



# Hipertensión y riesgo vascular

www.elsevier.es/hipertension



## COMUNICACIONES PÓSTER

# 21.<sup>a</sup> Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial

Valencia, 9-11 de marzo de 2016

## Investigación preclínica

### 1. NOR-1 (NR4A3) EN LA HIPERTROFIA CARDIACA: RESULTADOS EN UN MODELO ANIMAL QUE SOBRE-EXPRESA NOR-1 EN EL MIOCARDIO

I. Martí-Pàmies<sup>1</sup>, M. Galán<sup>1</sup>, L. Cañes<sup>1</sup>, A. de Diego<sup>2</sup>, M.A. Navarro<sup>3</sup>, J. Osada<sup>3</sup>, C. Rodríguez<sup>1</sup> y J. Martínez-González<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC), IIB-Sant Pau, Barcelona. <sup>2</sup>Unidad de Transgénesis, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza. <sup>3</sup>Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, CIBEROBN, Zaragoza.

**Objetivo:** NOR-1 (*Neuron-derived Orphan Receptor-1*, NR4A3) es un factor de transcripción perteneciente a la familia NR4A de receptores nucleares huérfanos (que carecen de ligando o cuyo ligando se desconoce). La actividad de NOR-1 depende fundamentalmente de sus niveles de expresión, que aumentan en respuesta a diferentes estímulos. En los últimos años nuestro grupo ha evidenciado el papel de NOR-1 en la activación de las células musculares lisas vasculares expuestas a estímulos pro-aterogénicos. NOR-1 también se expresa en el corazón; sin embargo, actualmente se desconoce su papel en la función cardíaca y hasta el momento se han identificado pocos genes regulados por NOR-1 a nivel cardiovascular. Nuestro objetivo fue desarrollar un modelo animal que sobre-expresase NOR-1 en el miocardio para estudiar el papel de este receptor nuclear en la función cardíaca y en la hipertrofia miocárdica.

**Métodos:** Se generó una construcción, en la que la secuencia codificante del receptor NOR-1 humano (hNOR-1) se situó bajo el control del promotor CAG, que se utilizó para desarrollar una línea de ratones transgénicos (Tg-hNOR-1). En estos ratones se indujo hipertrofia cardíaca utilizando el modelo de infusión de angiotensina II (Ang II, 1.000 ng/kg/min, 4 semanas) mediante la implantación de minibombas osmóticas (ALZET, modelo 1004). La hipertrofia cardíaca se estimó mediante la relación peso corazón/peso total del animal. La función cardíaca se analizó mediante ultrasonografía (VEVO 2100, Visualsonics) a los 14 y 28 días, y se registró la presión arterial semanalmente. Mediante PCR a tiempo real se determinó la expresión de marcadores de hipertrofia cardíaca. El tamaño de

los miocardiocitos se cuantificó en cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina (programa *Image J*), y el grado de fibrosis se analizó mediante tinción con rojo sirio.

**Resultados:** Se ha generado una línea de ratones transgénicos que sobre-expresan NOR-1 preferentemente en el corazón. No se observaron cambios significativos en los niveles de presión arterial entre animales Tg-hNOR-1 y sus hermanos controles infundidos con AngII, sin embargo, la hipertrofia cardíaca inducida por la Ang II fue superior en los animales Tg-hNOR-1. Los animales Tg-hNOR-1 también presentan miocardiocitos de mayor tamaño, así como mayores niveles de expresión de los marcadores de hipertrofia cardíaca (*Bnp1*, *Acta1*, *Myh7*) y de fibrosis miocárdica. Finalmente, el análisis ecocardiográfico evidenció diferencias significativas en parámetros de la función sistólica como la fracción de eyección, la fracción de acortamiento y el volumen de eyección.

**Conclusiones:** Se ha generado un nuevo modelo animal que presenta mayor susceptibilidad a desarrollar hipertrofia cardíaca en respuesta a la infusión de Ang II. Los resultados sugieren que NOR-1 puede jugar un papel importante en la hipertrofia cardíaca. Además, este modelo animal podría ser útil para el estudio de la fisiopatología de la hipertrofia cardíaca y/o para la evaluación pre-clínica de potenciales tratamientos farmacológicos.

### 2. EL BLOQUEO GÉNICO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL TEJIDO CONECTIVO (CTGF/CCN2) IN VIVO ES CAPAZ DE MODULAR LA APOPTOSIS ASÍ COMO LA INFLAMACIÓN RENAL EN UN MODELO DE FRACASO RENAL AGUDO

J.L. Morgado Pascual<sup>1</sup>, S. Rayego Mateos<sup>1</sup>, A. Alonso Calleja<sup>1</sup>, R. Goldschmeding<sup>2</sup>, A.B. Sanz Bartolomé<sup>3</sup>, A. Ortiz Arduan<sup>3</sup>, J. Egido de los Ríos<sup>3</sup> y M. Ruiz Ortega<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Celular en Enfermedades Renales, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid. <sup>2</sup>Departamento de Patología, Centro Universitario Médico de Utrecht, Holanda. <sup>3</sup>IIS-Fundación Jiménez Díaz-UAM/IRSIN, Madrid.

**Objetivo:** El fracaso renal agudo (FRA) y la enfermedad renal crónica (ERC) son las formas más relevantes de la patología renal. Ambos procesos están asociados a una inflamación intersticial y

daño tubular que pueden conducir a una insuficiencia renal terminal. El FRA se caracteriza por una pérdida temprana de la función renal caracterizada por una primera fase de muerte de las células tubulares, seguido de una fase de regeneración celular. Los enfermos con FRA presentan un aumento del riesgo de mortalidad a corto/largo plazo así como riesgo de progresión hacia ERC. Existen diferentes factores que participan en la progresión de la ERC, entre los que destaca el factor de tejido conectivo (CFTG/CCN2). Históricamente CCN2 se ha considerado como un factor profibrótico; sin embargo, estudios actuales han catalogado a CCN2 como un factor multifuncional capaz de regular procesos inflamatorios, angiogénesis, migración, adhesión, así como apoptosis. En diversas ERC experimentales y humanas, incluida la nefropatía diabética, se ha sugerido que CCN2 podría ser un mediador del daño y potencial diana terapéutica, sin embargo no hay datos en FRA.

**Métodos:** La participación de CCN2 en el FRA *in vivo* fue estudiado en el modelo de administración sistémica de ácido fólico utilizando un ratón condicional deficiente para CCN2. La delección génica de CCN2 se obtuvo mediante inyección de tamoxifeno comparándolo con el grupo control inyectado con el vehículo (aceite de maíz). Los ratones se dividieron en dos grupos adicionales que recibieron una inyección intraperitoneal de ácido fólico (250 mg/kg/día) o vehículo, y el daño renal fue evaluado 48 horas después. Los estudios *in vitro* se realizaron en células tubulares murinas (MCT).

**Resultados:** En el modelo de FRA inducido por ácido fólico, el bloqueo génico de CCN2 disminuyó la expresión renal de marcadores de daño renal (KIM-1 y NGAL), lo que sugiere que CCN2 podría participar en la patogenia de este modelo. En respuesta al daño por ácido fólico se produce una respuesta inflamatoria aguda. En los ratones deficientes en CCN2 observamos una menor respuesta inflamatoria renal, determinada por la disminución de infiltrado inflamatorio y expresión de genes proinflamatorios (MCP-1; RANTES). Una de las principales características del daño por ácido fólico es la inducción de apoptosis. En los ratones delecionados para CCN2 se observó una disminución significativa de células apoptóticas, determinada por la técnica de TUNEL. En estudios *in vitro* observamos que en células tubulares expuestas a un ambiente proapoptótico el bloqueo del CCN2 endógeno, mediante un oligonucleótido antisentido, restauró la viabilidad celular.

**Conclusiones:** Nuestros resultados muestran que CCN2 es un mediador de procesos inflamatorios y de apoptosis en el modelo de daño renal por ácido fólico, lo que sugiere que podría ser una nueva diana terapéutica para el FRA.

### 3. EFECTO DEL EJERCICIO SOBRE LOS FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL REMODELADO Y LA BIOGÉNESIS MITOCONDRIAL EN EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO DE RATAS. RELEVANCIA DEL SISTEMA OMA1/OPA1

M. Klett-Mingo<sup>1</sup>, S. Ballesteros<sup>1</sup>, B. Martín-Fernández<sup>1</sup>, A. Galiana-Simal<sup>1</sup>, M.B. Ruiz-Rosso<sup>1</sup>, E. Olivares-Álvarez<sup>1</sup>, E. Sastre<sup>2</sup>, J. Blanco-Rivero<sup>2</sup>, V. Lahera<sup>1</sup> y N. de las Heras<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid. <sup>2</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma, Madrid.

**Objetivo:** El objetivo del estudio fue evaluar los efectos del ejercicio físico crónico sobre los factores que intervienen en la biogénesis mitocondrial y en la regulación del remodelado mitocondrial (sistema OMA1/OPA1) del tejido adiposo blanco (TAB) en ratas.

**Métodos:** Se utilizaron ratas macho Wistar (330 ± 10 g; n = 20) divididas en dos grupos: 1) grupo Control y 2) grupo Entrenamiento. El entrenamiento se realizó en un tapiz rodante, 50 minutos al día, 5 días a la semana, durante 8 semanas, a una velocidad máxima de

20 m/min. Al finalizar el periodo de evolución se determinaron las concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina, colesterol total y triglicéridos. Se valoró la actividad citrato sintasa en el sóleo, para confirmar la eficacia del ejercicio. Se evaluó mediante western blot la expresión proteica en TAB de: OMA1, metaloproteasa independiente de ATP; L-OPA1, proteína que estimula la fusión mitocondrial; S-OPA1, proteína que estimula la fisión mitocondrial; SIRT1, sirtuina 1; AMPK, proteína kinasa activada por AMP; PGC1 $\alpha$ , proteína 1 $\alpha$  coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas; PPAR $\gamma$ , receptor  $\gamma$  activado por proliferadores peroxisomales; GLUT-4, transportador de glucosa 4; NRF1, factor nuclear 1 de la respiración; TFAM, factor de transcripción mitocondrial A; CPT II, carnitina palmitoil-transferasa II; cadena  $\alpha$  de la ATP sintasa mitocondrial; y UCP1, proteína desacoplante 1.

**Resultados:** El ejercicio físico redujo el peso corporal final, el peso del TAB y los niveles plasmáticos de insulina. La actividad citrato sintasa en el sóleo aumentó en los animales entrenados. La expresión proteica en TAB de OMA1 y S-OPA1 aumentó en ratas entrenadas respecto a las control, sin modificar la expresión de L-OPA1. El ejercicio físico aumentó la expresión proteica de SIRT1, AMPK, PGC1 $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y GLUT-4 en TAB. La expresión de NRF1 y TFAM, fue mayor en ratas entrenadas respecto a las ratas control. Además, el entrenamiento aumentó la expresión de CPT II y de la ATP sintasa en TAB, sin modificar la expresión de UCP-1 respecto a las ratas control.

**Conclusiones:** El presente estudio demuestra, por primera vez, la implicación del sistema OMA1/OPA1 en la adaptación metabólica del TAB al ejercicio físico. Las proteínas de la cascada de señalización de PGC1 $\alpha$ , factores implicados en la biogénesis mitocondrial (NRF1 y TFAM) y en la producción de energía (CPT II y ATP sintasa), parecen ser también mediadores en este proceso de adaptación en el TAB. Por lo tanto, se podría proponer que el ejercicio físico en ratas se asocia con un sistema de control de calidad y biogénesis mitocondrial eficiente en el TAB.

### 4. LA ADMINISTRACIÓN DE ALDOSTERONA EN RATAS INDUCE FIBROSIS RENAL Y UNA RESPUESTA INFLAMATORIA ASOCIADA A MACRÓFAGOS TIPO 1 MEDIANTE LA ACTIVACIÓN DE RECEPTORES MINERALOCORTICOIDES

A. Rubio-Navarro<sup>1</sup>, B. Martín-Fernández<sup>2</sup>, S. Ballesteros<sup>2</sup>, E. Olivares-Álvarez<sup>2</sup>, J. Egido<sup>1</sup>, N. de las Heras<sup>2</sup>, V. Lahera<sup>2</sup> y J.A. Moreno<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Nefrología Experimental, Vasculares y Diabetes, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma, Madrid.

<sup>2</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

**Objetivo:** Nuestro objetivo fue evaluar la heterogeneidad de los distintos subtipos de macrófagos, así como las alteraciones estructurales, funcionales e inflamatorias en riñones de ratas a las que se les administró aldosterona y agua con alto contenido en sal. También se analizaron los efectos del tratamiento con espironolactona sobre los parámetros anteriores.

**Métodos:** Ratas Wistar machos recibieron aldosterona (1 mgkg<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>) + 1% de NaCl durante 3 semanas. La mitad de los animales fueron tratados con espironolactona (200 mgkg<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>).

**Resultados:** La presión arterial sistólica y diastólica fue mayor en aquellas ratas tratadas con aldosterona + sal (p < 0,05). El Peso relativo del riñón, el contenido de colágeno, fibronectina, infiltrado de macrófagos, CTGF, Col I, MMP2, TNF- $\alpha$ , CD68, Arg2 y SGK-1 se incrementaron (p < 0,05) en las ratas tratadas con aldosterona + sal (p < 0,05), mientras que estos efectos se reducían en el grupo de ratas tratado con espironolactona (p < 0,05). Además, encontramos un aumento de la expresión génica de iNOS y IFN- $\gamma$  (marcadores de macrófagos M1) en las ratas tratadas con aldosterona + sal (p <

0,05), mientras que no se observaron diferencias significativas en la expresión génica de IL-10 y el gen Arg1, ni a nivel proteico de ED2 (marcadores de macrófagos M2). Todos estos cambios fueron bloqueados con el tratamiento con espinolactona.

**Conclusiones:** La administración de aldosterona + sal produce un incremento en la respuesta inflamatoria asociada a fenotipo de macrófagos M1, así como un incremento de la fibrosis renal, a través de la activación de receptores de mineralocorticoides.

## 5. EFECTO DEL ACEITE DE ACEBUCHES SOBRE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE SISTÉMICA

C.M. Vázquez Cueto<sup>1</sup>, M.V. Ruiz Armenta<sup>1</sup>, A.J. Blanca Lobato<sup>1</sup>, J.L. Miguel Carrasco<sup>1</sup>, M.C. Pérez Camino<sup>3</sup>, E. Burgos Morón<sup>4</sup>, M. López Lázaro<sup>4</sup> y A. Mate Barrero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. <sup>2</sup>Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Sevilla.

<sup>3</sup>Instituto de la Grasa (CSIC), Sevilla. <sup>4</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.

**Objetivo:** El fruto del olivo silvestre o acebuches (*Olea europaea*, var. *sylvestris*), denominado acebuchina, es una drupa pequeña y poco carnosa de la cual se obtiene el aceite de acebuches. Este aceite posee unas propiedades particulares, con una pureza y calidad notablemente superiores a las del aceite de oliva, aunque también es sensiblemente superior su precio en el mercado. A pesar de las numerosas publicaciones existentes sobre la composición química y efectos farmacológicos de las hojas y aceite del olivo cultivado, existen pocos datos sobre los posibles constituyentes químicos del aceite de acebuches, así como de sus efectos saludables. El objetivo de este trabajo es determinar la composición química del aceite de acebuches y estudiar sus propiedades antioxidantes, utilizando para ello ratas normotensas y ratas con hipertensión arterial inducida mediante la administración de L-NAME.

**Métodos:** Para llevar a cabo este estudio utilizamos 4 grupos de ratas: 1) ratas Wistar sometidas a una dieta base estándar (grupo Control); ratas Wistar tratadas durante 12 semanas con una dieta base enriquecida con un 15% de aceite de acebuches; ratas Wistar tratadas durante 12 semanas con 20 mg de L-NAME por kg de peso y día (20 mg/kg/día) disuelto en el agua de bebida (grupo L-NAME); y ratas Wistar tratadas durante 12 semanas con una dieta base enriquecida con un 15% de aceite de acebuches + 20 mg/kg/día de L-NAME (grupo L-NAME + Acebuches). La composición química del aceite de acebuches se determinó mediante cromatografía gaseosa y líquida. Durante las 12 semanas de tratamiento se realizaron medidas semanales del peso de los animales y de la presión arterial sistólica. Al finalizar el tratamiento, los animales se sacrificaron y se procedió a la extracción de sangre por punción cardiaca. Las actividades de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD) se determinaron mediante la utilización de kit comerciales suministrados por las casas Cayman Chemical Company y Randox Laboratories Ltd.

**Resultados:** Los resultados mostraron un alto nivel de ácido oleico y de ácidos triterpénicos (maslínico y oleanólico) junto con eritrodíol, en el aceite de acebuches estudiado. El aceite de acebuches disminuyó la presión arterial sistólica en las ratas hipertensas, sin observarse diferencias significativas en el peso de los animales al final del tratamiento. El estudio de las enzimas antioxidantes a nivel sistémico indica una disminución significativa en las tres enzimas estudiadas en las ratas tratadas con L-NAME, disminución que fue corregida tras la administración simultánea de aceite de acebuches. Por otro lado, no se observó ninguna modificación en los parámetros estudiados entre las ratas controles y las ratas normotensas tratadas con aceite de acebuches.

**Conclusiones:** El aceite de acebuches muestra una acción antihipertensiva que se acompaña por una mejora en las actividades de las enzimas antioxidantes GPx, GR y SOD, lo que sugiere su posible efecto beneficioso en enfermedades cardiovasculares.

## 6. ALTOS NIVELES DE AMINOÁCIDOS ALIFÁTICOS DE CADENA RAMIFICADA CIRCULANTES EN DIABETES PUEDEN CAUSAR BAJO GRADO DE INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO

O. Zhenyukh<sup>1</sup>, E. Civantos Martín<sup>1</sup>, E. Bosch Panadero<sup>1</sup>, C. Peiró Vallejo<sup>2</sup>, J. Egido de los Ríos<sup>1</sup> y S. Mas Fontao<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Nefrología, Patología Vasculosa y Diabetes, ISS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid. <sup>2</sup>Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

**Introducción:** Los aminoácidos alifáticos de cadena ramificada circulantes (o los también llamados BCAA), recientemente se han propuesto como biomarcadores predictivos de DMT2. BCAA son tres aminoácidos esenciales: leucina, isoleucina y valina que componen casi la tercera parte de los músculos esqueléticos del cuerpo humano y juegan un papel importante en la síntesis de proteínas. Diferentes estudios sobre el perfil de metabólico de los obesos vs sanos han descrito un aumento de catabolismo de BCAA y presencia en sangre de estos pacientes y su correlación con la resistencia de insulina, así como una bajada de peso en estos pacientes mejora la sensibilidad su insulina.

**Objetivo:** Investigar si los altos niveles BCAA puedan tener alguna consecuencia patológica en las células mononucleares circulantes (PBMCs) de donantes sanos y estudiar las vías señalización implicadas.

**Métodos:** Se hizo el cultivo de células mononuclear de sangre periférica (PBMCs) de donantes sanos y se estimularon con 10 mM de BCAA a diferentes tiempos para hacer las siguientes determinaciones: western blot, qRT-PCR, actividad de NADPH oxidasa, mitoxox, inmunocitoquímica, ensayo de DNA binding, ensayo de la migración celular por transwell.

**Resultados:** Los BCAA a altas concentraciones (10 mM) actúan principalmente a través de los sensores nutricionales mTOR y AMPK a tiempo cortos. Asimismo, al estudiar el eje PI3K/Akt/mTOR se observó fosforilación de Akt y mTORC1 en presencia de los inductores de AMPK, dando lugar a una disminución de la activación de estas vías lo que sugiere que AMPK actuaría sobre mTORC1. Por otro lado, BCAA inducen el estrés oxidativo mitocondrial y la activación de la actividad NADPH, así como la inflamación mediante la activación de vía canónica de NF-κB y los genes inflamatorios derivados de ella.

**Conclusiones:** Estos datos sugieren que una exposición continua a concentraciones patológicas de BCAA podría causar un estatus pro-inflamatorio que conduciría a un aumento de migración y adhesión que contribuiría a las complicaciones producidas en la obesidad y la diabetes.

## 7. PAPEL IN VIVO DE TLR4 EN LA NEFROTOXICIDAD MEDIADA POR CICLOSPORINA-A

C. González Guerrero, R. Rodríguez Díez, P. Cannata Ortiz, M. Ruiz Ortega, A. Ortiz Arduan y A.M. Ramos Cortassa

Instituto Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

La ciclosporina-A (CsA) es un fármaco fundamental en la inmunosupresión de trasplantes alogénicos. Sin embargo, el uso crónico de CsA produce efectos deletéreos, entre los que destaca principalmente la nefrotoxicidad. Esta es causa principal de la nefropatía

crónica del trasplante, disminución progresiva de la función renal, fibrosis y la consecuente pérdida del injerto. Se han descrito numerosos procesos patogénicos subyacentes a la nefrotoxicidad, sin embargo el papel de la inflamación y sus mecanismos permanecen poco estudiados. El receptor TLR4 es un importante mediador de respuestas de la inmunidad innata y del daño renal. Estudios previos destacan aumentos de expresión de TLR4 en la nefrotoxicidad experimental por CsA y en el tejido renal de pacientes tratados con CsA. Además, recientemente demostramos que el bloqueo *in vitro* de TLR4 en células tubulares, inhibe señales proinflamatorias (JAK2, JNK, I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B) y la síntesis de citoquinas proinflamatorias inducida por CsA. En este estudio, nuestro propósito fue investigar el rol funcional de TLR4 en un modelo de nefrotoxicidad experimental *in vivo* por administración de CsA con intervención terapéutica mediante un fármaco inhibidor de TLR4 (TAK242) y en ratones TLR4<sup>-/-</sup>. La CsA (50 mg/kg/día, sc) se administró a ratones C57BL/6 WT o TLR4<sup>-/-</sup> de 12 semanas durante 10 días. Otro grupo fue tratado con TAK242 (3 mg/kg/día, ip) y CsA. Se añadió al estudio un grupo TLR4<sup>-/-</sup> tratado con CsA durante 20 días. El grupo control no recibió tratamiento. A punto final, los ratones fueron sacrificados y los riñones analizados. En los riñones de los ratones tratados con CsA se observó por inmunofluorescencia aumento de la expresión tubular y glomerular de TLR4 y por PCR cuantitativa aumentos transcripcionales de proteínas de la vía de TLR4 (TLR4, Myd88). El incremento de la síntesis de citoquinas proinflamatorias (MCP-1, Rantes, IP-10, ICAM, VCAM) y del infiltrado inflamatorio de células mononucleares y linfocitos-T (inmunohistoquímica de F4/80 y CD3, respectivamente) inducidos por CsA, se inhibió en los ratones WT tratados con TAK242 o en los ratones TLR4<sup>-/-</sup>. Además, la inhibición farmacológica de TLR4 o la ausencia del mismo, previno el daño tubular evaluado mediante la síntesis génica de KIM-1 y NGAL, y la fibrosis tubulointersticial evaluada por la síntesis de genes profibróticos (TGF $\beta$ , FN1 y COL1) y por la deposición de colágeno I (tinción de rojo sirio). Los cambios bioquímicos inducidos por CsA se correlacionaron con daño estructural caracterizado por dilatación tubular, vacuolización, pérdida de celularidad y picnosis (tinción con hematoxilina/eosina), y por la pérdida de función renal evidenciada por aumentos significativos de la urea plasmática. Estos efectos fueron también revertidos por el tratamiento con TAK242 y en los ratones TLR4<sup>-/-</sup>. Los resultados sugieren que TLR4 es un mediador principal de la inflamación, daño tubular y fibrosis propios de la nefrotoxicidad por CsA y por lo tanto, susceptible de intervención farmacológica para la mejora de la terapia inmunosupresora del trasplante.

## 8. LAS PLAQUETAS GENERADAS DE NOVO EN PRESENCIA DE ASPIRINA LIBERAN MAYOR CANTIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO. ESTUDIO IN VITRO

J. Modrego<sup>1</sup>, J.J. Zamorano-León<sup>2</sup>, P. Rodríguez-Sierra<sup>1</sup>, B. Sopena González-Aller<sup>2</sup>, B. Valero de Bernabé-Calle<sup>2</sup>, M.A. García-Fernández<sup>2</sup>, V. Lahera<sup>3</sup> y A.J. López-Farré<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid. <sup>2</sup>Aula AINTEC, Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid. <sup>3</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

**Introducción:** Estudios previos de nuestro grupo han sugerido que las plaquetas resistentes a aspirina tienen limitada la capacidad de producción de óxido nítrico, lo que abrió la hipótesis de que la aspirina podría modular el tipo de plaqueta generada desde el megacariocito.

**Objetivo:** El propósito del estudio fue determinar si la presencia de aspirina en un cultivo celular establecido de megacariocitos humanos, puede alterar la capacidad de generación de óxido nítrico en las plaquetas generadas *de novo*.

**Métodos:** Los experimentos se realizaron con la línea celular megacarioblástica humana MEG-01, la cual libera plaquetas con características similares a las humanas. El cultivo MEG-01 se incubó con 10 nmol/L de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), para inducir la maduración de megacarioblastos a megacariocitos y estimular la formación de plaquetas. El PMA se coincubó en ausencia (n = 6) o presencia (n = 6) de aspirina (0,33 mmol/L) durante 72 horas. Tras este tiempo, las plaquetas se separan de los megacariocitos por centrifugaciones secuenciales.

**Resultados:** Las plaquetas generadas por megacariocitos incubadas con aspirina (0,33 mmol/L) liberaron más nitritos + nitratos (CT: 17,82  $\pm$  2,82; ASA: 33,31  $\pm$  3,95  $\mu$ mol/L) mientras que no hubo diferencias significativas en el contenido de tromboxano A2 (TXA2) en ambos grupos experimentales (CT: 11,83  $\pm$  5,70; ASA: 12,57  $\pm$  1,22 pg/mL). Además, en cuanto a la expresión de proteínas, las plaquetas generadas desde MEG-01 incubadas con aspirina contenían más óxido nítrico sintasa tipo 3 (NOS3) que las plaquetas incubadas en ausencia de aspirina (CT: 35,27  $\pm$  7,35; ASA: 47,92  $\pm$  8,05 UA), sin embargo, no hubo diferencias respecto al contenido de ciclooxigenasa-1 (COX-1) entre ambos grupos (CT: 168,08  $\pm$  29,35; ASA: 153,45  $\pm$  25,93 UA).

**Conclusiones:** La presencia de aspirina puede determinar que las plaquetas generadas *de novo* desde los megacariocitos tengan una mayor capacidad de generar óxido nítrico debido a una expresión mayor de NOS3 sin modificaciones en la expresión de COX-1 ni en su actividad.

## 9. NIVELES DE MICRORNAS Y FUNCIONALIDAD DE LA HDL EN PACIENTES CON VIH

A. Ortega-Hernández<sup>1</sup>, V. Estrada<sup>1</sup>, M. Heras<sup>2</sup>, L. Masana<sup>2</sup> y D. Gómez-Garre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hospital Clínico San Carlos, Madrid. <sup>2</sup>Universitat Rovira i Virgili, IISPV, Reus.

**Introducción:** Numerosos estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que el colesterol HDL (c-HDL) se asocia inversamente con la enfermedad cardiovascular. Aunque su principal función es el transporte reverso de colesterol, en los últimos años se ha demostrado la existencia de funciones pleiotrópicas asociadas al papel protector del c-HDL que incluyen efectos anti-oxidantes, anti-inflamatorios, anti-trombóticos y vasodilatadores. Las partículas de c-HDL son moléculas muy heterogéneas en su contenido en lípidos y apolipoproteínas, lo cual se ha asociado con sus distintas actividades biológicas. Recientemente se ha demostrado que estas partículas de HDL pueden transportar microRNAs (miRNAs) tanto en situaciones fisiológicas como patológicas, incluyendo la enfermedad cardiovascular. Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificante implicados en la regulación post-translacional de numerosas funciones celulares. Es bien conocido que la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) altera el patrón de expresión de los miRNAs del hospedador. Sin embargo, a día de hoy no se conoce si las HDL de los pacientes VIH transportan miRNAs y cuál sería su implicación en los efectos anti-aterogénicos del c-HDL. Por tanto, el objetivo de nuestro trabajo ha sido estudiar los niveles de algunos miRNAs implicados en el metabolismo del colesterol y en la inflamación unidos a las partículas de HDL de pacientes con VIH y su asociación con la capacidad anti-aterogénica del c-HDL.

**Métodos:** Hemos aislado las HDL de 13 pacientes VIH (51  $\pm$  10 años) procedentes de la consulta de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínico San Carlos y de 7 sujetos sin infección (41  $\pm$  9 años) mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad. La cuantificación de los miRNAs se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real. La actividad anti-inflamatoria de la HDL se evaluó por su habilidad para inhibir la quimiotaxis de monocitos inducida con

MCP-1. Las subclases de partículas HDL (HDLp) se cuantificaron mediante resonancia magnética.

**Resultados:** Nuestra muestra de pacientes es representativa de una cohorte de 300 pacientes. En comparación con las HDL aisladas de los sujetos sin infección, las HDL de los pacientes presentaban 2-, 2-, 4-, 2- y 36-veces más cantidad de miR-33a, miR-33b, miR-126, miR-144 y miR-223 respectivamente (todos  $p < 0,05$ ). Las HDL aisladas de los pacientes fueron menos capaces de inhibir la migración de los monocitos que las de los sujetos sin infección (70 vs 51% células migradas), lo que demuestra una peor capacidad anti-inflamatoria. Respecto a la concentración plasmática de las distintas HDLp, los pacientes VIH mostraron menor cantidad de HDLp grandes y medianas que los sujetos sin infección (HDLp grandes:  $5,1 \pm 0,1$  vs  $8,3 \pm 1,2$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0,05$ ; HDLp medianas:  $11,7 \pm 0,4$  vs  $18,5 \pm 2,5$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0,05$ ). Por el contrario, los niveles de HDLp pequeñas eran significativamente mayores en los pacientes que en controles ( $15,2 \pm 0,3$  vs  $12,4 \pm 0,9$   $\text{mmol/mL}$ ,  $p < 0,05$ ).

**Conclusiones:** Las HDLp aisladas de pacientes con infección VIH transportan más cantidad de miRNAs relacionados con la inflamación y el metabolismo lipídico a la vez que presentan una alteración de su función anti-inflamatoria y de su capacidad para transportar colesterol. Cómo estos miRNAs pueden participar en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis en los pacientes con VIH merece ser estudiada.

## 10. LAS PROANTOCIANIDINAS PREVIENEN EL AUMENTO DEPENDIENTE DE ALDOSTERONA DE GAMMA ENAC Y LA INACTIVACIÓN DE NEDD4-2 VÍA SGK1 EN CORAZÓN DE RATAS

A. Galiana-Simal, B. Ruiz-Roso, M. Klett-Mingo, E. Olivares-Álvarez, S. Ballesteros, N. de las Heras, V. Lahera y B. Martín-Fernández

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.*

**Objetivo:** La aldosterona está implicada en las alteraciones cardiovasculares relacionadas con el desequilibrio iónico de sodio. Las proantocianidinas (PACs) tienen un efecto cardioprotector que podría deberse al bloqueo del receptor de mineralocorticoides (RM). En este trabajo, se estudiaron los efectos de las PACs sobre la quinasa activada por suero y glucocorticoides (SGK1), el canal epitelial de sodio (ENaC), y la ubiquitina ligasa Nedd4-2, factores clave en la captación de sodio mediado por aldosterona.

**Métodos:** 32 ratas Wistar macho fueron distribuidas en 4 grupos: 1) Control; 2) Aldo: aldosterona (1,5 mg/kg/día s.c.) más 1% NaCl en el agua de bebida; 3) PRO80: PACs procedentes de un extracto de arándano rojo de riqueza al 80% (5 mg/kg/día); 4) Aldo + PRO80: aldosterona (1,5 mg/kg/día) más 1% NaCl junto con PRO80 (5 mg/kg/día de extracto). Tras 21 días, se midió la presión arterial diastólica (PAD) y sistólica (PAD), la frecuencia cardíaca (FC), la presión sistólica del ventrículo izquierdo (PSVI), la presión diastólica final del ventrículo izquierdo (pDfVI) y se calculó el peso relativo del corazón (PRC). Se tiñeron secciones histológicas de corazón con rojo sirio para determinar el contenido de colágeno. Se evaluó mediante western blot la expresión proteica cardíaca de: el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF); el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y el *cluster* de diferenciación 68 (CD68); la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa (p22phox); SGK1, las tres subunidades del ENaC ( $\alpha$ ENaC,  $\beta$ ENaC y  $\gamma$ ENaC) y Nedd4-2 total y su forma fosforilada en serina 436 (pNedd4-2).

**Resultados:** La PAS, PAD, PSVI y pDfVI y el PRC aumentaron en el grupo Aldo comparado con el grupo Control y disminuyeron en el grupo Aldo + PRO80 respecto del grupo Aldo. La FC no varió. El contenido de colágeno y la expresión del CTGF, TNF $\alpha$ , CD68 y p22phox fueron superiores en el grupo ALDO comparado con el grupo Control y se redujeron en el grupo Aldo + PRO80 respecto

del grupo Aldo. SGK1 y  $\gamma$ ENaC aumentaron en el grupo Aldo comparado con los controles y los valores se normalizaron en el grupo Aldo + PRO80 respecto del grupo Aldo.  $\alpha$ ENaC y  $\beta$ ENaC no variaron. Nedd4-2 total fue superior respecto del grupo Control en los grupos Aldo y Aldo + PRO80. Los niveles de pNedd4-2 fueron mayores en el grupo Aldo comparado con Control y se redujeron en el grupo Aldo + PRO80 respecto del grupo Aldo. La relación pNedd4-2/Nedd4-2 total, aumentó en el grupo Aldo respecto del grupo Control y disminuyó en el grupo Aldo + PRO80 comparado con el grupo Aldo.

**Conclusiones:** La aldosterona aumenta la expresión cardíaca de  $\gamma$ ENaC, lo que podría llevar a una mayor captación de sodio, relacionado con las alteraciones funcionales, estructurales y moleculares cardíacas observadas. PRO80 disminuye la sobre-expresión de SGK1 y  $\gamma$ ENaC mejorando la función cardíaca, postulando a las PACs como posibles antagonistas del RM.

## 11. EL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL TEJIDO CONECTIVO (CTGF/CCN2) INDUCE TRANSICIÓN EPITELIO MESENQUIMAL A TRAVÉS DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGFR) Y DEL FACTOR NUCLEAR KB

S. Rayego Mateos<sup>1</sup>, J.L. Morgado Pascual<sup>1</sup>, A. Ortiz Arduán<sup>2</sup>, J. Egido de los Ríos<sup>2</sup> y M. Ruiz Ortega<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Celular en Enfermedades Renales, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid. <sup>2</sup>IIS-Fundación Jiménez Díaz-UAM/IRSIN, Madrid.

**Objetivo:** El factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF/CCN2) participa en la fibrogénesis renal. La activación del EGFR puede desencadenar diferentes procesos celulares como la transición epitelio mesenquimal (TEM) en células tubuloepiteliales. Este proceso de TEM contribuye a la fibrosis renal al inducir la conversión de las células tubuloepiteliales a miofibroblastos productores de matriz extracelular. Estudios previos han demostrado que en células tubuloepiteliales en cultivo, CCN2 y su fragmento de degradación C-terminal (CCN2(IV)), induce TEM. Nuestro objetivo ha sido investigar los receptores y vías de señalización intracelulares implicadas en la TEM inducida por CCN2, con especial atención al EGFR y la vía de señalización del factor NF-kB.

**Métodos:** Los experimentos se efectuaron en células tubuloepiteliales renales humanas (línea celular HK2) y murinas (MCTs) analizando los resultados mediante distintas técnicas como Western blot y microscopía confocal.

**Resultados:** En células tubuloepiteliales de ratón se observó que el bloqueo de EGFR (mediante un inhibidor de la quinasa del receptor) revirtió la TEM inducida por CCN2 (IV), caracterizada por disminución de marcadores epiteliales, como e-cadherina y ZO-1, y a su vez una inducción de marcadores mesenquimales, como  $\alpha$ -actina de músculo liso. Recientemente hemos descrito un cross-talk entre EGFR y TrkA en respuesta a la estimulación con CCN2. La activación de la quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK 1/2) es un proceso clave en la inducción de TEM y previamente hemos descrito que se activa por CCN2/EGFR. El tratamiento con un inhibidor de ERK1/2 (U0126) inhibió la TEM causada por CCN2(IV), mostrando que la vía EGFR/ERK es un elemento fundamental en la TEM. NF-kB es un factor de transcripción que está implicado en la TEM. El tratamiento de las células con un inhibidor de la activación de la vía clásica de NF-kB, parthenolide, o de la vía alternativa, lactacistina, revirtió la TEM inducida por CCN2(IV). El bloqueo del EGFR inhibió la activación de ambas rutas (clásica y alternativa de NF-kB) activadas por CCN2.

**Conclusiones:** Nuestros resultados sugieren el papel clave de la activación del EGFR en proceso de TEM inducido por CCN2, y como el bloqueo de vías de señalización intracelulares como NF-kB y

ERK1/2 están asociados a la modulación de la TEM inducida por CCN2.

## 12. CTGF Y TGF- $\beta$ MODULAN DE MANERA OPUESTA LOS NIVELES DEL RECEPTOR TIPO II DE TGF- $\beta$ EN CMLVs

R. Rodrigues Díez<sup>1</sup>, M. Orejudo del Río<sup>1</sup>, R. Rodrigues Díez<sup>1</sup>, S. Rayego Mateos<sup>1</sup>, J.L. Morgado Pascual<sup>1</sup>, J. Egido de los Ríos<sup>1</sup>, R. Selgas Gutierrez<sup>2</sup> y M. Ruíz Ortega<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IISFJD), Madrid. <sup>2</sup>Unidad de Investigación, Servicio de Nefrología, Hospital Universitario La Paz, Madrid.

**Introducción:** Tradicionalmente el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF/CCN2) ha sido considerado como un mediador de las respuestas fibróticas inducidas por otros factores entre los que se encuentran endotelina 1 (ET-1), angiotensina II (Ang II) o el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Con respecto a este último, existen varios trabajos en los que se ha descrito la necesidad de una presencia conjunta tanto de TGF- $\beta$  como de CTGF en el mismo contexto celular para que tenga lugar una respuesta fibrótica persistente. Sin embargo, el mecanismo celular por el cual se necesitan ambos factores al mismo tiempo aún sigue siendo un punto a estudiar.

**Objetivo:** Teniendo en cuenta estos antecedentes y que la respuesta fibrótica está presente en numerosas patologías que afectan tanto a los vasos sanguíneos como al corazón, el propósito del siguiente estudio fue evaluar nuevos mecanismos de interacción entre el CTGF y el TGF- $\beta$  a nivel vascular.

**Métodos:** Para realizar estos estudios se utilizó una línea de células de músculo liso vascular (CMLVs) de ratón. En primer lugar se realizaron varios tratamientos con CTGF en CMLVs a tiempos largos en los que se determinaron los efectos del CTGF sobre los receptores tipo I y II de TGF- $\beta$  (TR-I y TR-II), así como sus efectos sobre diversos factores profibróticos. Posteriormente, se trataron las CMLVs a tiempos cortos con CTGF, tanto con la molécula completa como con el fragmento c-terminal (CTGFIV), para determinar si este factor era capaz de inducir directamente la activación de la ruta SMAD, ya que esta ruta es activada, entre otros, por TGF- $\beta$  y está implicada en la inducción de la respuesta fibrótica.

**Resultados:** Se comprobó que, mientras que el tratamiento durante 48h con TGF- $\beta$  inducía el aumento ya descrito en los niveles de CTGF, PAI-1, fibronectina o TGF- $\beta$  en CMLVs, el tratamiento con CTGF no generaba cambios en los niveles de estos genes. Sin embargo, se pudo determinar que el tratamiento con TGF- $\beta$  o con CTGF tenía efectos totalmente diferentes sobre los niveles del receptor tipo II de TGF- $\beta$ . Mientras que CTGF inducía un aumento significativo en los niveles de TR-II tras 48 horas de tratamiento, TGF- $\beta$  los disminuía de manera considerable en comparación con los niveles observados en las células en estado basal. Por otro lado se determinó que con ambos tratamientos los niveles del TR-I permanecían en valores similares a los basales. Los estudios a tiempos cortos mostraron un aumento en la activación de la ruta SMAD en las CMLVs tras el tratamiento con CTGF. Del mismo modo, tras 48 horas de tratamiento con CTGF, se observó que la ruta SMAD se mantenía activada.

**Conclusiones:** Estos datos sugieren que CTGF podría contribuir al mantenimiento en el tiempo de la activación de la ruta del TGF- $\beta$  gracias a la inducción de un aumento en la síntesis del TRII, de tal forma que sin su presencia TGF- $\beta$  terminaría por inhibir su propia activación mediante la bajada de los niveles de su propio receptor. Esta subida en los niveles de TR-II podría estar mediada por la activación de la ruta SMAD observada tras el tratamiento con CTGF, aunque serían necesarios estudios complementarios que confirmen esta hipótesis. Estos datos podrían explicar el porqué de la necesidad de la presencia de ambos factores al mismo tiempo para indu-

cir una fibrosis persistente, de tal forma que abren nuevas vías para el estudio y abordaje de diferentes procesos y patologías en los que la fibrosis, y en especial estos dos factores, juegan un papel esencial.

## 13. PAPEL DEL RECEPTOR TIPO TOLL 4 EN LA INFLAMACIÓN VASCULAR INDUCIDA POR CICLOSPORINA-A Y TACROLIMUS

R. Rodrigues Díez<sup>1</sup>, C. González-Guerrero<sup>1</sup>, A. Ortiz Arduan<sup>2</sup>, M. Ruíz Ortega<sup>3</sup> y A.M. Ramos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Nefrología, Patología Vascular, Hipertensión y Diabetes, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid. <sup>2</sup>Unidad de Diálisis, IIS-FJD, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid. <sup>3</sup>Laboratorio de Biología Celular en Enfermedad Renal, IIS-FJD, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

**Introducción y objetivo:** El tratamiento inmunosupresor con los inhibidores de calcineurina (ICs) ciclosporina-A (CsA) y tacrolimus (TAC) contribuye a la patología vascular del trasplante. El daño y disfunción endotelial que resulta en hipertensión sistémica constituyen rasgos distintivos de la toxicidad vascular por ICs. La patogénesis del daño vascular por ICs incluye la inducción de apoptosis, el estrés oxidativo, la activación de la ruta de TGF- $\beta$  y el bloqueo de la producción de óxido nítrico. Sin embargo, hasta el momento se desconoce si la inflamación puede jugar un papel en la toxicidad vascular por ICs. Estudios recientes demuestran que el receptor de tipo Toll 4 (TLR4) es un promotor de inflamación, disfunción e hipertensión vascular. No obstante, no existen datos sobre la participación de TLR4 como mediador de la patología vascular asociada al uso de ICs. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar si los ICs inducen inflamación vascular y el papel de TLR4 como mediador de esta respuesta.

**Métodos:** Para la consecución de este objetivo, se implementaron cultivos *ex vivo* de aorta murina provenientes de ratones WT y TLR4<sup>-/-</sup> y cultivos de las líneas murinas de endotelio (MS1) y de células de músculo liso vascular (VSMC). La estrategia experimental incluyó además la inhibición farmacológica de TLR4 con el inhibidor CLI-095. El tejido aórtico o las células MS1 y VSMC se estimularon con CsA y TAC, en presencia o ausencia de CLI-095. Al final del tratamiento se estudió i) la respuesta inflamatoria mediante la síntesis génica y proteica de citoquinas y marcadores de activación endotelial, ii) la activación de la ruta de NF- $\kappa$ B mediante la localización nuclear de la subunidad p65 por inmunofluorescencia iii) la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante detección con el fluorocromo dihidroetidio (DHE) y microscopía confocal.

**Resultados:** El tratamiento de aortas *ex vivo* con CsA y TAC indujo la producción de factores proinflamatorios, incluidos quimioquinas (CCL2, CCL5), citoquinas (TNF $\alpha$ ), interleuquinas (IL-6) y marcadores de activación endotelial (VCAM, ICAM), además de la síntesis del péptido vasopresor Endotelina-1. Por otra parte, ambos ICs indujeron la activación de NF- $\kappa$ B y la producción de ROS en aorta y en MS1. Los efectos proinflamatorios e inducidos por los ICs así como la activación de las vías de señalización mencionadas fueron inhibidos por el tratamiento con CLI-095, tanto en las aortas como en las células MS1 y VSMC. El análisis de las aortas provenientes de ratones TLR4<sup>-/-</sup> confirmó que la ausencia del receptor anula las respuestas proinflamatorias disparadas por CsA y TAC. Análisis complementarios en células MS1 mostraron que la inhibición de la producción de ROS con DPI y apocinina y de la activación de NF- $\kappa$ B con parthenolide bloquea la respuesta inflamatoria desencadenada por los ICs.

**Conclusiones:** En definitiva, estos resultados mostraron que las respuestas proinflamatorias promovidas por los ICs en el tejido vascular son moduladas a la baja por inhibición de TLR4. Así,

este receptor podría un mediador esencial de la toxicidad vascular de los ICs y su intervención terapéutica reviste potencial interés para la optimización de la terapia inmunosupresora del trasplante.

#### 14. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON PROANTOCIANIDINAS SOBRE LAS ALTERACIONES VASCULARES PRODUCIDAS POR LA ALDOSTERONA EN RATAS

E. Olivares-Álvarez, M.B. Ruíz-Roso, A. Galiana-Simal, M. Klett-Mingo, S. Ballesteros, N. de las Heras, B. Martín-Fernández y V. Lahera

Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

**Objetivo:** El objetivo del presente estudio fue valorar el efecto del tratamiento con un extracto rico en proantocianidinas al 80% (P80) sobre: 1) Las alteraciones vasculares morfológicas y moleculares producidas por la aldosterona en ratas, y 2) La expresión de mediadores de entrada de sodio al interior de la célula en aortas de ratas a las que se les administró aldosterona.

**Métodos:** Se utilizaron 32 ratas macho Wistar de  $\pm$  250 g, distribuidas en cuatro grupos: 1) grupo control (Control); 2) grupo con aldosterona (Aldo: inyección subcutánea diaria de 1,5 mg/kg/día de aldosterona más 1% NaCl en el agua de bebida); 3) grupo tratado con P80 (P80: 5 mg/kg/día de extracto en el agua de bebida); 4) grupo Aldo tratado con P80 (Aldo + P80: inyección subcutánea diaria de 1,5 mg/kg/día de aldosterona más 1% NaCl junto con 5 mg/kg/día de P80 en el agua de bebida). El periodo de evolución fue de 21 días. Al final del tratamiento se midió la presión arterial sistólica (PAS) por el método de "tail-cuff", el área y el contenido de colágeno de la lámina media de la aorta mediante técnicas histológicas y la expresión proteica mediante Western-Blot de: factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), subunidad p22phox, la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y su forma fosforilada (peNOS), SGK-1, subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de ENaC, la ubiquitina ligasa E3 (Nedd4-2) y su forma fosforilada (p-Nedd4-2).

**Resultados:** La PAS, el área de la lámina media y el contenido de colágeno de la aorta aumentaron en las ratas Aldo comparado con las ratas Control. La expresión proteica de  $TNF\alpha$ , CTGF, eNOS y la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa en la aorta, aumentó tras la administración de aldosterona respecto al grupo control. Sin embargo, la expresión de peNOS disminuyó en las ratas Aldo. En el grupo ALDO, la expresión de SGK1 y de las tres subunidades de ENaC  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  aumentó, y la expresión de Nedd4-2 y pNedd4-2 disminuyó comparado con el grupo Control. El tratamiento con P80 normalizó la PAS, el área de la lámina media y el contenido de colágeno de la aorta en las ratas Aldo. La expresión proteica de  $TNF\alpha$ , CTGF y la subunidad p22phox disminuyó en el grupo Aldo + P80 respecto al grupo Aldo. P80 aumentó la expresión vascular de eNOS y peNOS en el grupo Aldo + P80 en comparación con las ratas Aldo. El grupo de ratas Aldo+P80 presentó una disminución en los niveles de la expresión de SGK1 y las tres subunidades de ENaC,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , y un aumento de la expresión proteica de Nedd4-2 y pNedd4-2 en comparación al grupo Aldo.

**Conclusiones:** El tratamiento con P80 previene la hipertensión y mejora las alteraciones vasculares morfológicas y moleculares producidas por la aldosterona en ratas. P80 es capaz de disminuir la expresión de los mediadores de la entrada de sodio celular ENaC y pNedd4-2 en aortas de ratas a las que se les administró aldosterona. Como resultado, podría producirse una menor entrada de sodio al interior de la célula previniendo así el desarrollo de alteraciones vasculares como la fibrosis y la inflamación. Estos efectos parecen estar mediados por el bloqueo del receptor de mineralocorticoides.

#### 15. IMPLICACIÓN DE INTERLEUQUINA-17, LA CITOQUINA EFECTORA DE LA RESPUESTA TH17, EN EL DAÑO VASCULAR

M. Orejudo del Río<sup>1</sup>, A.B. García Redondo<sup>2</sup>, R. Rodríguez Díez<sup>1</sup>, R. Rodríguez Díez<sup>1</sup>, M. Salaces<sup>2</sup>, J. Egido<sup>1</sup>, A. Briones<sup>2</sup> y M. Ruiz Ortega<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IIS Fundación Jiménez Díaz, Madrid. <sup>2</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UAM, Madrid.

**Objetivo:** Muchos estudios sugieren que las células Th17 son altamente inflamatorias y que la IL-17, principal citoquina producida por estas células, regula diversas funciones celulares. IL-17 está involucrada en la patogénesis de enfermedades autoinmunes, como artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias del intestino y esclerosis múltiple. En los últimos años se ha descrito que la IL-17 también participa en enfermedades inflamatorias crónicas, incluida la aterosclerosis y la hipertensión. Nuestra hipótesis es que la activación de la respuesta inmune Th17 puede participar en la progresión del daño vascular.

**Métodos:** Se realizaron dos modelos experimentales en ratones macho C57Bl/6. El primero consistió en administrar mediante bombas osmóticas IL-17A durante 15 días a una dosis de 1,5 ng/g ratón. En segundo lugar, se realizó un bloqueo de la respuesta Th17 mediante un anticuerpo neutralizante de IL-17 (dosis de 100  $\mu$ g/ratón intraperitoneal cada 4 días) en un modelo de daño vascular inducido por administración de angiotensina II a la dosis de 100 ng/Kg/día (disuelta en salino), durante 15 días. Para los estudios *in vitro*, se utilizaron células de músculo liso vascular de ratón a una dosis de 10 ng/ml.

**Resultados:** La administración sistémica de IL-17A indujo un aumento de la tensión arterial a los 15 días con respecto a los ratones control ( $124 \pm 6$  vs  $86 \pm 2$ ,  $n = 5$ ,  $p \leq 0,05$ ). El análisis de la estructura y la mecánica de las arterias mesentéricas mostraron un aumento del grosor de la pared asociada a un incremento en el número de células de músculo liso vascular y de la capa adventicia, sin observarse cambios en la rigidez de las arterias tras la infusión con IL-17A. Además, en las aortas de estos ratones tratados con IL-17A se observó un aumento en los niveles del marcador de proliferación celular PCNA (proteína antígeno nuclear de proliferación celular). En el modelo de daño vascular por angiotensina II el bloqueo de la IL-17A disminuye las alteraciones en la estructura de las arterias mesentéricas de resistencia asociadas a la infusión de angiotensina II como el incremento en el grosor de la pared vascular y en la relación media/luz, sin prevenir el aumento en la rigidez de las mismas. En las aortas de los ratones infundidos con angiotensina II la neutralización de la citoquina IL-17A disminuye la expresión génica de factores proliferativos y profibróticos. En células de músculo liso vascular de ratón la estimulación con IL-17A durante 24 y 48 horas produce un aumento de PCNA en extractos proteicos y de producción de proteínas de matriz extracelular como fibronectina y colágeno en los sobrenadantes. Además el estudio de los mecanismos moleculares activados por IL-17A en células de músculo liso vascular mostró una activación de la ruta NF- $\kappa$ B y de la proteína quinasa ERK, ambos mecanismos implicados en la regulación en la proliferación y fibrosis.

**Conclusiones:** IL-17A es capaz de regular procesos asociados a proliferación y fibrosis vascular.

#### 16. LA ADIPOQUINA VISFATINA/NAMPT DETERIORA LAS RELAJACIONES DEPENDIENTES DE ENDOTELIO EN ARTERIAS MESENTÉRICAS TANTO IN VITRO COMO IN VIVO

M. Ramos González, S. Vallejo Fernán, A. San Hipólito Luengo, E. Cercas Alonso, C. Sánchez-Ferrer y C. Peiró Vallejo

Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Medicina, Madrid.

**Objetivo:** La visfatina, también conocida como nicotinamida fosforibosiltransferasa (Nampt), es una adipoquina cuyos niveles circulantes están elevados en desórdenes metabólicos, tales como

diabetes mellitus tipo 2 y obesidad. Dichos niveles han sido asociados positivamente con el daño vascular y la disfunción endotelial. El objetivo del presente trabajo fue investigar la capacidad de la visfatina/Nampt para modular la reactividad microvascular.

**Métodos:** Se utilizaron arterias mesentéricas procedentes de a) ratas Sprague-Dawley de tres meses de edad, b) epiplón de cuatro pacientes sometidos a operación no séptica y no urgente en el Hospital Universitario de la Princesa de Madrid, o c) ratones C57/BL6 machos de 3 meses de edad a los que se implantaron minibombas osmóticas subcutáneas conteniendo visfatina/Nampt por un periodo de 7 días. En todos los casos, la reactividad vascular se estudió utilizando un miógrafo de pequeños vasos. Los segmentos vasculares se precontrajeron con noradrenalina (NA; 3  $\mu$ M) y se relajaron a continuación con concentraciones crecientes y acumulativas de acetilcolina (ACh) y nitroprusiato sódico (SNP); en el caso de las arterias humanas, éstas se contrajeron con cloruro de potasio (KCl; 125 mM) y se relajaron con bradikina (BK).

**Resultados:** La preincubación con visfatina/Nampt (10 a 100 ng/ml) en arterias mesentéricas de rata provocó un deterioro en las relajaciones dependientes de endotelio a ACh ( $10^{-10}$  M- $10^{-6}$  M) a partir de la concentración 50 ng/ml, siendo este deterioro revertido por el antioxidante inhibidor de la NADPH oxidasa apocinina ( $10^{-5}$  M). Sin embargo, este deterioro no se observó en las relajaciones a SNP ( $10^{-9}$  M- $10^{-5}$  M). La visfatina/Nampt (50 ng/ml) también deterioró la relajación a BK ( $10^{-9}$  M- $10^{-6}$  M) de las arterias mesentéricas humanas, siendo este efecto revertido por el inhibidor específico de la Nampt, APO866 ( $10^{-5}$  M). Además, tras la infusión de visfatina/Nampt (100 ng/Kg/día) durante 7 días se evidenció de nuevo un deterioro de las relajaciones a ACh en los microvasos mesentéricos de los ratones, mientras que las relajaciones a SNP no presentaron diferencias significativas con el control, indicando que el efecto de la visfatina/Nampt se reproducía en un entorno más complejo *in vivo*.

**Conclusiones:** La adipoquina visfatina/Nampt provoca un deterioro en las relajaciones dependientes de endotelio de las arterias mesentéricas de las especies descritas, que parece estar mediado por mecanismos relacionados con la estimulación de la NADPH oxidasa y de su actividad enzimática Nampt. Por lo descrito, se propone que la adipoquina visfatina podría implicada en el desarrollo de enfermedades metabólicas tales como la diabetes tipo 2 y obesidad.

## 17. ACTIVADORES DEL FACTOR KLF2 PARA REDUCIR ATEROSCLEROSIS

A. González Guerra<sup>1</sup>, M. Roche Molina<sup>1</sup>, C. Sánchez Ramos<sup>1</sup>, D. Sanz-Rosa<sup>2</sup> y J.A. Bernal Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid. <sup>2</sup>Departamento Clínico, Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Europea (UE), Madrid.

**Objetivo:** Dada la creciente incidencia de enfermedades cardiovasculares en el mundo, se necesitan nuevas terapias que ayuden a controlar y tratar enfermedades crónicas como la aterosclerosis.

**Métodos:** Usamos el escrutinio de una librería de compuestos aprobados para uso en humanos y encontrar drogas que activasen el factor ateroprotector Klf2. Como modelo de estudio usamos ratones ApoE KO que desarrollan lesiones ateroscleróticas cuando estos ratones se alimentan con dieta grasa rica en colesterol.

**Resultados:** Hemos encontrado compuestos que inducen la expresión a nivel transcripcional de Klf2. Estos compuestos activan la ruta antiinflamatoria dependiente de VCAM-1 en el endotelio y reducen la progresión de lesiones ateroscleróticas en animales con altos niveles de LDL en sangre. Estos compuestos inhiben la capacidad de células circulantes de adherirse a la pared vascular.

**Conclusiones:** En definitiva estos compuestos reducen el desarrollo de la aterosclerosis *in vivo* en modelos animales mediante la activación de Klf2.

## 18. AUMENTO DE LA DESCARGA SIMPÁTICA EN ARTERIA MESENTÉRICA SUPERIOR DE RATAS SOMETIDAS A INFARTO DE MIOCARDIO: PAPEL DE LA NORADRENALINA Y EL ATP

J. Blanco-Rivero<sup>1</sup>, G.K. Couto<sup>2</sup>, S.M. Paula<sup>2</sup>, M.T. Fontes<sup>2</sup>, V. Lahera<sup>3</sup>, G. Balfagón<sup>1</sup> y L.V. Rossoni<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid. <sup>2</sup>Departamento de Fisiología e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

<sup>3</sup>Departamento de Fisiología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

**Introducción:** El infarto agudo de miocardio (IM) es responsable del 23% de la mortalidad por enfermedades cardiovasculares en el mundo. Además de los cambios a nivel cardiaco, entre los que se encuentra un aumento en la descarga simpática, se ha observado un incremento de la resistencia vascular periférica en IM, debido, entre otros factores, al desarrollo de disfunción endotelial. En determinados lechos vasculares, como el lecho mesentérico, la inervación perivascular simpática juega un papel crucial en la regulación del tono vascular. Puesto que no existen estudios que analicen la función perivascular mesentérica tras el IM, nos planteamos determinar las posibles alteraciones en la descarga simpática en arteria mesentérica superior en esta patología.

**Métodos:** Se utilizaron ratas macho Wistar divididas en dos grupos experimentales: 1) Ratones sometidos a IM, mediante oclusión quirúrgica de la rama descendente anterior de la arteria coronaria izquierda; y 2) Ratones control (Sham), sometidos al mismo procedimiento descrito anteriormente, con excepción de la ligadura de la arteria coronaria. 8 semanas después de la cirugía, se evaluaron diversos parámetros hemodinámicos mediante canulación de la arteria carótida derecha. Posteriormente se sacrificaron los animales, se extrajo la arteria mesentérica superior y se analizaron la respuesta vasodilatadora a acetilcolina (ACh), la respuesta vasoconstrictora inducida por estimulación eléctrica (EE) en presencia o ausencia del antagonista  $\alpha$ -adrenérgico, fentolamina; del antagonista de los receptores P2X purinérgicos suramina, o de ambos fármacos. Se analizaron además la respuesta vasomotora a noradrenalina (NA), la liberación inducida por EE de NA y ATP, y la expresión de tirosina hidroxilasa (TH) y su forma fosforilada (P-TH).

**Resultados:** La presión arterial sistólica y la presión sistólica del ventrículo izquierdo fueron mayores en ratas sometidas a IM, mientras que la frecuencia cardiaca, la presión arterial diastólica y la presión diastólica final del ventrículo izquierdo no se vieron alteradas. La respuesta vasodilatadora endotelio-dependiente a ACh fue menor en el grupo IM, mientras que la respuesta vasoconstrictora a EE se incrementó en segmentos con y sin endotelio de animales sometidos a IM. La fentolamina redujo la respuesta constrictora inducida por EE en mayor medida en el grupo IM. La suramina disminuyó la respuesta inducida por EE en menor medida en animales sometidos a IM. La preincubación conjunta con fentolamina y suramina abolió la respuesta vasoconstrictora en ambos grupos experimentales. La respuesta vasomotora a NA no se modificó con respecto al control. La liberación inducida por EE de NA aumentó, mientras que la liberación de ATP disminuyó en el grupo IM. Las expresiones de TH y P-TH aumentaron en el grupo IM.

**Conclusiones:** El IM incrementó la función adrenérgica y disminuyó la función purinérgica en arteria mesentérica de rata. El efecto neto fue un incremento en la participación de la inervación simpática sobre la respuesta vasoconstrictora inducida por EE. Estas

alteraciones podrían participar en el incremento en la resistencia vascular periférica observada en IM.

Subvencionado por Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2012-38530), Banco Santander, y Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

## 19. LA LIPOATROFIA MARRÓN SEVERA AGRAVA EL PROCESO ATROSCLERÓTICO

N. Beneit<sup>1</sup>, O. Escribano<sup>1</sup>, S. Díaz-Castroverde<sup>1</sup>, N. de las Heras<sup>2</sup>, G. García-Gómez<sup>1</sup>, S. Fernández<sup>1</sup>, M. Benito<sup>1</sup> y A. Gómez-Hernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, UCM, IdISHCSC, CIBERDEM, ISCIII, Madrid.

<sup>2</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UCM, Madrid.

**Objetivo:** La obesidad es uno de los principales factores de riesgo del desarrollo de enfermedades cardiovasculares y se caracteriza por la acumulación anormal de tejido adiposo, incluyendo el tejido adiposo perivascular (PVAT). Sin embargo, la activación del tejido adiposo marrón (BAT) reduce la adiposidad visceral.

**Métodos:** Para demostrar que la lipoatrofia marrón severa puede acelerar el proceso aterosclerótico, generamos un nuevo modelo experimental en ratón sin receptor de insulina (IR) en el BAT y sin apolipoproteína E (ratón BATIRKO; ApoE<sup>-/-</sup>) y analizamos las alteraciones vasculares y metabólicas asociadas a la obesidad.

**Resultados:** La lipoatrofia marrón severa induce adiposidad visceral, principalmente en el depósito gonadal (gWAT), intolerancia severa a la glucosa, elevados niveles de glucosa postprandial y un defecto severo en la secreción aguda de insulina. El ratón BATIRKO; ApoE<sup>-/-</sup> presentó mayor hipertrigliceridemia, pero igual hipercolesterolemia, que la obtenida en el ratón ApoE<sup>-/-</sup>. El ratón BATIRKO; ApoE<sup>-/-</sup>, además de resistencia primaria a la insulina en el BAT, mostró una disminución significativa de la señalización de insulina en el hígado, gWAT, corazón, arteria aorta y tPVAT. De forma más importante, nuestros resultados sugieren que la lipoatrofia marrón severa agrava el proceso aterosclerótico, caracterizado por un aumento significativo de los depósitos de lípidos, del alcance de la lesión aterosclerótica, del tamaño y complejidad de la lesión, mayor infiltrado de macrófagos, además de mayor expresión de marcadores proinflamatorios. Finalmente, un aumento de TNF-alfa y leptina, así como una disminución de adiponectina, por el BAT, gWAT y tPVAT puede ser uno de los mecanismos responsables del daño vascular agravado en este modelo.

**Conclusiones:** Nuestros resultados sugieren que la lipoatrofia marrón severa agrava el proceso aterosclerótico y por el contrario, la activación del BAT puede estar protegiendo frente a la obesidad y las alteraciones metabólicas asociadas.

## 20. IDENTIFICACIÓN DE UN PERFIL DE EXPRESIÓN DE MICRORNAs EN PACIENTES HIPERTENSOS CON DILATACIONES SUBANEURISMÁTICAS DE AORTA

V. Cachofeiro<sup>1</sup>, A. Ortega-Hernández<sup>2</sup>, A. Torres<sup>3</sup>, M. Barrientos<sup>3</sup>, D. Gómez-Garre<sup>2</sup> y L. Álvarez-Sala<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Complutense, Madrid. <sup>2</sup>Hospital Clínico San Carlos-Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC), Madrid. <sup>3</sup>Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

**Introducción:** El aneurisma de aorta abdominal (AAA) es una dilatación de la aorta mayor de 3 cm que se localiza por debajo de las arterias renales y que, en poblaciones de alto riesgo cardiovascular, puede afectar hasta a un 16,9% de los hombres y un 9,4% de las mujeres. La hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales

factores de riesgo asociados a su presencia. Los AAA son generalmente asintomáticos hasta su ruptura, la cual constituye una emergencia quirúrgica con una muy alta mortalidad (85-90%). Por tanto, es importante identificar al paciente de riesgo y diagnosticar el AAA asintomático. Los microRNAs (miRNAs) son moléculas pequeñas de RNA no codificantes que han demostrado ser importantes reguladores negativos de la expresión génica a nivel postranscripcional. Cada vez hay más evidencias de que el estudio de los miRNAs podría generar nuevos biomarcadores, ya que se ha observado la expresión diferencial de miRNAs en algunos tejidos y condiciones fisiopatológicas. Por ello, el objetivo de nuestro estudio ha sido estudiar la asociación entre los niveles plasmáticos de miRNAs y la presencia de dilataciones subaneurismáticas de aorta (DA).

**Métodos:** Se incluyeron 300 pacientes hipertensos de una Unidad de HTA. Se excluyeron pacientes menores de 50 años y aquellos que no firmaron el consentimiento informado. El diámetro de aorta abdominal (AA) se midió mediante ecografía y los pacientes se clasificaron en tres grupos: sin lesiones (AA < 2,5 cm), pacientes con DA (AA entre 2,5 y 2,9 cm) y pacientes con AAA (AA ≥ 3 cm). Los miRNAs se aislaron de plasma y se cuantificaron mediante PCR cuantitativa.

**Resultados:** En nuestra población, 40 pacientes hipertensos (13,3%) presentaron DA y 20 (6,9%) AAA. El 80% de los pacientes con DA o con AAA eran varones. Con respecto a los pacientes hipertensos sin lesión, los pacientes con DA presentaban un mayor perímetro abdominal (p = 0,021), presión arterial diastólica elevada (p = 0,029) y un mayor filtrado glomerular (p < 0,001). De los 760 miRNAs analizados, 348 se detectaron de forma estable en alguno de los tres grupos estudiados. De ellos, 11 miRNAs estaban aumentados más de dos veces y 95 disminuidos más de la mitad en los pacientes con DA con respecto a los pacientes sin lesiones. En los pacientes con AAA, 65 miRNAs se encontraban aumentados y 176 disminuidos. Con respecto a los pacientes sin lesiones, los niveles plasmáticos de miR15b, miR126, miR139, miR323a y miR708 ya se encontraban significativamente aumentados en los pacientes con DA y aumentaron más aún en los pacientes con AAA. Por el contrario, miR99, miR140, miR144, miR337, miR362 y miR424 estaban aumentados en los pacientes con DA pero disminuyeron en los pacientes con AAA hasta valores similares a los que presentaban los pacientes sin lesiones.

**Conclusiones:** Los pacientes hipertensos varones mayores de 50 años con obesidad abdominal y estado de hiperfiltración pueden ser pacientes candidatos a screening de AA. En estos pacientes, parece que existe un patrón de expresión de miRNAs que podría ayudar al diagnóstico temprano del AAA asintomático.

## 21. PAPEL DE LA VÍA NOTCH EN EL DAÑO RENAL EXPERIMENTAL

L. Márquez Expósito<sup>1</sup>, C. Lavoz Barría<sup>1</sup>, R. Rodríguez Díez<sup>1</sup>, E.M. Blanco Ruiz<sup>2</sup>, M.A. Higuera<sup>2</sup>, M. Fierro Fernández<sup>2</sup>, S. Lamas<sup>2</sup> y M. Ruiz Ortega<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid. <sup>2</sup>Centro de Biología Molecular, Madrid.

**Introducción:** La vía de señalización de Notch se encuentra activada en múltiples enfermedades renales. Se ha descrito que la activación de la vía canónica, a través de ligandos como Jagged-1, contribuye a la fibrosis renal. DLK1 (*epidermal growth factor-like protein Delta-like 1*) presenta homología estructural con los ligandos de la vía Notch y se ha sugerido que es un ligando no canónico. Recientemente se ha demostrado que en endotelio DLK1 antagoniza la vía Notch inhibiendo la angiogénesis. Sin embargo, no hay estudios en patología renal.

**Objetivo:** Estudiar si en el modelo de daño renal experimental por obstrucción ureteral unilateral (UUO) está activada la vía

Notch, así como el efecto del bloqueo de su activación y de la delección de DLK1 en la progresión del daño renal.

**Métodos:** Se realizó el modelo de UUU en ratones tratados con el inhibidor de la gamma-secretasa DAPT y se utilizaron ratones deficientes en el gen de DLK1. Se evaluaron los resultados por Western Blot, qRT-PCR e inmunohistoquímica.

**Resultados:** Se comprobó que en los riñones obstruidos se activa la vía Notch y aumenta la expresión de ligandos canónicos (Jagged-1) y no canónicos (DLK1 y DLK2). El bloqueo farmacológico de Notch mediante DAPT disminuyó la inflamación y fibrosis en los riñones obstruidos. Sin embargo, en ratones deficientes en DLK1 sometidos a UUU no observamos diferencias significativas en la activación de la vía Notch, ni en los niveles de los componentes de la vía canónica, ni en parámetros asociados a inflamación y fibrosis respecto a ratones de fenotipo salvaje.

**Conclusiones:** El bloqueo farmacológico de Notch, pero no la delección de DLK1, mejoró la progresión del daño renal experimental. A diferencia de lo observado en angiogénesis nuestros resultados no apoyan la hipótesis de DLK1 como un antagonista de Notch en patología renal.

## 22. LA DELECCIÓN DEL ECA2 ACENTÚA LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL INDUCIDA MEDIANTE ANGIOTENSINA II EN RATONES DIABÉTICOS. EFECTO EN LA HIPERTROFIA RENAL Y ALBUMINURIA

S. Clotet, M.J. Soler, M. Rebull, J. Pascual y M. Riera

Hospital del Mar-Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques, Barcelona.

**Objetivo:** Los principales efectos de la angiotensina II (AngII) incluyen vasoconstricción, albuminuria, fibrosis, apoptosis e inflamación. La delección de ECA2 incrementa la susceptibilidad a la hipertensión (HTA) inducida mediante AngII. Nos proponemos estudiar el efecto de la delección del ECA2 en hembras diabéticas con

HTA dependiente de AngII y su relación con los niveles de actividad de ECA y ECA2 circulantes (ECAC, ECA2c).

**Métodos:** Evaluamos el efecto de la infusión de AngII en ratones hembra C57BL/6 wild-type (WT) y ECA2KO diabéticas tipo 1 (DB) mediante estreptozotocina (STZ) y sus respectivos controles. Tras 8 sem de DB, se implantaron minibombas osmóticas para administración de AngII. Grupos: WT-Control (CONT) + SHAM, WT-CONT + ANGII, WT-DB + SHAM, WT-DB + ANGII, ECA2KO-CONT + SHAM, ECA2KO-CONT + ANGII, ECA2KO-DB + SHAM, ECA2KO-DB + ANGII. Parámetros estudiados: glucosa en sangre (GS), peso corporal (PCorp), peso renal (PR)/PCorp, peso cardíaco (PC)/PCorp, presión arterial sistólica (PAS) y excreción urinaria de albúmina (EUA). ECAC y ECA2c se determinaron mediante ensayo fluorométrico.

**Resultados:** Todos los ratones diabéticos mostraron hiperglucemia y PCorp reducido (tabla). Los grupos ECA2KO diabéticos, mostraron mayor PR/PCorp en comparación a los WT diabéticos. En ratones ECA2KO controles y diabéticos, la administración de AngII aumentó significativamente el PC/PCorp y la PAS en comparación a los ratones KO no tratados. La diabetes y la infusión de AngII incrementaron la EUA en todos los grupos, que fue más pronunciada en los ratones ECA2KO. Los ratones ECA2KO-CONT + ANGII y ECA2KO-DB + ANGII mostraron PC/PCorp, PAS y EUA significativamente más altos que los respectivos WT-CONT + ANGII y WT-DB + ANGII. La diabetes y la delección del ECA2 se acompañaron de un aumento significativo de ECAC. En los grupos WT, ECA2c aumentó significativamente en los grupos diabéticos.

**Conclusiones:** La delección del ECA2 acentúa la hipertrofia renal y la hipertensión, albuminuria e hipertrofia cardíaca secundarias a AngII. En los ratones WT, el aumento de la actividad circulante de ECA2 podría contrarrestar parcialmente las acciones mediadas por la AngII exógena, así como compensar los niveles aumentados de ECAC y la consiguiente producción de AngII endógena en contexto de diabetes e hipertensión. Dichos resultados sugieren que el mayor efecto deletéreo de la AngII observado en los ratones ECA2KO es debido a un déficit en la degradación del péptido y su consiguiente acúmulo a nivel circulante e intratisular.

Grupos	GS (mg/dL)	PCorp (g)	PR/PCorp (%)	PC/PCorp (%)	PAS (mmHg)	EUA (μgAlb/mgCrea)	ECAC (RFU/μL/min)	ECA2c (RFU/μL/h)
WT-CONT+SHAM (n = 10)	172 ± 7	25 ± 0,7	1,0 ± 0,05	0,49 ± 0,03	104,6 ± 1,6	11 ± 2	400 ± 28	18 ± 2
WT-CONT+ANGII (n = 12)	175 ± 7	25 ± 0,9	0,9 ± 0,03	0,54 ± 0,02	108,5 ± 4,7	69 ± 36*	373 ± 9	19 ± 1
WT-DB+SHAM (n = 11)	306 ± 31†	21 ± 0,4†	1,1 ± 0,08	0,46 ± 0,02	102,0 ± 2,3	71 ± 12†	530 ± 27†	43 ± 6†
WT-DB+ANGII (n = 11)	389 ± 44†	20 ± 0,3†	1,1 ± 0,07	0,49 ± 0,03	116,6 ± 4,7*	186 ± 63†	486 ± 31†	72 ± 16†
ACE2KO-CONT+SHAM (n = 10)	177 ± 11	24 ± 0,6	0,9 ± 0,06	0,50 ± 0,02	106,6 ± 1,6	9 ± 1	473 ± 32‡	
ACE2KO-CONT+ANGII (n = 10)	157 ± 8	23 ± 0,5	1,0 ± 0,04	0,65 ± 0,03*‡	133,3 ± 6,0*‡	436 ± 108*‡	395 ± 22	
ACE2KO-DB+SHAM (n = 11)	354 ± 46†	20 ± 0,6†	1,3 ± 0,10†‡	0,50 ± 0,03	104,3 ± 2,1	98 ± 35†	599 ± 32†	
ACE2KO-DB+ANGII (n = 9)	436 ± 51†	19 ± 0,8†	1,3 ± 0,04†‡	0,60 ± 0,02*‡	138,9 ± 7,4*‡	995 ± 321*‡	533 ± 60†	

\*p < 0,05 vs SHAM; †p < 0,05 v sCONT; ‡p < 0,05 vs WT.

### 23. LA INHIBICIÓN DEL REMODELADO VASCULAR POR LA LISIL OXIDASA DEPENDE DE LA FORMA SECRETADA Y CATALÍTICAMENTE ACTIVA

S. Varona, M. Galán, A. Guadall, M. Orriols, S. Aguiló, J. Martínez-González y C. Rodríguez

*Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC), IIB-Sant Pau, Barcelona.*

**Introducción y objetivo:** La lisil oxidasa (LOX) es un enzima clave en la estabilización de la matriz extracelular y juega un papel relevante en el mantenimiento de la homeostasis vascular. La LOX se sintetiza como un proenzima que se secreta al espacio extracelular, donde es procesada proteolíticamente generando así la forma madura y enzimáticamente activa, y un propéptido (LOX-PP) que también presenta actividad biológica. Nuestros estudios previos en un modelo animal modificado genéticamente demuestran que la LOX limita el remodelado vascular a través de la inhibición de la proliferación de las células musculares lisas vasculares (CMLV); sin embargo, actualmente se desconocen los mecanismos moleculares implicados en este fenómeno. El objetivo de este estudio ha sido determinar si el efecto de LOX sobre el remodelado vascular es dependiente de su actividad enzimática o de la actividad biológica de su propéptido.

**Métodos:** Mediante la técnica de explantes, se obtuvieron CMLV de la aorta de ratones control (C57BL/6J) y transgénicos que sobreexpresan la LOX humana en este tipo celular (Tg-LOX<sup>SMC</sup>). La sobreexpresión de LOX-PP y de la forma madura de LOX humana en CMLV humanas se realizó mediante transfección lentiviral. Los niveles de expresión se evaluaron mediante PCR a tiempo real y *Western-blot*. La proliferación celular se determinó mediante el ensayo de incorporación de timidina tritiada al ADN. Se realizaron estudios de ligadura de la arteria carótida tanto en ratones control como Tg-LOX<sup>SMC</sup>, en presencia y ausencia de un inhibidor irreversible de la actividad LOX,  $\beta$ -Aminopropionitrilo (BAPN; 100 mg/kg/día), durante 21 días.

**Resultados:** Las CMLV procedentes de los ratones Tg-LOX<sup>SMC</sup> secretaban niveles elevados de este enzima y de su propéptido y presentaban una reducción significativa de la tasa de proliferación celular frente a las células control. La incubación de CMLV control con sobrenadante de CMLV de ratones transgénicos disminuyó la proliferación de estas células, lo que sugería que en la actividad antiproliferativa de LOX no intervendrían sus formas intracelulares. Asimismo, la inhibición de la tasa proliferativa fue dependiente de la actividad enzimática LOX ya que la incubación con BAPN revirtió este efecto. Análogamente, el nivel de expresión de PCNA (marcador de proliferación celular) disminuyó en las células incubadas con medio condicionado de CMLV transgénicas, expresión que se normalizó en presencia de BAPN. En concordancia, la sobreexpresión de la forma madura y catalíticamente activa de LOX en CMLV humanas redujo significativamente la tasa de proliferación celular, mientras la sobreexpresión de LOX-PP no alteró este parámetro. Finalmente, la reducción en el engrosamiento de la neointima que presentan los ratones TgLOX tras ligadura de carótida se normalizó por el tratamiento con BAPN, normalizando la disminución del área de la íntima y de la media y del porcentaje de estenosis que presentan los ratones transgénicos.

**Conclusiones:** Nuestros datos indican que la forma secretada y catalíticamente activa de LOX juega un papel crítico en el remodelado vascular y descartan la participación de LOX-PP en el efecto antiproliferativo de este enzima en CMLV sugerida previamente por otros autores.