

Fisiopatología de la arteriosclerosis

ANÁLISIS DEL PROTEOMA DE HDL EN LA SITUACIÓN PRE- Y POST-ANGIOPLASTIA TRANSLUMINAL PERCUTÁNEA

E. Burillo^a, A. Lukic^a, J. Osada^b, J. Vázquez^c, A. Cenarro^a y F. Civeira^a

^aLaboratorio de Investigación Molecular. Hospital Universitario Miguel Servet. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (I+CS), Zaragoza. ^bDepartamento Bioquímica y Biología Molecular y Celular. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza. ^cLaboratorio de Proteómica. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Universidad Autónoma de Madrid. Madrid.

Objetivo: El papel protector de la lipoproteína de alta densidad, HDL, en el desarrollo de aterosclerosis se atribuye a su participación en el transporte reverso de colesterol (TRC) desde los tejidos periféricos al hígado, para su catabolismo. Recientemente se han identificado, mediante técnicas de proteómica, nuevas proteínas transportadas por la HDL no relacionadas con el TRC. Entre estas proteínas se encuentran inhibidores de proteasas, proteínas de fase aguda y reguladores de la activación del complemento, sugiriendo la existencia de nuevos roles de la HDL en la protección frente al desarrollo de aterosclerosis. El objetivo de nuestro trabajo es analizar el contenido proteico de la HDL mediante técnicas de proteómica en sujetos con enfermedad cardiovascular antes y después de una intervención de angioplastia, con el fin de identificar proteínas transportadas por la HDL involucradas en el proceso de ruptura de placa.

Métodos: Se seleccionaron 4 sujetos con cardiopatía y se obtuvo sangre de los mismos en las situaciones pre- y post-angioplastia. A partir del plasma y mediante cromatografía líquida (FPLC) se aisló la lipoproteína HDL. A continuación se obtuvo el perfil de colesterol de las fracciones aisladas para seleccionar la lipoproteína HDL con pureza. Una vez aislada y purificada, se realizó electroforesis bidimensional de la partícula en la situación pre- y post-angioplastia, y se compararon los geles de ambas situaciones mediante un software de análisis de imagen. Los puntos de interés se identificaron por espectroscopía de masas.

Resultados: Los resultados preliminares obtenidos hasta este momento mediante electroforesis bidimensional y posterior análisis de espectroscopía de masas revelaron la existencia de 5 proteínas presentes únicamente en la lipoproteína HDL de la situación post-angioplastia: β -2-microglobulina, Componente C9 del complemento, ApoD, Laminina-M y Antígeno buloso pemfigoideo 1.

Conclusiones: Se han identificado 5 proteínas en la partícula HDL de la situación post-angioplastia que no están presentes en la situación pre-angioplastia. Estas proteínas podrían proceder de la ruptura de la placa de ateroma y ser transportadas por la HDL para su posterior degradación. Es necesario au-

mentar el número de sujetos estudiados para confirmar los resultados preliminares obtenidos.

AP-1 ES CLAVE EN LA EXPRESIÓN ENDOTELIAL DE METALOPROTEASA-10 (MMP-10) INDUCIDA POR TROMBINA

S. Martínez de Lizarrondo^a, J. Orbe^a, J.A. Rodríguez^a, O. Calvayrac^b, C. Rodríguez^b, J. Martínez-González^b y J.A. Páramo^a

^aLaboratorio de Aterosclerosis. Área de Ciencias Cardiovasculares. CIMA-Universidad de Navarra. Pamplona. ^bCSIC-ICCC. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

Objetivo: Estímulos inflamatorios inducen la expresión vascular de MMP-10 en el proceso aterosclerótico. Estudiamos el efecto de la trombina, un estímulo inflamatorio/protrombótico, en la expresión endotelial de MMP-10 y los mecanismos implicados.

Métodos: Se estimularon células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) con trombina humana (0,1-5 U/mL), para medir la expresión de ARNm MMP-10 (qRT-PCR) y la secreción proteica (ELISA), en presencia de un agonista para el receptor de la trombina PAR-1 (Protease-Activated Receptor-1) y anticuerpos específicos para PAR-1, con el fin de analizar la especificidad del receptor. Se clonó la región promotora del gen de la MMP-10 y se realizaron ensayos de actividad luciferasa para estudiar la actividad transcripcional en diferentes construcciones, obtenidas por delección seriada y mutagénesis dirigida, en presencia de trombina.

Resultados: La trombina induce la expresión y la secreción endotelial de la MMP-10, por un mecanismo dependiente de PAR-1, de forma dosis/tiempo dependiente. Este efecto fue similar con un péptido agonista de PAR-1 y bloqueado con un anticuerpo anti-PAR-1. La inducción de MMP-10 fue dependiente de MAP kinasas (vías ERK 1/2 y JNK). Mediante delecciones seriadas y mutagénesis dirigida, se observó que el elemento de respuesta a AP-1 en la región proximal del promotor de la MMP-10 era crítico en la inducción de la actividad transcripcional de la MMP-10 por trombina.

Conclusión: La trombina induce la expresión endotelial de MMP-10 por un mecanismo dependiente de PAR-1, mediado por MAP kinasas y la activación de AP-1. La MMP-10 puede ser considerada como nuevo mediador del efecto inflamatorio de la trombina.

CONSECUENCIAS BIOLÓGICAS DE LA INTERACCIÓN DE TWEAK CON CD163 EN ATROSCLEROSIS

J.A. Moreno^a, B. Muñoz-García^a, J.L. Martín-Ventura^a, J. Madrigal-Matute^a, J. Orbe^b, J.A. Páramo^b, L. Ortega^c, J. Egido^a y L.M. Blanco-Colio^a

^aFrom Vascular Research Lab. Fundación Jiménez Díaz. Autónoma University. Madrid. ^bAtherosclerosis Research Lab. Division of Cardiovascular Sciences. Centre for Applied Medical Research. School of Medicine. Pamplona. ^cHospital Clínico San Carlos. Madrid.

Antecedentes: CD163 es un receptor scavenger de TWEAK (Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis), el cual está implicado en diversas acciones biológicas en aterosclerosis.

Objetivo: Analizar la importancia de la interacción TWEAK-CD163 en la aterosclerosis.

Métodos: Los niveles de TWEAK y CD163 fueron evaluados en macrófagos humanos en cultivo (PCR a tiempo real, wes-

tern-blot y ELISA), así como en plasma (ELISA) y placas ateroscleróticas humanas (n = 25, inmunohistoquímica). Asimismo, hemos analizado la asociación potencial de TWEAK/CD163 con el grosor intima/media (IMT) en sujetos asintomáticos (n = 90, ELISA).

Resultados: En estudios in vitro hemos observado que los macrófagos que expresan CD163 pueden unir e internalizar TWEAK cuando es añadido al medio de cultivo. Asimismo, hemos observado una relación inversa entre la expresión de CD163 y TWEAK (r = -0,51; p = 0,008) en la zona de los hombros de placas ateroscleróticas carotídeas. La misma tendencia se observó cuando se analizó la concentración plasmática de ambas proteínas en sujetos sin enfermedad cardiovascular (r = -0,25; p = 0,016) en los que se había determinado el IMT por ultrasonografía. En estos sujetos, hemos encontrado una correlación positiva entre sCD163 y el IMT (r = 0,36; p < 0,001) y entre el ratio sCD163/sTWEAK y el IMT (r = 0,51; p < 0,001). Esta asociación se mantuvo significativa tras ajustar por factores de riesgo cardiovascular tradicionales y los marcadores inflamatorios explicando el 39% (sCD163) o el 48% (sCD163/sTWEAK ratio) de la variabilidad del IMT.

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que la interacción TWEAK-CD163 ocurre in vivo, probablemente disminuyendo la concentración plasmática de TWEAK. Además, hemos identificado el ratio CD163/TWEAK como un biomarcador potencial de aterosclerosis clínica y subclínica.

EL BETA-AMILOIDE INCREMENTA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR "LOW DENSITY LIPOPROTEIN RECEPTOR-RELATED PROTEIN" EN MACRÓFAGOS HUMANOS

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

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

Antecedentes: En la intima arterial, los proteoglicanos de la matriz extracelular favorecen la retención y agregación de las LDL. El receptor 'Low density lipoprotein receptor-related protein' (LRP1) une e interioriza LDL modificada por agregación produciendo acumulación intracelular de colesterol esterificado en macrófagos. En lesiones ateroscleróticas avanzadas se ha encontrado proteína beta-amiloide en la intima arterial principalmente en forma fibrilar. El objetivo de este estudio fue investigar el efecto del beta-amiloide en la expresión de LRP1 en macrófagos humanos.

Métodos y resultados: Los monocitos fueron aislados de la sangre de donadores sanos utilizando un gradiente de Ficoll y se diferenciaron a macrófagos en siete días. En los cultivos de macrófagos humanos se analizó el efecto del beta-amiloide en la expresión de ARNm de LRP1 por PCR a tiempo real y en la expresión proteica de LRP1 mediante Western Blot. Tanto el beta-amiloide-40 (Ab40) como el Ab42 (40 ng/mL) indujeron un patrón similar de expresión de ARNm de LRP1 con el tiempo. El incremento de expresión en ARNm más marcado se observó a las 12 horas (1,5 veces aprox) y a las 48 horas (1,4 veces aprox). Ab40 y Ab42 no ejercieron ningún efecto significativo en la expresión del ARNm del receptor clásico de LDL en ninguno de los tiempos testados. Ab42 mostró una capacidad más alta que Ab40 para inducir la expresión proteica de LRP1 tanto a las 12 horas (Ab42: 2,63 veces, Ab40: 1,87 veces) como a las 48 horas (Ab42: 1,51 veces, Ab40: 1,15 veces).

Conclusiones: Estos resultados demuestran que la proteína beta-amiloide tiene la capacidad de modular la expresión de uno de los receptores lipoproteicos más relevantes en la acumulación lipídica intracelular en macrófagos. El incremento del

LRP1 inducido por beta-amiloide podría ser un nuevo mecanismo por el cual estos péptidos contribuyen al desarrollo de aterosclerosis.

EL DESEQUILIBRIO MMP-8 Y MMP-10/TIMP-1 SE ASOCIA CON LA PROGRESIÓN DE LAS LESIONES EN ATROSCLEROSIS CLÍNICA Y EXPERIMENTAL

J. Barrenetxe^a, A. Purroy^a, J. Orbe^a, A. Cenarro^b, A.L. García-Otín^b, M. Belzunce^a, F. Civeira^b, J.A. Páramo^a y J.A. Rodríguez^a

^aLaboratorio de Aterosclerosis. Área de Ciencias Cardiovasculares. CIMA-Universidad de Navarra. Pamplona. ^bLaboratorio de Investigación Molecular, Hospital Universitario Miguel Servet. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (I+CS). Zaragoza.

Objetivos: Las metaloproteasas (MMPs) desempeñan un papel relevante en la progresión y ruptura de la placa aterosclerótica. Hemos analizado la expresión vascular de las MMPs y sus inhibidores (TIMPs) en un modelo murino de aterosclerosis y sus niveles circulantes en pacientes con aterosclerosis clínica y subclínica.

Métodos: Se utilizaron 40 ratones *wild type* (wt) y 40 deficientes en apolipoproteína E (apoE^{-/-}) a los 4, 8 ó 16 meses, que recibieron una dieta pro-aterogénica durante 1 ó 4 meses, hasta el sacrificio. Se determinó la expresión aórtica de MMP-2, -9, -8, -10, TIMP-1, -2, -3 y -4 por RT-qPCR, y se realizó análisis inmunohistoquímico de MMP-10 y TIMP-1 en cortes de raíz aórtica. A nivel clínico, se midieron las concentraciones séricas de MMP-8, -10 y TIMP-1 por ELISA en individuos control (n = 100), pacientes con hipercolesterolemia familiar (n = 160) e infarto agudo de miocardio (IAM, n = 140).

Resultados: Los ratones apoE^{-/-} de 8 y 16 meses mostraron un aumento muy significativo de la expresión vascular de MMP-8, -10 y TIMP-1, en comparación con los wt, que se incrementó con la dieta aterogénica. Sin embargo, no se observaron cambios en MMP-2, -9, TIMP-2, -3 y -4. La expresión de la MMP-10 estaba restringida a la lesión aterosclerótica, colocalizando con el TIMP-1 en zonas ricas en macrófagos y con poco colágeno. Se observó un aumento significativo en las relaciones MMP-8/TIMP-1 y MMP-10/TIMP-1 en los pacientes con hipercolesterolemia familiar e IAM (p < 0,01).

Conclusión: La expresión de MMP-8, MMP-10 y TIMP-1 está aumentada en la placa aterosclerótica. El incremento de la relación MMPs/TIMP-1, asociado con la aterosclerosis experimental, también se observó a nivel circulante en los pacientes con aterosclerosis clínica y subclínica. El desequilibrio MMPs/TIMP-1 puede ser de importancia fisiopatológica en el contexto de la aterosclerosis.

EL MENOR NÚMERO DE EPCS EN LA SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CORONARIOS NO ESTÁ RELACIONADO CON UNA DISFUNCIÓN IN VITRO INDUCIDA POR SU PLASMA

S. Redondo^a, A. González^b, M. Carnero^b, J. Navarro-Dorado^a, M. Ramajo^a, F. Reguillo^b y T. Tejerina^a

^aDepartamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. ^bServicio de Cirugía Cardíaca. Hospital Clínico San Carlos. Madrid.

Introducción y objetivo: Diversos estudios han mostrado un menor número *in vivo* y una disfunción *in vitro* de las células progenitoras endoteliales (EPCs), en pacientes ateroscleróticos. Nos propusimos analizar la relación existente entre el número de EPCs en sangre periférica, en pacientes sometidos a cirugía

de revascularización miocárdica y en pacientes sometidos a cirugía valvular, así como evaluar el efecto de la adición de su plasma a EPCs cultivadas procedentes de donantes sanos.

Métodos: Las EPCs se cuantificaron por citometría de flujo, como porcentaje de células mononucleares CD34⁺/CD144⁺/CD3⁻, CD34⁺/KDR⁺/CD3⁻ y CD14⁺/CD105⁺/CD3⁻, a partir de tubos EDTA de sangre periférica de 44 pacientes coronarios y 43 pacientes valvulares. Para los cultivos, las células mononucleares se obtuvieron de donantes de sangre y se sembraron sobre fibronectina incubándose con medio MV2 y un 1% de plasma de cada uno de los grupos de pacientes. La apoptosis fue cuantificada usando un kit de fragmentación de DNA, y la expresión de proteínas fue determinada mediante Western blot.

Resultados: Se obtuvo un menor número de EPCs CD34⁺/CD144⁺ en pacientes coronarios respecto a los valvulares (0,2239 ± 0,032% vs 0,4370 ± 0,08%, p = 0,0187) así como un menor número de EPCs CD34⁺/CD144⁺/CD3⁻ (0,3309 ± 0,0054% vs 0,7786 ± 0,1922%, p = 0,026). Sin embargo, registramos un menor índice apoptótico en células mononucleares a los 7 días de cultivo, tras 24, 48 y 72 h de incubación con 1% de plasma de pacientes coronarios (0,9998 vs 2,038, 0,9971 vs 1,951 y 0,998 vs 1,599, respectivamente) siendo este efecto bloqueado por los inhibidores de la vía del TGFβ SIS3 y SB431542. La incubación con plasma de pacientes coronarios produce, en células mononucleares y tras 4 días de cultivo, una mayor expresión de CD105 y de CD144, alcanzando su pico máximo a las 3 h de incubación. Este último efecto no se ve influido por SIS3 y SB431542.

Conclusiones: Los pacientes coronarios tienen un menor nivel preoperatorio de EPCs que los valvulares. La disfunción en cultivo de las EPCs de pacientes ateroscleróticos no se observa en EPCs cultivadas obtenidas de donantes sanos tras la incubación con plasma de pacientes coronarios, y por lo tanto podría ser debida más a factores intrínsecos de estas células en su procedencia de la médula ósea que a factores del medio plasmático.

Agradecimientos: Centro de Microscopía y Citometría de la UCM. Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid.

NEFROANGIOSCLEROSIS SECUNDARIA A AINES

M. Alarcón Meléndez, E. Arana Alonso, L. Quintana Pedraja, M. Urdaniz Rezusta, F. Beramendi Garcíandia y M. Castro Neira

Varón de 78 años. Antecedentes personales de FA + Cardiopatía Hipertensiva + Insuficiencia cardíaca grado II + Gota. En tratamiento con Sintrom + Acovil 2,5 mg (1-0-0).

Motivo de consulta en urgencias: Monoartritis en rodilla izquierda de 1 semana de evolución en tratamiento con Diclofenaco que precipitó cuadro de deposiciones diarreicas de 2-4 días de evolución que se resolvieron al suspender los Aines. Acude a urgencias por mantener dolor e inflamación de la rodilla además de fiebre y petequias en ambas piernas.

Pruebas complementarias: Creatinina 5,75 PCR 24,43 INR incalculable por lo diluida Dímero D 2010 Urea 260

Durante su ingreso en urgencias se realiza control de Diuresis + Se cambia el antihipertensivo + konakion, normalizándose los parámetros renales a creatinina 2,9 urea 54 VSG 10.

Juicio diagnóstico: Insuficiencia renal aguda en el contexto de una nefroangiosclerosis secundaria a antiinflamatorios no esteroideos y componente prerrenal + Monoartritis de rodilla gotosa + Celulitis en extremidad inferior izq + Paciente con FA por cardiocclerosis con dilatación de cavidades izq y FE conservada además de insuf. tricúspide leve-moderada con sobredosificación de ACO.

En tratamiento al alta con sintrom + pritor +sutrileo 10 mg + zyloric 100 + pantoprazol 40.

PLACA ATEROSCLERÓTICA VULNERABLE: DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN *IN VIVO* CON IVUS-HV Y OCT

G. Sánchez-Elvira^a, J. Calabuig^a, M. Artaiz^a, I. Coma-Canella^a, J.A. Páramo^b y J. Barba^a

^aCardiología Clínica. Universidad de Navarra. ^bHematología Clínica. Universidad de Navarra. Pamplona.

Objetivos: El estudio *in vivo* de la placa aterosclerótica es un campo fundamental para el progreso en el conocimiento de la aterotrombosis coronaria. Evaluamos la posibilidad de caracterizar *in vivo* las lesiones coronarias con 3 técnicas de imagen intracoronaria (IVUS-HV, OCT), y la seguridad de combinarlas en el mismo procedimiento junto a la angiografía y tratamiento endovascular convencional.

Métodos: 22 pacientes consecutivos con indicación de coronariografía (13 con angina estable, 4 isquemia silente y 5 angina inestable) fueron incluidos. Tras la coronariografía, 44 lesiones fueron estudiadas mediante ecografía intracoronaria (IVUS), Histología Virtual (HV) y Tomografía de Coherencia Óptica (OCT). Se realizó tratamiento endovascular en 21 pacientes.

Resultados: Mediante IVUS se encontró un remodelado positivo en 18 lesiones. Con HV se detectó un core necrótico significativo en 15. La OCT identificó un fibroateroma con cápsula fibrosa fina (TCFA) en 10, un nódulo cálcico con cápsula fibrosa fina en 8, erosión en 4, disección en 2 y trombo en 4. La cantidad de core necrótico se correlacionó positivamente con la cantidad de calcio ($p < 0,001$). Seis de los 10 TCFA estaban en lesiones con remodelado positivo, 3 en lesiones sin remodelado, y sólo uno en una lesión con remodelado negativo. No hubo ninguna complicación.

Conclusiones: La realización de IVUS-HV y OCT es posible y segura de forma combinada en el mismo procedimiento, junto a la angiografía y el tratamiento endovascular convencional. La información obtenida con las distintas técnicas es complementaria. Estas técnicas de imagen intravascular posibilitan identificar *in vivo* características propias de las placas que producen síndromes coronarios agudos.

TWEAK REGULA LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE PAI-1 Y TF EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR

B. Muñoz-García^a, J.L. Martín-Ventura^a, L. Ortega^b, J. Egidio^a y L.M. Blanco-Colio^a

^aLaboratorio de Patología Vascular. Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma. ^bHospital Clínico de San Carlos. Universidad Complutense. Madrid.

Objetivo: La aterotrombosis es una enfermedad progresiva de las arterias que puede dar lugar a eventos agudos mediante la formación de un trombo que ocluye el vaso. En este proceso se encuentra implicado entre otras moléculas el factor tisular (TF) y el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1). TWEAK es un miembro de la familia TNF, que a través de la unión con su receptor Fn14, regula multitud de actividades celulares implicadas en aterosclerosis. Nuestro objetivo es analizar el potencial efecto de TWEAK sobre la trombosis, y en concreto sobre la expresión y actividad de las moléculas procoagulantes PAI-1 y TF en células de músculo liso vascular (CMLV). Asimismo, analizamos la expresión de Fn14, PAI-1 y TF en placas ateroscleróticas humanas.

Materiales y métodos: Las muestras procedentes de endarterectomía carotídea fueron desparafinadas, rehidratadas e incubadas con los anticuerpos primarios durante toda la noche (anti-Fn14, anti-PAI-1 y anti-TF). La localización del anticuerpo se determinó mediante la adición del cromógeno diaminobenzidina (DAB). El análisis de imagen se realizó usando el software de Olympus Cue-2. Células de músculo liso vascular de origen aórtico humanas (CMLV) fueron incubadas con TWEAK (0,1 µg/mL), anticuerpo bloqueante de TWEAK (10 µg/mL), anticuerpo bloqueante de Fn14 (5 µg/mL) o inhibidor específico de ROCK (Y-27632). También se bloqueó la expresión de Fn14 mediante la transfección de las CMLV con siRNA frente a Fn14. La expresión génica se analizó mediante PCR a tiempo real. La liberación y la actividad de TF y PAI-1 se valoraron en el medio de cultivo mediante westernblot y/o kits comerciales, respectivamente.

Resultados: Mediante el análisis de la expresión de PAI-1, TF y Fn14 en placas ateroscleróticas carotídeas observamos una correlación positiva de Fn14 con PAI-1 y TF. El tratamiento de CMLV con TWEAK aumentó la expresión génica de TF y de PAI, así como su liberación y actividad en el medio de cultivo. Este efecto se revirtió mediante la preincubación de las células con anticuerpos bloqueantes de TWEAK y de Fn14. El mismo efecto se observó en células transfectadas con siRNA frente a Fn14, lo que indica de nuevo, que el efecto de TWEAK sobre PAI-1 y TF está mediado por su unión al receptor Fn14. En un estudio previo, habíamos observado que la incubación de CMLV con el inhibidor específico de ROCK (Y-27632) inhibía la expresión de Fn14, en este caso, estudiamos el efecto del tratamiento con Y-27632, observando que fue capaz de revertir el aumento en la expresión y actividad de PAI-1 y TF mediado por TWEAK.

Conclusión: TWEAK mediante la inducción de la expresión y actividad de PAI y TF, podría ser un mediador del proceso trombótico. En este sentido, un tratamiento que bloqueara la actividad del sistema TWEAK/Fn14 podría disminuir las complicaciones trombóticas asociados a la patología aterosclerótica.