, M., & Caplan, M. J. (2011). Preactivation of AMPK by metformin may ameliorate the epithelial cell damage caused by renal ischemia. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 301(6), F1346-F1357. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00420.2010>

BIBLIOGRAFÍA

- Sharma, K. (2016). Obesity and Diabetic Kidney Disease: Role of Oxidant Stress and Redox Balance. *Antioxidants & redox signaling*, 25(4), 208-216. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6696>
- Sharma, K., Ramachandrarao, S., Qiu, G., Usui, H. K., Zhu, Y., Dunn, S. R., Ouedraogo, R., Hough, K., McCue, P., Chan, L., Falkner, B., & Goldstein, B. J. (2008). Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clin Invest*, 118(5), 1645-1656. <https://doi.org/10.1172/JCI32691>
- Shaw, R. J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R. L., Witters, L. A., DePinho, R. A., & Cantley, L. C. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(10), 3329-3335. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308061100>
- Shibata R, S. K., Pimentel DR, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, Funahashi T, Ouchi N, Walsh K. (2005). Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nat Med*, 11(10), 1096-1103. <https://doi.org/10.1038/nm1295>. Epub 2005 Sep 11
- Shirwany, N. A., & Zou, M.-H. (2010). AMPK in cardiovascular health and disease. *Acta Pharmacologica Sinica*, 31(9), 1075-1084. <https://doi.org/10.1038/aps.2010.139>
- Song, P., & Zou, M.-H. (2012). Regulation of NAD(P)H oxidases by AMPK in cardiovascular systems. *Free radical biology & medicine*, 52(9), 1607-1619. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.025>
- Spire, D., Manis, A. D., & Staruschenko, A. (2019). Ion channels and transporters in diabetic kidney disease. In S. N. Orlov (Ed.), *Current Topics in Membranes* (Vol. 83, pp. 353-396). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.ctm.2019.01.001>
- Stahmann N, W. A., Carling D, Heller R. (2006). Thrombin activates AMP-activated protein kinase in endothelial cells via a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. *Mol Cell Biol*, 26(16), 5933-5945. <https://doi.org/10.1128/MCB.00383-06>
- Stahmann, N., Woods, A., Spengler, K., Heslegrave, A., Bauer, R., Krause, S., Viollet, B., Carling, D., & Heller, R. (2010). Activation of AMP-activated protein kinase by vascular endothelial growth factor mediates endothelial angiogenesis independently of nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry*, 285(14), 10638-10652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.108688>
- Stapleton, D., Mitchelhill, K. I., Gao, G., Widmer, J., Mitchell, B. J., Teh, T., House, C. M., Fernandez, C. S., Cox, T., Witters, L. A., & Kemp, B. E. (1996). Mammalian AMP-activated Protein Kinase Subfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 271(2), 611-614. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.2.611>
- Steinberg, G. R., & Kemp, B. E. (2009). AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev*, 89(3), 1025-1078. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2008>
- Steinberg, G. R., Mitchell, B. J., van Denderen, B. J., Watt, M. J., Carey, A. L., Fam, B. C., Andrikopoulos, S., Proietto, J., Görgün, C. Z., Carling, D., Hotamisligil, G. S., Febbraio, M. A., Kay, T. W., & Kemp, B. E. (2006). Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab*, 4(6), 465-474. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.11.005>
- Steinberg, G. R., & Schertzer, J. D. (2014). AMPK promotes macrophage fatty acid oxidative metabolism to mitigate inflammation: implications for diabetes and cardiovascular disease. *Immunology & Cell Biology*, 92(4), 340-345. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/icb.2014.11>
- Stemmer K, P.-T. D., Ananthakrishnan G, Bort A, Seeley RJ, Tschöp MH, Dietrich DR, Pfluger PT. (2012). High-fat-diet-induced obesity causes an inflammatory and tumor-promoting microenvironment in the rat kidney. *Dis Model Mech*, 5(5), 627-635. <https://doi.org/10.1242/dmm.009407>
- Steneberg, P., Lindahl, E., Dahl, U., Lidh, E., Straseviciene, J., Backlund, F., Kjellkvist, E., Berggren, E., Lundberg, I., Bergqvist, I., Ericsson, M., Eriksson, B., Linde, K., Westman, J., Edlund, T., & Edlund, H. (2018). PAN-AMPK activator O304 improves glucose

BIBLIOGRAFÍA

- homeostasis and microvascular perfusion in mice and type 2 diabetes patients. *JCI insight*, 3(12), e99114. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99114>
- Suarez, R. K. (2012). Energy and metabolism. *Compr Physiol*, 2(4), 2527-2540. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110009>
- Sukhodub, A., Jovanovic, S., Du, Q., Budas, G., Clelland, A. K., Shen, M., Sakamoto, K., Tian, R., & Jovanovic, A. (2007). AMP-activated protein kinase mediates preconditioning in cardiomyocytes by regulating activity and trafficking of sarcolemmal ATP-sensitive K(+) channels. *J Cell Physiol*, 210(1), 224-236. <https://doi.org/10.1002/jcp.20862>
- Sun, G., Tarasov, A. I., McGinty, J., McDonald, A., da Silva Xavier, G., Gorman, T., Marley, A., French, P. M., Parker, H., Gribble, F., Reimann, F., Prendiville, O., Carzaniga, R., Viollet, B., Leclerc, I., & Rutter, G. A. (2010). Ablation of AMP-activated protein kinase $\alpha 1$ and $\alpha 2$ from mouse pancreatic beta cells and RIP2.Cre neurons suppresses insulin release in vivo. *Diabetologia*, 53(5), 924-936. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1692-1>
- Sun, W., Lee, T. S., Zhu, M., Gu, C., Wang, Y., Zhu, Y., & Shyy, J. Y. (2006). Statins activate AMP-activated protein kinase in vitro and in vivo. *Circulation*, 114(24), 2655-2662. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.630194>
- Sun, Y., Li, J., Xiao, N., Wang, M., Kou, J., Qi, L., Huang, F., Liu, B., & Liu, K. (2014). Pharmacological activation of AMPK ameliorates perivascular adipose/endothelial dysfunction in a manner interdependent on AMPK and SIRT1. *Pharmacological Research*, 89, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.07.006>
- Sung, J. Y., & Choi, H. C. (2012). Metformin-induced AMP-activated protein kinase activation regulates phenylephrine-mediated contraction of rat aorta. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 421(3), 599-604. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.04.052>
- Szeto, H. H., Liu, S., Soong, Y., Alam, N., Prusky, G. T., & Seshan, S. V. (2016). Protection of mitochondria prevents high-fat diet-induced glomerulopathy and proximal tubular injury. *Kidney International*, 90(5), 997-1011. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.06.013>
- Szrejder, M., Rachubik, P., Rogacka, D., Audzeyenka, I., Rychłowski, M., Kreft, E., Angielski, S., & Piwkowska, A. (2020). Metformin reduces TRPC6 expression through AMPK activation and modulates cytoskeleton dynamics in podocytes under diabetic conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(3), 165610. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165610>
- Takiar, V., Nishio S Fau - Seo-Mayer, P., Seo-Mayer P Fau - King, J. D., Jr., King Jd Jr Fau - Li, H., Li H Fau - Zhang, L., Zhang L Fau - Karihaloo, A., Karihaloo A Fau - Hallows, K. R., Hallows Kr Fau - Somlo, S., Somlo S Fau - Caplan, M. J., & Caplan, M. J. (2011). Activating AMP-activated protein kinase (AMPK) slows renal cystogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(6), 2462-2467. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011498108>
- Tang, C., Cai, J., & Dong, Z. (2016). Mitochondrial dysfunction in obesity-related kidney disease: a novel therapeutic target. *Kidney International*, 90(5), 930-933. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.07.045>
- Tang, S., & Xiao, X. (2020). Ferroptosis and kidney diseases. *International Urology and Nephrology*, 52(3), 497-503. <https://doi.org/10.1007/s11255-019-02335-7>
- Taylor, E. B., An, D., Kramer, H. F., Yu, H., Fujii, N. L., Roeckl, K. S., Bowles, N., Hirshman, M. F., Xie, J., Feener, E. P., & Goodyear, L. J. (2008). Discovery of TBC1D1 as an insulin-, AICAR-, and contraction-stimulated signaling nexus in mouse skeletal muscle. *J Biol Chem*, 283(15), 9787-9796. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708839200>
- Thomas, G., Sehgal, A. R., Kashyap, S. R., Srinivas, T. R., Kirwan, J. P., & Navaneethan, S. D. (2011). Metabolic Syndrome and Kidney Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 6(10), 2364. <https://doi.org/10.2215/CJN.02180311>
- Thomson, D. M., Porter, B. B., Tall, J. H., Kim, H. J., Barrow, J. R., & Winder, W. W. (2007). Skeletal muscle and heart LKB1 deficiency causes decreased voluntary running and reduced muscle mitochondrial marker enzyme expression in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 292(1), E196-202. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00366.2006>

BIBLIOGRAFÍA

- Thors B, H. H., Thorgeirsson G. (2004). Thrombin and histamine stimulate endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation at Ser1177 via an AMPK mediated pathway independent of PI3K-Akt. *FEBS Lett*, 573(1-3), 175-180. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.078>
- Umezawa, S., Higurashi, T., & Nakajima, A. (2017). AMPK: Therapeutic Target for Diabetes and Cancer Prevention. *Current Pharmaceutical Design*, 23(25), 3629-3644. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170713150440>
- Van Nostrand, J. L., Hellberg, K., Luo, E. C., Van Nostrand, E. L., Dayn, A., Yu, J., Shokhirev, M. N., Dayn, Y., Yeo, G. W., & Shaw, R. J. (2020). AMPK regulation of Raptor and TSC2 mediate metformin effects on transcriptional control of anabolism and inflammation. *Genes Dev*, 34(19-20), 1330-1344. <https://doi.org/10.1101/gad.339895.120>
- Vanhoutte, P. M. (2009). Endothelial dysfunction - The first step toward coronary arteriosclerosis. *Circulation Journal*, 73(4), 595-601. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-08-1169>
- Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Feletou, M., & Tang, E. H. C. (2017). Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. *Acta Physiologica*, 219(1), 22-96. <https://doi.org/10.1111/apha.12646>
- Wang, J., Yang, L., Rezaie, A. R., & Li, J. (2011). Activated protein C protects against myocardial ischemic/reperfusion injury through AMP-activated protein kinase signaling [<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04331.x>]. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9(7), 1308-1317. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2011.04331.x>
- Wang, J., Yue, X., Meng, C., Wang, Z., Jin, X., Cui, X., Yang, J., Shan, C., Gao, Z., Yang, Y., Li, J., Chang, B., & Chang, B. (2020). Acute Hyperglycemia May Induce Renal Tubular Injury Through Mitophagy Inhibition [Original Research]. *Frontiers in Endocrinology*, 11(959). <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.536213>
- Wang LT, C. B., Wu CT, Huang KH, Chiang CK, Hwa Liu S. (2013). Protective Role of AMP-Activated Protein Kinase-Evoked Autophagy on an In Vitro Model of Ischemia/Reperfusion-Induced Renal Tubular Cell Injury. *PLoS One*, 8(11), e79814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079814>
- Wang, S.-Y., Cai, G.-Y., & Chen, X.-M. (2018). Energy restriction in renal protection. *British Journal of Nutrition*, 120(10), 1149-1158. <https://doi.org/10.1017/S0007114518002684>
- Wang, S., Liang, B., Viollet, B., & Zou, M.-H. (2011). Inhibition of the AMP-Activated Protein Kinase- α 2 Accentuates Agonist-Induced Vascular Smooth Muscle Contraction and High Blood Pressure in Mice. *Hypertension*, 57(5), 1010-1017. <https://doi.org/doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.168906>
- Wang, S., Song, P., & Zou, M.-H. (2012). AMP-activated protein kinase, stress responses and cardiovascular diseases. *Clinical science (London, England : 1979)*, 122(12), 555-573. <https://doi.org/10.1042/CS20110625>
- Wang, S., Xu, J., Song, P., Viollet, B., & Zou, M.-H. (2009). In vivo activation of AMP-activated protein kinase attenuates diabetes-enhanced degradation of GTP cyclohydrolase I. *Diabetes*, 58(8), 1893-1901. <https://doi.org/10.2337/db09-0267>
- Wang, S., Zhang, M., Liang, B., Xu, J., Xie, Z., Liu, C., Viollet, B., Yan, D., & Zou, M. H. (2010). AMPK α 2 deletion causes aberrant expression and activation of NAD(P)H oxidase and consequent endothelial dysfunction in vivo: role of 26S proteasomes. *Circ Res*, 106(6), 1117-1128. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.212530>
- Weikel, K. A., Cacicedo, J. M., Ruderman, N. B., & Ido, Y. (2015). Glucose and palmitate uncouple AMPK from autophagy in human aortic endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 308(3), C249-C263. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00265.2014>
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 112(12), 1796-1808. <https://doi.org/10.1172/jci19246>
- Welsh, G. I., Hale, L. J., Eremina, V., Jeansson, M., Maezawa, Y., Lennon, R., Pons, D. A., Owen, R. J., Satchell, S. C., Miles, M. J., Caunt, C. J., McArdle, C. A., Pavenstädt, H., Tavaré,

BIBLIOGRAFÍA

- J. M., Herzenberg, A. M., Kahn, C. R., Mathieson, P. W., Quaggin, S. E., Saleem, M. A., & Coward, R. J. M. (2010). Insulin Signaling to the Glomerular Podocyte Is Critical for Normal Kidney Function. *Cell Metabolism*, 12(4), 329-340. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.08.015>
- Whaley-Connell, A., & Sowers, J. R. (2017). Obesity and kidney disease: from population to basic science and the search for new therapeutic targets. *Kidney International*, 92(2), 313-323. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.12.034>
- Wong, Aaron K. F., Howie, J., Petrie, John R., & Lang, Chim C. (2009). AMP-activated protein kinase pathway: a potential therapeutic target in cardiometabolic disease. *Clinical Science*, 116(8), 607-620. <https://doi.org/10.1042/cs20080066>
- Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S.-P., Momcilovic, M., Johnstone, S. R., Carlson, M., & Carling, D. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metabolism*, 2(1), 21-33. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.06.005>
- Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M., & Carling, D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol*, 13(22), 2004-2008. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.031>
- Wu, J. J., Quijano, C., Chen, E., Liu, H., Cao, L., Fergusson, M. M., Rovira, I. I., Gutkind, S., Daniels, M. P., Komatsu, M., & Finkel, T. (2009). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy. *Aging*, 1(4), 425-437. Retrieved 2009/04//, from
- Wu, S., & Zou, M. H. (2020). AMPK, mitochondrial function, and cardiovascular disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 1-34. <https://doi.org/10.3390/ijms21144987>
- Wu U, C. Y., Huang X, Liu J, Chen Z, Wang F, Xu J, Sheng L, Ding H. (2015). Protective effects of berberine on high fat-induced kidney damage by increasing serum adiponectin and promoting insulin sensitivity. *Int J Clin Exp Pathol*, 8(11), 14486-14492.
- Wunderlich, C. M., Hövelmeyer, N., & Wunderlich, F. T. (2013). Mechanisms of chronic JAK-STAT3-SOCS3 signaling in obesity. *JAK-STAT*, 2(2), e23878-e23878. <https://doi.org/10.4161/jkst.23878>
- Xie, Z., Dong, Y., Scholz, R., Neumann, D., & Zou, M.-H. (2008). Phosphorylation of LKB1 at serine 428 by protein kinase C-zeta is required for metformin-enhanced activation of the AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Circulation*, 117(7), 952-962. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.744490>
- Xie Z, D. Y., Zhang M, Cui MZ, Cohen RA, Riek U, Neumann D, Schlattner U, Zou MH. (2006). Activation of protein kinase C zeta by peroxynitrite regulates LKB1-dependent AMP-activated protein kinase in cultured endothelial cells. *J Biol Chem*, 281(10), 6366-6375. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511178200>
- Xie, Z., Zhang, J., Wu, J., Viollet, B., & Zou, M. H. (2008). Upregulation of mitochondrial uncoupling protein-2 by the AMP-activated protein kinase in endothelial cells attenuates oxidative stress in diabetes. *Diabetes*, 57(12), 3222-3230. <https://doi.org/10.2337/db08-0610>
- Xu MJ, S. P., Shirwany N, Liang B, Xing J, Viollet B, Wang X, Zhu Y, Zou MH. (2011). Impaired expression of uncoupling protein 2 causes defective postischemic angiogenesis in mice deficient in AMP-activated protein kinase α subunits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(8), 1757-1765. <https://doi.org/doi:10.1161/ATVBAHA.111.227991>
- Xu Q, S. L. (2010). Protective effects of AMP-activated protein kinase in the cardiovascular system. *J Cell Mol Med*, 14(11), 2604-2613. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01179.x>
- Yamahara, K., Kume, S., Koya, D., Tanaka, Y., Morita, Y., Chin-Kanasaki, M., Araki, H., Isshiki, K., Araki, S.-i., Haneda, M., Matsusaka, T., Kashiwagi, A., Maegawa, H., & Uzu, T. (2013). Obesity-Mediated Autophagy Insufficiency Exacerbates Proteinuria-induced Tubulointerstitial Lesions. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(11), 1769. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012111080>

BIBLIOGRAFÍA

- Yang, J., Zhou, R., & Ma, Z. (2019). Autophagy and Energy Metabolism. *Adv Exp Med Biol*, 1206, 329-357. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_16
- Yang, S., & Wang, J. (2015). Estrogen Activates AMP-Activated Protein Kinase in Human Endothelial Cells via ER β /Ca(2+)/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Kinase β Pathway. *Cell Biochem Biophys*, 72(3), 701-707. <https://doi.org/10.1007/s12013-015-0521-z>
- Young, L. H., Li, J., Baron, S. J., & Russell, R. R. (2005). AMP-Activated Protein Kinase: A Key Stress Signaling Pathway in the Heart. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 15(3), 110-118. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tcm.2005.04.005>
- Yu, L., Gong, B., Duan, W., Fan, C., Zhang, J., Li, Z., Xue, X., Xu, Y., Meng, D., Li, B., Zhang, M., Bin, Z., Jin, Z., Yu, S., Yang, Y., & Wang, H. (2017). Melatonin ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in type 1 diabetic rats by preserving mitochondrial function: role of AMPK-PGC-1 α -SIRT3 signaling. *Scientific Reports*, 7(1), 41337. <https://doi.org/10.1038/srep41337>
- Zhang, M., Dong, Y., Xu, J., Xie, Z., Wu, Y., Song, P., Guzman, M., Wu, J., & Zou, M.-H. (2008). Thromboxane Receptor Activates the AMP-Activated Protein Kinase in Vascular Smooth Muscle Cells via Hydrogen Peroxide. *Circulation Research*, 102(3), 328-337. <https://doi.org/doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.163253>
- Zhang, Q. J., McMillin, S. L., Tanner, J. M., Palionyte, M., Abel, E. D., & Symons, J. D. (2009). Endothelial nitric oxide synthase phosphorylation in treadmill-running mice: role of vascular signalling kinases. *J Physiol*, 587(Pt 15), 3911-3920. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172916>
- Zhang SQ, S. Y., Xu TH, Zhang XF, Liu YZ, Ma MJ, Wang LN, Yao L. (2014). Protective effect of metformin on renal injury of C57BL/6J mouse treated with high fat diet. *Pharmazie*, 69(12), 904-908.
- Zhang, Y., Chen, J., Zeng, Y., Huang, D., & Xu, Q. (2019). Involvement of AMPK activation in the inhibition of hepatic gluconeogenesis by *Ficus carica* leaf extract in diabetic mice and HepG2 cells. *Biomed Pharmacother*, 109, 188-194. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.077>
- Zhang, Y., Lee, T. S., Kolb, E. M., Sun, K., Lu, X., Sladek, F. M., Kassab, G. S., Garland, T., Jr., & Shyy, J. Y. (2006). AMP-activated protein kinase is involved in endothelial NO synthase activation in response to shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(6), 1281-1287. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000221230.08596.98>
- Zhang, Y., Qiu, J., Wang, X., Zhang, Y., & Xia, M. (2011). AMP-Activated Protein Kinase Suppresses Endothelial Cell Inflammation Through Phosphorylation of Transcriptional Coactivator p300. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(12), 2897-2908. <https://doi.org/doi:10.1161/ATVBAHA.111.237453>
- Zhao, L., Fu, Z., Wu, J., Aylor, K. W., Barrett, E. J., Cao, W., & Liu, Z. (2015). Globular adiponectin ameliorates metabolic insulin resistance via AMPK-mediated restoration of microvascular insulin responses. *The Journal of physiology*, 593, 4067-4079. <https://doi.org/10.1113/JP270371>
- Zhao, X., Zmijewski, J. W., Lorne, E., Liu, G., Park, Y.-J., Tsuruta, Y., & Abraham, E. (2008). Activation of AMPK attenuates neutrophil proinflammatory activity and decreases the severity of acute lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 295(3), L497-L504. <https://doi.org/10.1152/ajplung.90210.2008>
- Zheng, D., MacLean, P. S., Pohnert, S. C., Knight, J. B., Olson, A. L., Winder, W. W., & Dohm, G. L. (2001). Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. *J Appl Physiol* (1985), 91(3), 1073-1083. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.3.1073>
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J., & Moller, D. E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *Journal of Clinical Investigation*, 108(8), 1167-1174. <https://doi.org/10.1172/JCI200113505>
- Zippel, N., Loot, A. E., Stingl, H., Randriamboavonjy, V., Fleming, I. A.-O., & Fisslthaler, B. (2018). Endothelial AMP-Activated Kinase α 1 Phosphorylates eNOS on Thr495 and

BIBLIOGRAFÍA

- Decreases Endothelial NO Formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 2753. <https://doi.org/10.3390/ijms19092753>
- Zmijewski, J. W., Banerjee, S., Bae, H., Friggeri, A., Lazarowski, E. R., & Abraham, E. (2010). Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 285(43), 33154-33164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.143685>
- Zmijewski, J. W., Moellering, D. R., Goffe, C. L., Landar, A., Ramachandran, A., & Darley-Usmar, V. M. (2005). Oxidized LDL induces mitochondrially associated reactive oxygen/nitrogen species formation in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 289(2), H852-H861. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00015.2005>
- Zong, H., Ren, J. M., Young, L. H., Pypaert, M., Mu, J., Birnbaum, M. J., & Shulman, G. I. (2002). AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(25), 15983-15987. <https://doi.org/10.1073/pnas.252625599>
- Zou MH, H. X., Shi CM, Nagata D, Walsh K, Cohen RA. (2002). Modulation by peroxynitrite of Akt- and AMP-activated kinase-dependent Ser1179 phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 277(36), 32552-32557. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204512200>
- Zou MH, W. Y. (2008). AMP-activated protein kinase activation as a strategy for protecting vascular endothelial function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 35(5-6), 535-545. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04851.x>