

Fisiopatología. Biología celular y molecular

ASOCIACIÓN DE LA NADPH OXIDASA FAGOCÍTICA CON NIVELES PLASMÁTICOS DE LA METALOPROTEINASA-9 EN SUJETOS LIBRES DE ATROSCLEROSIS CLÍNICA

J. Orbe*, J.A. Rodríguez*, G. San José*, M.U. Moreno*, M. Belzunce*, O. Beloqui**, J.A. Páramo**, J. Díez*, A. Fortuño* y G. Zalba*

*Área de Ciencias Cardiovasculares, CIMA, Universidad de Navarra.

**Departamento de Medicina Interna. Clínica Universitaria, Universidad de Navarra.

Objetivo: Las especies reactivas del oxígeno desempeñan un papel crítico en la aterogénesis y en la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica. La NADPH oxidasa constituye la principal fuente de anión superóxido en las células fagocíticas y se ha asociado con la aterosclerosis. Este estudio pretende investigar la asociación entre la actividad NADPH oxidasa fagocítica y la metaloproteasa-9 de matriz extracelular (MMP-9), un marcador de vulnerabilidad de la placa aterosclerótica, en sujetos libres de enfermedad clínica de aterosclerosis.

Métodos y resultados: La producción de anión superóxido dependiente de la NADPH oxidasa se midió por luminiscencia y se asoció con los niveles plasmáticos de la MMP-9 en 188 sujetos asintomáticos, sin enfermedad aterosclerótica aparente clínicamente. En un análisis de correlación, encontramos una asociación positiva ($P < 0,05$) entre la producción de anión superóxido y los niveles de MMP-9. En el análisis multivariante, la asociación de la producción de anión superóxido permanecía significativa tras ajustar por edad, sexo, presión arterial, índice de masa corporal, glucosa, tabaquismo y triglicéridos. Además, comprobamos como los constituyentes de la NADPH oxidasa fagocítica localizaban con la MMP-9 en áreas ricas en macrófagos en endarterectomías carotídeas obtenidas de 5 pacientes que presentaban una estenosis carotídea mayor del 75%. Por último, experimentos *in vitro* mostraron que la activación de la NADPH oxidasa en monocitos humanos resultó en un aumento en la secreción y actividad de la MMP-9.

Conclusión: En una población de adultos sin aterosclerosis clínicamente aparente, una actividad NADPH oxidasa incrementada asociaba con los niveles plasmáticos de MMP-9, lo cual sugiere la existencia de una relación entre el estrés oxidativo asociado a la NADPH oxidasa fagocítica y la vulnerabilidad de la placa aterosclerótica.

CUANTIFICACIÓN, AMPLIFICACIÓN POR CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES (EPCS) EN UNA MUESTRA DE SUJETOS SANOS

S. Redondo, A. Gordillo-Moscó, E. Ruiz, G. Cusati y T. Tejerina

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

Introducción: Informaciones recientes subrayan la importancia de las células progenitoras endoteliales (EPCs) en la reparación endotelial autógena, relacionada con una mayor protección frente a eventos cardiovasculares.

Material y métodos: Se extrajeron muestras de sangre (1 ml) de 3 sujetos sanos para la cuantificación de EPCs en sangre periférica. Se añadieron directamente sobre ella los anticuerpos

anti-CD34 y anti-cadherina (anti-CD144), incubándose 30 minutos a 4° C. Posteriormente, los hematíes se lisaron, y los leucocitos se analizaron por citometría de flujo. En otros sujetos, se extrajeron 50ml de sangre periférica. Las células mononucleares, obtenidas de la misma por centrifugación en gradiente de densidad, se sembraron en placas estériles recubiertas con fibronectina (10 µg/ml) y se cultivaron 7 días en medio MV-II para microvasculatura, cambiándose el medio el día 4. Las células se incubaron 2 horas con Di-Acetil-LDL a 37° C, se levantaron con tripsina y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente.

Resultados: La media de células doblemente positivas para CD34 /CD144 fue del 0.323% de población linfocitaria. El enriquecimiento en cultivo durante 7 días hizo que el porcentaje de células cultivadas doblemente positivas para Di-Acetil-LDL/Lectina fuera de 73.510%.

Conclusión: La detección, por citometría, de CD34/CD144 EPCs en sangre total, así como las de Di-Acetil-LDL en EPCs amplificadas por cultivo, pueden ser marcadores útiles para la caracterización y cuantificación de este tipo celular a partir de sangre periférica normal.

EFFECTO DE LAS LDL EN EL PERFIL PROTEÓMICO DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE ARTERIAS CORONARIAS HUMANAS

T. Padró, M. García-Arguinzonis y L. Badimon

Centro Investigación Cardiovascular, CSIC-ICCC, Hospital Sant Pau. Barcelona.

Antecedentes: Las células musculares lisas (CML) juegan un importante papel en la remodelado de la pared vascular, uno de los mayores determinantes en el desarrollo y progresión de patologías como la aterosclerosis o la restenosis tras angioplastia. Las LDL son lipoproteínas altamente aterogénicas. Sin embargo, los procesos moleculares que relacionan las LDL con alteraciones en el fenotipo de las CML que facilitan el desarrollo de lesiones no están hasta el momento suficientemente identificados.

Objetivos: El estudio tiene como finalidad analizar el efecto de las LDL en el proteoma de CML humanas a fin de identificar proteínas diferenciales que puedan relacionarse al perfil aterogénico inducido por LDL.

Métodos y resultados: Cultivos subconfluentes de CML humanas aisladas de arterias coronarias se incubaron en presencia/ausencia de LDL humanas (100 µg/mL) durante 24 horas. El análisis de proteínas diferenciales se ha realizado mediante electroforesis bidimensional (2DE). Para aumentar la sensibilidad del análisis, se prepararon de forma secuencial dos subpoblaciones de proteínas en base a su solubilidad, una fracción citosólica (37% del total de proteínas extraídas) y una fracción soluble en urea/detergente (29% de las proteínas) que está enriquecida en proteínas de membrana y citoesqueleto. La identificación de proteínas se ha realizado por su huella peptídica mediante un Ettan Maldi-ToF. En los extractos proteicos de CML tratadas con LDL se han identificado 24 proteínas diferenciales debido a alteraciones significativas en la expresión (7 aumentos/11 disminuciones) ó en la distribución fenotípica (6 modificaciones) de diferentes formas correspondientes a una misma proteína. LDL inducen alteraciones en proteínas como prohibitina y lamina, directamente involucradas en proliferación celular. Prohibitina, proteína con función antiproliferativa (detectada en el citosol y en la fracción urea-detergente) disminuyó 2-3 veces su expresión en presencia de LDL. La lamina A/C es una proteína de la envoltura nuclear que participa en el ciclo celular favoreciendo proliferación. En los geles de la fracción urea-detergente se han

identificado 3 spots como lamina A/C con diferencias en sus puntos isoelectricos. En presencia de LDL las diferentes formas de lamina incrementaron entre 50 y 100% su nivel de expresión. Además, la Mn-SOD (superóxido dismutasa), proteína asociada a estados de quiescencia celular y a la oxidación celular, disminuyó en CML en presencia de LDL.

En resumen, nuestro estudio indica que las LDL modulan la prohibitina y lamina coordinadamente para promover la proliferación celular y por tanto el fenotipo pro-aterogénico en CML vasculares humanas.

Este estudio ha sido posible gracias a RECAVA C03/01

EFFECTO DE LOS ALDEHÍDOS, EL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO Y LA ROSIGLITAZONA EN LA DIFERENCIACIÓN ADIPOCITARIA

A. Cabré, I. Lázaro, J. Girona y L. Masana

Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi, IRCIS, Hospital Universitari Sant Joan, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España.

Objetivos: Estudiar el efecto de los aldehídos, el ácido araquidónico y la rosiglitazona sobre los cambios morfológicos, la acumulación lipídica intracelular, la modulación de marcadores de diferenciación adipocitaria (PPARgamma y FABP4) y la secreción de adipocinas (adiponectina y RBP4) durante la diferenciación adipocitaria.

Métodos: Se diferenciaron preadipocitos humanos en presencia de aldehídos (2,4-decadienal y hexanal), ácido araquidónico y rosiglitazona. La acumulación lipídica intracelular se valoró mediante tinción con Oil Red O. Se analizaron por citometría de flujo los cambios morfológicos de las células y la expresión de FABP4, PPARgamma, adiponectina, RBP4. La expresión de mRNA de aP2/FABP4 se determinó mediante RT-PCR a tiempo real.

Resultados: Los aldehídos y la rosiglitazona potenciaron la acumulación lipídica intracelular; un incremento en el tamaño y la complejidad de las células, así como del marcaje intracelular de las proteínas PPARgamma y FABP4. Se observó que el ácido araquidónico producía desdiferenciación celular. Bajo las mismas condiciones, el 2,4-decadienal aumentó los niveles de mRNA de FABP4 más de 4 veces respecto al vehículo. Durante la diferenciación adipocitaria inducida por rosiglitazona, se observó que los patrones de expresión de adiponectina y RBP4 eran diferentes. Mientras que adipocitos en un estado de diferenciación primario (acumulación intracelular lipídica baja) producían niveles similares de estas dos adipocinas, los adipocitos maduros mostraban una sobreexpresión de RBP4.

Conclusión: La presencia de productos de la oxidación puede facilitar la hipertrofia de los adipocitos. El estado de adipocito maduro puede conducir a una alteración en el patrón de secreción de adipocinas, con tendencia a la resistencia insulínica. *Red de Centros RCMN (C03/08). Fondo de Investigación Sanitaria PI021051.*

EZETIMIBA REDUCE LA LESIÓN Y LA INFLAMACIÓN EN UN MODELO DE ARTERIOSCLEROSIS ACELERADA EN CONEJO

A. Fernández-Cruz*, P. Muñoz-Pacheco*, G. Hurtado de Mendoza*, M.L. González-Rubio*, R. Granados** y D. Gómez-Garre*

**Laboratorio de Biología Vascular y Arteriosclerosis, Hospital Clínico San Carlos; **Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Getafe. Madrid.*

Aunque la arteriosclerosis un proceso multifactorial, universalmente se acepta el papel del colesterol tanto en el desarrollo

llo de la placa aterosclerosa como en sus complicaciones trombóticas. Recientemente se ha demostrado que ezetimiba, un inhibidor selectivo de la absorción intestinal del colesterol, es capaz de disminuir los niveles plasmáticos de colesterol, principalmente c-LDL. Además, la asociación de ezetimiba a una estatina, disminuye el colesterol total, el c-LDL, y los triglicéridos y aumenta el c-HDL en los pacientes con hipercolesterolemia más que uno u otro fármaco solo. Sin embargo, se desconocen sus efectos sobre la lesión vascular. Nuestro objetivo ha sido investigar si ezetimiba, sola o en combinación con simvastatina, es capaz de modificar el tamaño de la placa de ateroma y la expresión de proteínas inflamatorias en un modelo de arteriosclerosis experimental. Hemos empleado conejos machos Nueva Zelanda a los que se les ha inducido arteriosclerosis en ambas femorales mediante la combinación de una dieta hiperlipidémica (2% de colesterol y 6% de aceite de cacahuete) y la realización de daño vascular por desecación endotelial. Siete días después de la cirugía, los animales se distribuyeron en uno de los siguientes grupos: no tratados, tratados con ezetimiba (0,6 mg/kg/día), tratados con simvastatina (5 mg/kg/día) o tratados con ezetimiba más simvastatina. La administración de ezetimiba durante cinco semanas no tuvo ningún efecto sobre el perfil lipídico en comparación con los animales no tratados. La administración de simvastatina o la combinación de ezetimiba y simvastatina disminuyó los niveles plasmáticos de colesterol total (-36 y -33%), VLDL (-41 y -88%), c-LDL (-68 y -69%) y triglicéridos (-22 y -66% respectivamente). La disminución de VLDL y triglicéridos fue significativamente mayor en el grupo que recibió la terapia combinada ($P < 0,05$). Todos los animales tratados presentaron una reducción parcial del área de la lesión (No tratados: $0,46 \pm 0,05$, EZE: $0,29 \pm 0,03$, SIMVA: $0,30 \pm 0,04$, EZE+SIMVA: $0,26 \pm 0,03$ mm²; $P < 0,05$) y un aumento de la luz respecto a los animales sin tratamiento (No tratados: $0,07 \pm 0,02$, EZE: $0,32 \pm 0,05$, SIMVA: $0,22 \pm 0,04$, EZE+SIMVA: $0,39 \pm 0,07$ mm; $P < 0,05$). Además, la administración de ezetimiba, simvastatina o ambos disminuyó más del 50% la expresión de MCP-1 (medida mediante PCR cuantitativa) en la lesión vascular y la activación de NF- κ B (mediante EMSA) en las células mononucleares periféricas.

Nuestros datos demuestran que ezetimiba, sólo o en combinación con una estatina, es capaz de disminuir el tamaño de la placa y la inflamación en un modelo de arteriosclerosis acelerada en conejos, independientemente de sus efectos hipolipemiantes. Estos resultados sugieren que ezetimiba podría tener un papel importante, no sólo en el desarrollo de la placa, sino en su estabilización.

LA ANGIOTENSINA II REGULA A LA ALZA LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DEL RECEPTOR LRP1 MEDIANTE SU INTERACCIÓN CON EL RECEPTOR AT1

J. Sendra, V. Llorente-Cortés y L. Badimon

Institut Català de Ciències Cardiovasculars, CSIC-ICCC-Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

Antecedentes: La internalización de LDL agregada (LDLag) mediante el receptor 'Low density lipoprotein receptor-related protein' (LRP1) es clave para la transformación de células musculares lisas de la pared vascular humana (hCMLV) en células espumosas. La hipertensión arterial induce lesiones arterioscleróticas, ricas en lípido, por mecanismos no totalmente conocidos. Es nuestra hipótesis que la Angiotensina II (AII), principal péptido vasoactivo del sistema renina-angiotensina, podría contribuir a la progresión de las lesiones arterioscleróticas. El objetivo de este estudio fue investigar el efecto de AII

en la expresión y función del LRP1, receptor que internaliza colesterol.

Métodos y resultados: Se estudió el efecto de AII en la expresión de ARNm de LRP1 por PCR a tiempo real y en la expresión proteica de LRP1 mediante Western Blot en cultivos de hCMLV. La máxima inducción de la expresión de ARNm (1.77 veces) por AII (1 μ M) se observó a las 12 horas. Esta regulación a la alza del LRP1 por AII se observó también en la expresión proteica (4 veces) a las 18 horas. En concordancia con estos resultados, se observó la sobreacumulación de colesterol esterificado (CE) (2 veces) procedente de la captación de LDLag (50 μ g/ml) mediante LRP1. La sobreexpresión de LRP1 y consecuente sobreacumulación lipídica inducidas por AII se inhibieron por Losartan (antagonista de AT1) pero no por PD123319 (antagonista de AT2).

Conclusiones: Estos resultados demuestran que la AII aumenta la expresión de LRP1 y la acumulación lipídica intracelular y que estos efectos son derivados del enlace de AII a su receptor AT1. Como la agregación de las LDL es una de las principales modificaciones de la LDL en la íntima arterial y el LRP1 está altamente expresado en células vasculares humanas, el aumento de expresión de LRP1 producido por AngII podría jugar un papel clave en la aceleración del desarrollo de lesión aterosclerótica que se observa en los pacientes hipertensos.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación de PNS SAF2003-03187, MSD Unrestricted Grant y FIS-PI051717.

LA ENDOTELINA-1 NO PREVIENE, PERO SÍ RETRASA, EL DESARROLLO DE LA ARTERIOSCLEROSIS EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN CONEJO

D. Gómez-Garre*, G. Hurtado de Mendoza*, P. Muñoz-Pacheco*, M.L. González-Rubio*, R. Granados** y A. Fernández-Cruz*

**Laboratorio de Biología Vascular y Arteriosclerosis, Hospital Clínico San Carlos; **Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Getafe, Madrid.*

La endotelina-1 (ET-1) es un potente péptido vasoconstrictor que podría participar en el desarrollo de la arteriosclerosis. Se ha demostrado que los niveles plasmáticos de ET-1 se correlacionan con el grado de arteriosclerosis. Además, tanto en placas humanas como de animales de experimentación, se observa un aumento de ET-1 y sus receptores ETA y ETB, principalmente en zonas ricas en células espumosas. Nuestro objetivo ha sido investigar la contribución de la ET-1 al inicio y al desarrollo de la lesión en un modelo experimental de arteriosclerosis acelerada. Además, hemos estudiado el efecto de la combinación del bloqueo de los receptores de la ET-1 junto a una estatina sobre la progresión del daño. Para ello, a conejos machos Nueva Zelanda se les indujo arteriosclerosis en ambas femorales administrando una dieta hiperlipidémica (2% de colesterol y 6% de aceite de cacahuete) y realizando daño vascular por desecación endotelial. Los animales se distribuyeron en varios grupos: un grupo comenzó a recibir bosentán (un antagonista de los receptores de la ET-1; 100 mg/kg/día) 24 horas antes de la inducción del daño vascular; y otros tres grupos recibieron bosentán, simvastatina (5 mg/kg/día), o la combinación de ambos, siete días después de la cirugía. Un grupo de animales no recibió ningún tratamiento y sirvió de control. En comparación con los animales no tratados, la administración temprana de bosentán no tuvo ningún efecto sobre el perfil lipídico (colesterol total: 3406 ± 252 vs 4072 ± 364 mg/dl; VLDL: 275 ± 37 vs $262 \pm$

29 mg/dl), aunque sí resultó en una reducción significativa del tamaño de la lesión (460 ± 50 vs $290 \pm 70 \mu\text{m}^2 \times 10^3$, $P < 0,05$) y en un aumento de la luz del vaso (17 ± 5 vs $65 \pm 38 \mu\text{m}$, $P < 0,05$). La administración de bosentán, simvastatina, o ambos en combinación, iniciada después del daño, disminuyó la concentración plasmática de colesterol total (-11 , -36 , -26%) y VLDL (-29 , -41 , -54% respectivamente), así como el área de la lesión (Bos: 225 ± 42 , Simva: 299 ± 44 , Bos+Simva: $172 \pm 56 \mu\text{m}^2 \times 10^3$, $P < 0,05$). La reducción observada en el grupo que recibió el tratamiento combinado tendió a ser mayor que la que se observó en los animales tratados con bosentán y simvastatina en monoterapia. Esta mejora de la lesión vascular se asoció con una disminución de la expresión de MCP-1 en la placa y de la activación de NF- κ B en las células mononucleares periféricas. En resumen, la ET-1 retrasa el desarrollo de la placa de arteriosclerosis, aunque no lo previene, en un modelo experimental de hiperlipidemia con daño endotelial. El conocimiento de los mecanismos por los cuales la ET-1 podría participar en la progresión de la arteriosclerosis (independientemente de los niveles de colesterol) podría ayudar a la búsqueda de nuevos abordajes terapéuticos.

LA EXPRESIÓN DE LA METALOPROTEASA 10 (MMP-10) SE ASOCIA CON EL COMPONENTE INFLAMATORIO DE LA PLACA DE ATEROMA EN UN MODELO MURINO DE ATEROSCLEROSIS

J.A. Rodríguez, J. Orbe, M. Belzunce y J.A. Páramo

Laboratorio de Aterosclerosis, Área de Ciencias Cardiovasculares, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Universidad de Navarra. Pamplona.

Objetivo: Hemos demostrado el aumento de los niveles circulantes de la metaloproteína 10 (MMP-10) en relación con un mayor riesgo aterosclerótico en humanos, y observado su expresión en las placas ateroscleróticas humanas. Nuestro objetivo ha sido estudiar la expresión de la MMP-10 en distintas fases de la lesión aterosclerótica, así como en la pared vascular normal, utilizando un modelo murino de aterosclerosis.

Métodos: Se utilizaron ratones de la estirpe C57BL/6: 40 wild type (wt) y 40 deficientes en apolipoproteína E (apoE $^{-/-}$), que se sacrificaron a los 8 meses de edad. Recibieron una dieta pro-aterogénica (20% mantequilla, 0,15% colesterol) durante 3 semanas, 2 meses ó 4 meses, hasta el momento del sacrificio. Se incluyó también un grupo de ratones wt de 2 años. En el plasma se determinó el colesterol total, y en la aorta se determinó la expresión de la MMP-10 por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Se realizaron inmunotinciones de MMP-10 en cortes de raíz aórtica.

Resultados: Todos los ratones apoE $^{-/-}$ que recibieron dieta aterogénica presentaron lesiones y expresión aórtica del mRNA de la MMP-10, desde las lesiones de 3 semanas hasta las de 4 meses. Ninguno de los ratones wt presentó lesión ni expresión vascular de MMP-10, tampoco los wt de 2 años de edad. Los apoE $^{-/-}$ que no recibieron dieta tampoco presentaron lesiones ni expresión vascular de MMP-10. La expresión de MMP-10 se localizó en los macrófagos de las lesiones ateroscleróticas.

Conclusiones: En el modelo murino, la metaloproteína 10 se expresa únicamente en las lesiones ateroscleróticas, específicamente en los macrófagos de la placa, mientras que se encuentra ausente en la pared vascular normal. La MMP-10 podría constituir una diana potencial para el desarrollo de inhibidores selectivos con interés terapéutico.

LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA-C REACTIVA ESTÁ AUMENTADA EN LAS PLACAS DE CARÓTIDA HUMANA ACTIVAS (PLACAS ULCERADAS, NO-COMPLICADAS)

M. Miguel Turu*, J. Krupinski**, J. Martínez-González*, J.O. Juan-Babot*, M. Slevin*** y L. Badimon*

*Centro de Investigaciones Cardiovasculares, CSIC-ICCC.

Barcelona. **Departamento de Neurología, Hospital Universitario de Bellvitge y IDIBELL. Barcelona. ***Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Manchester.

Antecedentes: Estudios recientes presentan la proteína-C reactiva (CRP) como una molécula de efectos proaterogénicos y protrombóticos. La presencia de CRP en placas ateroscleróticas puede reflejar producción local o infiltración de ésta desde la circulación aumentando así la respuesta inflamatoria. Se ha demostrado que existe síntesis de esta molécula en células musculares lisas y macrófagos de lesiones ateroscleróticas.

Objetivo: Analizar la presencia y niveles de expresión de CRP en placas ateroscleróticas de carótida con diferentes características anatómico-patológicas.

Metodología: Las placas ateroscleróticas de carótida de 38 pacientes sometidos a endarterectomía carotídea fueron clasificadas en tres grupos: ulceradas no-complicadas ($n = 19$), fibrosas ($n = 12$) y ulceradas complicadas ($n = 7$). Se evaluó la expresión de CRP en la placa mediante PCR a tiempo real e inmunohistoquímica.

Resultados: Mediante PCR a tiempo real se pudo observar niveles de expresión más elevados en placas ulceradas no complicadas ($p=0.001$) respecto a aquellas placas ulceradas-complicadas o fibrosas. Los niveles de expresión de CRP se correlacionan con los resultados inmunohistoquímicos. La tinción en placas no complicadas corresponde a áreas con elevado contenido celular (células musculares lisas y células inflamatorias) y a zonas ricas en microvasos donde existe una tinción marcada en células endoteliales.

Conclusiones: Este estudio muestra que no todas las placas de carótida avanzadas contienen un perfil bioquímico similar. De hecho, identificamos un subgrupo de placas 'activas' (no complicadas) que muestran niveles de expresión de CRP más elevados en zonas ricas en componente celular. En estudios anteriores se ha demostrado que CRP induce proliferación de células musculares lisas y células endoteliales. Por lo tanto, en estas lesiones CRP podría estar contribuyendo a aumentar el proceso de angiogénesis y en consecuencia elevar el riesgo de hemorragia intraplaca. CRP además de realizar un importante papel en la modulación de la inflamación, podría por lo tanto intervenir en la regulación del desarrollo y remodelaje de las lesiones, pudiendo llegar a desencadenar la rotura de la placa.

LA HIPOXIA AUMENTA LA EXPRESIÓN DE LA LISIL OXIDASA EN CÉLULAS ENDOTELIALES

J.F. Alcudia, C. Rodríguez, J. Martínez-González y L. Badimon

Centro de Investigación Cardiovascular. CSIC-ICCC. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona

Antecedentes: La lisil oxidasa (LOX) participa en la síntesis y maduración de la matriz extracelular y está implicada en la disfunción endotelial desencadenada por factores de riesgo aterosclerótico. La LOX podría jugar un papel importante en el desarrollo de nuevos vasos y en el remodelado vascular asociado al estrés por hipoxia.

Objetivos: Analizar el efecto de la exposición de células endoteliales (CE) a hipoxia sobre la expresión de LOX.

Métodos: Los niveles de mRNA de LOX se analizaron mediante PCR a tiempo real en CE de aorta bovina (BAEC). La activi-

dad transcripcional LOX se evaluó mediante ensayos de transfección transitoria con construcciones del promotor de LOX acoplados a luciferasa y con el vector de expresión del factor inducible de hipoxia-1 α (HIF-1 α).

Resultados: La hipoxia (1% O₂) indujo el nivel de mRNA de LOX en CE de forma dependiente del tiempo. La inducción fue significativa después de 8 h y alcanzó un máximo al cabo de 16 h de incubación (Control: $1 \pm 0,053$ vs hipoxia (16 h): $2,89 \pm 0,255$; $p < 0,0001$). Este efecto se asoció con un aumento de la actividad transcripcional de LOX de 2.5 veces. Además, la sobre-expresión de HIF-1 α mimetiza la activación transcripcional del promotor de LOX causada por la hipoxia. El análisis del promotor de este enzima (MatInspector®) reveló la presencia de 3 posibles elementos de respuesta a hipoxia (HRE). Delecciones del promotor muestran que la regulación dependiente de HIF-1 α se produce a través de dos regiones, la primera situada entre -900 y -400 pb y la segunda situada en los primeros 130 pb, regiones que incluyen los 3 HREs detectados.

Conclusión: La expresión de LOX se incrementa en células endoteliales sometidas a hipoxia a través de un mecanismo dependiente de HIF-1 α . LOX podría estar implicada en la formación de nuevos vasos en lesiones ateroscleróticas y en tejidos sometidos a hipoxia como el miocardio isquémico.

LA VARIACIÓN INDIVIDUAL EN LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES "SCAVENGER" DE MACRÓFAGOS HUMANOS EN RESPUESTA A LDL OXIDADA "IN VITRO" ESTÁ ASOCIADA CON UNA DIFERENTE RESPUESTA INFLAMATORIA

P. Martín-Fuentes, A. Cenarro, D. Recalde, A.L. García-Otín, E. Jarauta y F. Civeira

Laboratorio de Investigación Molecular. Hospital Universitario Miguel Servet. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (I+CS). Zaragoza.

Objetivo: Las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox) son internalizadas por los macrófagos mediante los receptores "scavenger" (RS). Existen ocho clases de RS, aunque SR-A, CD36 y LOX-1 internalizan más del 90% de LDLox. Como consecuencia, se forma la célula espumosa, que promueve la activación de la respuesta inmune. Sin embargo, hay una gran variación inter-individual en la respuesta inflamatoria producida. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar si las diferencias inter-individuales en la expresión génica de los RS pueden determinar la variabilidad inflamatoria en respuesta a LDLox.

Metodología: Las células mononucleares humanas de 18 sujetos no relacionados se aislaron y cultivaron a 37°C y 5% CO₂. En el día 9 se suplementaron con 50 μ g/mL de LDL oxidadada durante periodos de incubación de 1, 3, 6 y 18 horas. Se extrajo el RNA total y se realizó una retrotranscripción. A partir del cDNA sintetizado, se llevó a cabo una PCR cuantitativa en tiempo real utilizando sondas TaqMan para los genes SR-A, CD36, LOX-1, PPAR γ , IL8, IL1 β , Triptasa (TPS), CXCL3 y TNF α . Los genes 18srRNA, RPLP0 y HPRT1 se usaron como controles endógenos.

Resultados: El perfil de expresión de los genes de RS fue altamente variable. La expresión ("Fold-Change") del gen CD36 varió en un rango de -2,1 a 1,68, el gen SR-A varió entre -1,9 y 4,68 y LOX-1 osciló entre -5,3 y 88,39. Además, se encontró una correlación positiva entre la expresión génica de CD36 e IL-1 β ($p < 0,05$) y entre LOX-1 con IL8 ($p < 0,05$) y CXCL3 ($p < 0,05$). Sin embargo, se observó una correlación negativa entre la expresión génica de SR-A con IL8 ($p < 0,05$) y CXCL3 ($p < 0,05$).

Conclusión: La expresión génica de CD36, SR-A y LOX-1 en respuesta a LDLox es muy variable. La sobreexpresión de CD36 y LOX-1 se correlaciona con la sobreexpresión de citoquinas pro-inflamatorias, mientras que la sobreexpresión de SR-A se correlaciona con la represión de dichas citoquinas.

LAS HDL INDUCEN LA CICLOOXIGENASA-2 (COX-2) EN CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES "ENDOTHELIAL DIFFERENTIATION GENES"

M. González-Díez, J. Martínez-González, C. Rodríguez y L. Badimon

Centro de Investigación Cardiovascular. CSIC/ICCC. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

Antecedentes: Previamente hemos demostrado que las HDL inducen la liberación de prostaciclina (PGI₂) en células musculares lisas vasculares (CMLV) a través de un mecanismo dependiente de Cox-2. La esfingosina 1-fosfato (S1P), un componente de las HDL, actúa a través receptores acoplados a proteínas G denominados *Endothelial Differentiation Genes* (EDGs). Estos receptores se han asociado con motilidad celular y angiogenesis.

Objetivo: Identificación de los receptores implicados en la inducción de Cox-2 producida por las HDL en las células vasculares.

Métodos: Los niveles de proteína de Cox-2 y SR-BI (*Scavenger Receptor-BI*) se midieron por *Western-blot* y los de mRNA por PCR a tiempo real en células endoteliales (HUVEC) y en CMLV de arterias coronarias humanas. Se bloqueó SR-BI empleando siRNA y un anticuerpo específico que bloquea la función biológica de dicho receptor. Los EDGs se desensibilizaron pre-tratando las células con S1P o con dihidro-S1P (DhS1P), derivado no permeable a membrana de S1P. Asimismo, EDG-3 fue inhibido empleando suramina.

Resultados: La S1P (0,1 μ M) induce los niveles de mRNA de Cox-2 en CMLV de forma similar al de concentraciones fisiológicas de HDL (> 30 mg/dL). El efecto de la S1P es análogo al producido por la DhS1P. Las CMLV presentan niveles significativos de EDG-3 y EDG-5. La desensibilización de los EDGs por S1P o DhS1P bloqueó la inducción de la expresión de Cox-2 y la liberación de PGI₂ promovida por las HDL. La suramina (inhibidor de EDG-3) redujo significativamente la inducción de Cox-2 por HDL, S1P y DhS1P. Por el contrario, el bloqueo de SR-BI, empleando siRNA y un anticuerpo específico no disminuyó la inducción de Cox-2 por HDL, tanto en HUVEC como en CMLV.

Conclusión: Los receptores de S1P (EDGs), en particular EDG-3 y EDG-5, están implicados en la inducción de la liberación de PGI₂ dependiente de Cox-2 en CMLV. La S1P puede jugar un papel activo en las funciones vasoprotectoras de las HDL.

LOS ALDEHÍDOS DERIVADOS DE LA OXIDACIÓN LIPÍDICA INDUCEN LA EXPRESIÓN DE AP2/FABP4 EN MACRÓFAGOS HUMANOS

I. Lázaro, A. Cabré, J. Girona y L. Masana

Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosi, IRCIS, Hospital Universitari Sant Joan, Universitat Rovira i Virgili, Reus, España.

Objetivos: Las LDL oxidadas inducen la expresión de ap2/FABP4 en macrófagos humanos contribuyendo a la formación de células espumosas. Como las oxLDL son una fuente aldehídos, en este trabajo se estudió el efecto de los aldehídos

(2,4-decadial y hexanal) sobre la expresión de aP2/FABP4 en macrófagos THP-1.

Métodos: Las células THP-1 se diferenciaron a macrófagos con PMA y se incubaron con 2,4-decadial (5-10 μ M), hexanal (10-25 μ M) durante 0-24h. La expresión de mRNA de aP2/FABP4 se analizó por RT-PCR a tiempo real utilizando la metodología TaqMan y la expresión de proteína por Western-blot.

Resultados: Los ensayos por Western-blot revelaron que 2,4-DDE y hexanal inducen la expresión a nivel de proteína de aP2/FABP4 en macrófagos después de 24h de incubación. El principal efecto se observó con 5 μ M de DDE y 10 μ M de hexanal y correspondieron a una inducción de 2.1 y 2.6 veces de los niveles de proteína, respectivamente. Se plantearon sucesivos experimentos para determinar el efecto potencial de estos aldehídos sobre los niveles de mRNA de aP2/FABP4. Se observó un incremento dependiente de dosis en los niveles de mRNA después de 16h de incubación en ambos aldehídos. El 2,4-DDE produjo un aumento de 2.1 y 3.4 a concentraciones de 5 μ M y 10 μ M, respectivamente. El hexanal también produjo un aumento de 2.0 y 2.5 veces a 10 μ M and 25 μ M, respectivamente. La incubación de los macrófagos con dosis renovadas diariamente de 2,4-DDE (5 μ M) durante un periodo de 6 días resultó en un incremento de 4.8 veces en los niveles de mRNA aP2/FABP4, sugiriéndose su posible implicación en la formación de células espumosas.

Conclusión: Los resultados de este estudio sugieren que el incremento en la expresión de aP2/FABP4 en macrófagos causado por las oxLDL podría ser debido, al menos en parte, a los aldehídos apolares. Éste podría ser un nuevo efecto proaterogénico de los aldehídos en relación a la formación de células espumosas.

Red de Centros RCMN (C03/08). Fondo de Investigación Sanitaria PI021051.

LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN SREBP-2 REGULAN NEGATIVAMENTE LA TRANSCRIPCIÓN DEL RECEPTOR "LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED PROTEIN" (LRP1)

P. Costales*, V. Llorente-Cortés*, J. Bernues**, S. Camino-López* y L. Badimon*

*Institut Català de Ciències Cardiovasculars, CSIC-ICCC-Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona. **Departamento de Biología Molecular y Celular, CSIC-IBMB-Parc Científic de Barcelona

Antecedentes: El receptor "Low density lipoprotein receptor-related protein" (LRP1) une e internaliza LDL modificada por agregación (LDLag) dando lugar a la elevación de los niveles intracelulares de colesterol esterificado (CE). La LDLag incrementa la expresión de LRP1 y concomitantemente reduce la expresión del receptor clásico de LDL (LDLR) y del factor de transcripción SREBP-2 ("sterol-regulatory element binding protein-2). Los objetivos de este trabajo fueron investigar si SREBP-2 regula la transcripción de LRP1 y los mecanismos moleculares involucrados en este proceso.

Métodos y resultados: La regulación a la baja de SREBP-2 por LDL dió lugar a un incremento en la expresión de LRP1 a las 24 horas (LDLn: $x1.33 \pm 0.03$; LDLag: $x1.61 \pm 0.06$) y a una reducción de la expresión del receptor clásico de LDL (LDLR) (LDLn: $x0.33 \pm 0.025$; LDLag: $x0.58 \pm 0.01$) observable a las 8 horas. La sobreexpresión de un vector que codifica para la forma activa de SREBP-2 (SREBP-2-NT) (0, 0.5, 1, 1.5 μ g) disminuyó la transcripción de LRP1 y aumentó la de LDLR de forma dosis-dependiente. Además, la sobreexpresión de SREBP-2-NT, (0, 1, 5, 10, 20 y 50 ng) disminuyó la actividad

luciferasa del promotor LRP1 (WT-LRP1) de forma dosis-dependiente pero no ejerció ningún efecto significativo sobre el promotor LRP1 con la zona SRE (5-GTGGGGTGA-3') mutada (SRE-MT-LRP1). En concordancia con estos resultados, la disminución de los niveles de SREBP-2 inducida por LDLn y por LDLag dió lugar a un incremento en la actividad luciferasa del promotor WT-LRP1 (nLDL: $x1.14 \pm 0.05$; agLDL: $x1.42 \pm 0.06$) pero no de la del promotor SRE-MT-LRP1. Por último, la sobreexpresión de SREBP-2-NT (5 ng) previnó la regulación a la alza de la actividad luciferasa de WT-LRP1 inducida por LDL.

Conclusiones: Nuestros resultados demuestran que SREBP-2 regula negativamente la transcripción de LRP1 mediante su unión a la región SRE localizada en la zona 5' no traducible del gen. Las LDL regulan la transcripción de LRP1, al menos en parte, por la disminución de la forma activa de SREBP-2 y su unión a la zona SRE del promotor LRP1.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación del PNS SAF2004-03187, MSD Unrestricted Grant y FIS-PI051717.

NOR-1 MODULA LA SUPERVIVENCIA/APOPTOSIS DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES ASOCIADA AL EFECTO DUAL DE LA SIMVASTATINA SOBRE LA ANGIOGÉNESIS

L. Martorell, J. Martínez-González, B. Raposo, J. Crespo y L. Badimon

Centro de Investigación Cardiovascular. CSIC/ICCC. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

Introducción: La trombina promueve proliferación de las células musculares lisas vasculares (CMLV) y células endoteliales (CE) y actúa como factor pro-angiogénico. La inhibición de la proliferación de las CMLV por estatinas se asocia con una reducción de la expresión del receptor nuclear huérfano NOR-1 (*Neuron-derived Orphan Receptor-1*), factor de transcripción que juega un papel clave en la proliferación de las células endoteliales.

Objetivo: Estudiar el papel de NOR-1 en el efecto dual (dependiente de la dosis) de las estatinas sobre la angiogénesis.

Métodos. Se utilizaron células HUVEC y BAEC. Se analizó el efecto de dosis crecientes de simvastatina (SIM) sobre la capacidad de la trombina de inducir formación de angiotubos en matrices de fibrina. Los niveles de mRNA se determinaron mediante PCR a tiempo real. El ratio Bcl2/BAX se utilizó como índice de supervivencia/apoptosis. El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante citometría de flujo (anexina V). NOR-1 fue sobre-expresado en las células endoteliales utilizando un vector bicistónico que contiene GFP.

Resultados: La trombina induce la expresión de NOR-1 en CE de forma dosis y tiempo dependiente. Esta inducción es potenciada por dosis bajas de SIM (0,01-0,1 μ M), lo que se asocia con un efecto pro-angiogénico de la combinación trombina-SIM. Por el contrario, dosis altas de SIM (1-10 μ M) inhiben la expresión de NOR-1, la proliferación celular y la formación de angiotubos. La relación de niveles mRNA de Bcl2/BAX aumenta con dosis bajas de SIM y disminuye con dosis altas. El análisis de Anexina V confirmó este efecto dual de la SIM sobre la supervivencia/apoptosis. En experimentos de transfección la sobre-expresión de NOR-1 en CE redujo la población de células apoptóticas.

Conclusiones: La sobre-inducción de NOR-1 por dosis bajas de SIM se asocia con un efecto beneficioso sobre la supervivencia celular, en cambio, su inhibición por dosis altas de este fármaco se asocia con una mayor apoptosis e inhibición de la formación de angiotubos. NOR-1 parece un factor clave en la regulación de la supervivencia de las células vasculares.

PAPEL DEL CTGF EN EL DAÑO VASCULAR INDUCIDO POR LA ANGIOTENSINA II EN RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS

N. de las Heras*, M. Miana*, M. Ruiz-Ortega**, M. Rupérez**, B. Martín*, D. Sanz-Rosa*, V. Lahera* y V. Cachafeiro*

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina. Universidad Complutense. **Laboratorio de investigación renal y vascular. Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma. Madrid.

El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) es un factor profibrótico implicado en diversas patologías. La angiotensina II participa en el daño vascular hipertensivo a través de la estimulación de diferentes mediadores. Sin embargo, no está bien establecido la interacción entre el CTGF y la angiotensina II en el daño vascular asociado a hipertensión.

Objetivo: Estudiar la posible participación del CTGF en el papel de la angiotensina II en el daño vascular asociado a hipertensión en ratas.

Métodos: Se utilizaron ratas macho (n=8) espontáneamente hipertensas (SHR) de 18 semanas de edad, tratadas durante 10 semanas con el antagonista del receptor AT_1 , candesartan (2 mg/kg/día), y ratas normotensas (WKY) (n=8) como grupo control. Al final del tratamiento se midió la presión arterial sistólica (PAS) y la reactividad vascular en anillos de aorta en respuesta a un vasodilatador dependiente de endotelio (acetilcolina; Ach) y a un vasodilatador independiente de endotelio (nitroprusiato sódico; SNP). Se determinó la expresión vascular del CTGF, evaluando la expresión génica mediante la técnica de PCR en tiempo real y los niveles de proteína por inmunohistoquímica, así como la fibrosis vascular con la tinción de tricrómico de Masson y la morfometría de la aorta con técnicas de microscopía óptica.

Resultados: Las SHR presentaron unos valores de PAS mayores que las ratas controles WKY (200 ± 2.3 vs. 132 ± 1.5 mmHg; $p < 0.05$). El tratamiento con candesartan redujo estos valores (162 ± 2.9 mmHg; $p < 0.05$). El área de la media aumentó significativamente en las SHR respecto a las WKY, así como la relación media/lumen. El tratamiento con candesartan redujo ($p < 0.05$) el área de la media y normalizó la relación media/lumen. La densidad de colágeno en la capa media de la aorta torácica aumentó ($p < 0.05$) en SHR respecto a WKY. El tratamiento con candesartan redujo significativamente este parámetro en los animales hipertensos. La expresión vascular génica del CTGF aumentó significativamente en las SHR respecto a las ratas normotensas. En las SHR se observó un claro aumento de la tinción de CTGF en la capa media de la aorta en comparación con las WKY. El tratamiento con candesartan disminuyó ($p < 0.05$) la expresión vascular génica y la tinción de CTGF en las SHR. La relajación dependiente de endotelio fue menor ($p < 0.05$) en SHR que en WKY y el tratamiento con candesartan normalizó ($p < 0.05$) dicha respuesta. No se observaron diferencias en la respuesta a SNP entre ningún grupo.

Conclusiones: 1) El CTGF es uno de los factores implicados en el proceso fibrótico vascular asociado a hipertensión arterial. 2) El CTGF es un mediador de las acciones de la angiotensina II en el daño vascular.

PAPEL MODULADOR DE LA IL10 INDUCIDA POR LA LDL ELECTRONEGATIVA EN LEUCOCITOS

S. Benítez, C. Bancells, J.L. Sánchez-Quesada y J. Ordóñez-Llanos

Servei de Bioquímica (Lípids). Hospital de Sant Pau. Barcelona.

La LDL electronegativa (LDL(-)) es una fracción modificada de LDL con propiedades aterogénicas, como la inducción de factores inflamatorios por parte de las células endoteliales. Al ser

la LDL(-) una subfracción plasmática también es muy posible su interacción con leucocitos, tema sobre el que no existían datos previos. En nuestro estudio se obtuvo que, tras incubar monocitos y linfocitos aislados de sangre con LDL(+) y LDL(-) durante 24 horas, la LDL(-) indujo en ambos tipos celulares un aumento significativo respecto a la LDL(+), aproximadamente del doble, en MCP1, GM-CSF, GRO β , GRO γ , IL6, IL8 y IL10. Esta inducción promovida por la LDL(-) se produjo tanto a nivel de proteína, valorado por ELISA, como de RNA, comprobado por RT-PCR. Estos factores estimulados por acción de la LDL(-) están relacionados con la inflamación, de hecho todos son proinflamatorios, excepto la IL10 que está considerada como una citoquina antiinflamatoria y, sorprendentemente, también fue inducida por la LDL(-). Se llevaron a cabo una serie de experimentos para evaluar el posible papel modulador de la IL10 sobre la producción de las otras citoquinas inducidas por LDL(-) en leucocitos. Con este objetivo se incubaron las células con LDL(+) o LDL(-) solas, o bien adicionándoles IL10 exógena (2, 5 y 10 ng/ml) anticuerpo anti-IL10 (5 y 15 μ g/ml) o antireceptor de IL10 (5 y 15 μ g/ml). La adición de IL10 simultáneamente a LDL(-) disminuyó la liberación de los otros factores inducidos por LDL(-), llegando a valores cercanos a los de producción basal, tanto en proteína como en copias de RNA. En cambio, el uso de anticuerpo anti-IL10, al inhibir la IL10, aumentó el doble la producción de las otras citoquinas estimuladas por la LDL(-). Resultados similares se hallaron con el anticuerpo antireceptor de IL10, aunque causó un efecto menor que el anti-IL10 y, en el caso de MCP1 y IL8, no se produjo un efecto significativo.

En conclusión, los resultados indican que la LDL(-) promueve una respuesta inflamatoria en leucocitos, estimulando la liberación de MCP1, GM-CSF, GRO β , GRO γ , IL6 y IL8. Sin embargo, también induce la IL10, la cual inhibe la producción de los otros factores inflamatorios, por lo que la IL10 desarrollaría un importante papel protector regulando la acción inflamatoria de la LDL(-).

SOBREEXPRESIÓN GÉNICA DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN MACRÓFAGOS DE SUJETOS CON HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR Y XANTOMAS TENDINOSOS

P. Martín-Fuentes, A. Cenarro, D. Recalde, A.L. García-Otín, E. Jarauta y F. Civeira

Laboratorio de Investigación Molecular. Hospital Universitario Miguel Servet. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (I+CS). Zaragoza.

Objetivo: La expresión clínica de la Hipercolesterolemia Familiar (HF) es altamente variable. Algunos sujetos HF presentan xantomas tendinosos (XT) y otros no, incluso compartiendo el mismo defecto en el gen del receptor de LDL. Recientemente, hemos demostrado que los XT son un factor de riesgo de enfermedad coronaria en esta población. Nuestra hipótesis es que el perfil de expresión de citoquinas de los macrófagos de sujetos HF en respuesta a LDL oxidada (LDLox) podría estar asociado a la presencia de XT.

Métodos: Las células mononucleares humanas de 11 sujetos con HF no relacionados se aislaron y cultivaron con medio Macrophage-Serum Free Medium (GibcoBRL) a 37°C y 5% CO $_2$. En el día 9 se suplementaron con 50 μ g/mL de LDL oxidada durante periodos de incubación de 1, 3, 6 y 18 horas. Se extrajo el RNA total con el kit RNeasy (Qiagen), se incubó con Dnasa I 1 UI y se realizó una retrotranscripción con SuperScript III 200 UI. A partir del cDNA sintetizado, se llevó a cabo una PCR cuantitativa en tiempo real utilizando sondas TaqMan para los

genes: PPAR γ , IL8, IL1 β , Triptasa (TPS), TNF α y CXCL3, utilizando 18srRNA, RPLP0 y HPRT1 como genes endógenos.

Resultados: Todos los genes analizados estuvieron sobreexpresados en el grupo de sujetos HF con XT respecto al grupo de sujetos HF sin XT en cada uno de los tiempos de incubación con LDLox estudiados: PPAR γ 3,3 vs 0,8; IL8 138,1 vs 94,3; IL1 β 4,5 vs 2,0; CXCL3 21,7 vs 2,0; TPS 20,2 vs 0,63 y TNF α 2,9 vs 0,5.

Conclusión: Los macrófagos de sujetos HF con XT tienen una respuesta diferencial a LDLox comparados con los sujetos HF sin XT, ya que presentan una sobreexpresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria. Los genes de Triptasa y CXCL3 fueron los más sobreexpresados, sugiriendo un papel importante en la etiología de los xantomas.

res de superficie y contenido de DNA, indican que la expresión de CD11c no se limita a ninguna fase del ciclo celular en particular, ahora bien, las células en G0/G1 son las que en mayor intensidad expresan ese marcador, lo que sugiere que estas células han escapado de la parada en G2/M.

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA DIFERENCIACIÓN DE HL-60 INDUCIDA POR LA DEFICIENCIA DE COLESTEROL

C.C. Sánchez Martín*, N. Olea Herrero*, A. Dávalos Herrera*, F. Cerrato Fernández y M.A. Lasunción Ripa*,**

*Bioquímica- Investigación, Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

**Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid.

Objetivo: Habíamos demostrado con anterioridad cómo las células HL-60 al inhibirse su síntesis de colesterol eran capaces de diferenciarse hacia la línea granulocítica, expresando marcadores típicos de diferenciación como son la proteína de superficie CD11c (pero no el marcador monocítico CD14), la activación de la NADPH oxidasa y cambios morfológicos. Paralelamente, habíamos demostrado que la inhibición de la biosíntesis de colesterol producía una inhibición de la proliferación, acumulándose las células en G2/M al tiempo que se diferenciaban. En el presente trabajo nos planteamos estudiar la relación entre esta parada del ciclo celular y la expresión del marcador de superficie CD11c en los distintos estadios del ciclo, así como los posibles cambios en la actividad de las vías de señalización de ERK, p38 MAPK y JNK/SAPK.

Metodología: Las células HL-60 se incubaron en un medio libre de colesterol y se inhibió la biosíntesis de colesterol con SKF104976 (inhibidor específico de la esterol 14a-desmetilasa). Para estudiar la relación de cada una de las vías de señalización con la diferenciación celular, utilizamos los siguientes inhibidores: PD98059, un inhibidor selectivo de ERK, SB203580 como inhibidor de p38 MAPK, y SP600125, un inhibidor selectivo de JNK/SAPK. Mediante citometría de flujo se estudiaron el ciclo celular (ioduro de propidio), la expresión de CD11c y la actividad de la NADPH oxidasa. La expresión simultánea de CD11c con el ciclo celular se midió por citometría utilizando DRAQ5. La expresión de las quinasas ERK, p38 MAPK y JNK/SAPK y su estado de fosforilación se analizó mediante western-blot.

Resultados: Hemos observado que la inhibición de la biosíntesis de colesterol en las células promielocíticas HL-60 conduce a un incremento de la fosforilación de ERK, p38 MAPK y de JNK. Ahora bien, sólo PD98054 impide la diferenciación inducida por la deficiencia de colesterol, por lo que este proceso parece estar mediado principalmente por la activación de la vía de ERK. La activación de la vía de p38 MAPK, por el contrario, parece jugar un papel de contención de la diferenciación, puesto que su inhibición favorece este proceso. Al combinar SKF104976 con SB203580, de hecho, se observó un incremento de la fosforilación de ERK, por lo que el balance entre ambas vías puede determinar la intensidad de la diferenciación. A pesar del incremento de P-JNK en aquellas condiciones, su inhibición con SP 600125 no afectó la diferenciación, por lo que esta vía de señalización no parece estar implicada. Finalmente, los resultados del análisis bivariante de expresión de marcadores

Dislipoproteinemias