



Hipertensión y riesgo vascular

www.elsevier.es/hipertension



COMUNICACIONES PÓSTER

18.ª Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión-Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial

Valencia, 6-8 de marzo de 2013

Investigación preclínica

1. REGULACIÓN POR ANGIOTENSINA II DE LA EXPRESIÓN VASCULAR DE COX-2, mPGES-1, NOX-1 Y NOX-4

A. Aguado¹, O. Zhenyukh¹, S. Martínez-Revelles¹, L. García-Redondo¹, R. Aras¹, R. Palacios², M.J. Alonso², A.M. Briones¹ y M. Salaices¹

¹Universidad Autónoma de Madrid, Madrid. ²Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón.

Introducción: Angiotensina II (Ang II) e interleuquina 1b (IL-1β) está implicadas en patologías cardiovasculares a través de sus acciones proinflamatorias. Entre ellas, se encuentran la inducción de enzimas inflamatorias, como la COX-2, que con el concurso de diferentes sintasas como las prostaglandina E sintasas (PGES), produce la liberación de prostanoïdes. Otra enzima inducida por Ang II e IL-1β es la NADPH Oxidasa, compuesta por distintas subunidades (NOX) que producen especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha propuesto la existencia de relación entre la expresión y/o activación de COX-2 y la producción de ROS.

Objetivos: Evaluar si Ang II induce un efecto sinérgico en las acciones proinflamatorias inducidas por IL-1β. Para ello, se investigará: 1) Si Ang II altera la expresión de COX-2, mPGES-1, NOX-1 y NOX-4 inducida por IL-1β. 2) Si existe relación entre la inducción de COX-2 y de las NOX. 3) El papel de los prostanoïdes derivados de COX-2 y de ROS en la migración y proliferación celular inducidas por dichos estímulos.

Métodos: Se utilizaron células musculares lisas de aorta de rata, que se estimularon con IL-1β o Ang II+IL-1β (4 o 24 h). Los niveles de mRNA y proteína se analizaron por qPCR y western blot, respectivamente. La actividad NADPH oxidasa mediante luminiscencia y la producción de ROS con dihidroetidio. La proliferación celular se midió con un kit comercial y la migración celular por wound healing.

Resultados: IL-1β (10 ng/ml) incrementó la expresión de COX-2, mPGES-1 y NOX-1, la actividad NADPH Oxidasa y la producción de ROS, y disminuyó la expresión de NOX-4. Ang II (0,1 mM) potenció la expresión de COX-2 y NOX-1, la actividad de NADPH oxidasa y la producción de ROS inducida por IL-1β, y disminuyó la expresión de mPGES-1. El efecto potenciador de Ang II sobre la expresión de

COX-2 se acompañó de un aumento en la estabilidad del mensajero. La potenciación de la expresión de COX-2 y NOX-1 inducida por Ang II se redujo por un inhibidor de ERK1/2, pero no por inhibidores de p38MAPK, de JNK o de PI3K. Ni los inhibidores de NADPH Oxidasa (apocinina y ML-171), ni de COX-2 (celecoxib) afectaron a la expresión de COX-2 o de NOX-1, respectivamente, inducida por Ang II+IL-1β. Ang II indujo también una potenciación de la migración, pero no de la proliferación celular inducida por IL-1β, que se bloqueó por celecoxib y por inhibidores del receptor TP y de la tromboxano sintasa, pero no por apocinina y ML-171.

Conclusiones: 1) Ang II modula diferentemente la expresión vascular de COX-2, mPGES-1, NOX-1 y NOX-4 inducida por IL-1b. 2) La potenciación de la expresión de COX-2 y NOX-1 inducida por Ang II está mediada por ERK1/2. Además, la potenciación de COX-2 se debe al aumento en la estabilidad del mensajero. 3) Ni las ROS derivadas de NADPH oxidasa ni los prostanoïdes derivados de COX-2 participan en la expresión de COX-2 y NOX-1, respectivamente, inducida por Ang II+IL-1β. 4) TXA₂ derivado de COX-2, pero no ROS, participa en la potenciación de la migración celular inducida por Ang II+IL-1β. Estos efectos podrían contribuir a las acciones proinflamatorias de Ang II en la pared vascular.

Subvencionado por MCINN (SAF 2009-07201 y Red RECAVA), FMM y Fundación Mapfre.

2. LA LAMINA A/C REGULA LA ACTIVACIÓN DE LA CÉLULA T, FUNCIÓN DE LA QUE ADOLECE EL MUTANTE DE LAMINA A/C CAUSANTE DEL SÍNDROME DE PROGERIA DE HUTCHINSON-GILFORD, PROGERINA

J.M. González Granado¹, C. Silvestre Roig¹, V. Rocha Perugini², L. Trigueros Motos¹, M. Blanco Berrocal¹, G. Morlino², D. Cibrán², C. López-Otin³, F. Sánchez Madrid² y V. Andrés¹

¹Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid. ²Hospital de la Princesa, Madrid. ³Universidad de Oviedo-IOUPA, Oviedo.

Introducción: La lamina A/C es un componente mayoritario de la envoltura nuclear que realiza funciones estructurales y de regulación de la síntesis de ADN, la repuesta al daño del ADN, la organización de la cromatina, la transcripción de genes, la progresión del ciclo celular y la diferenciación y la migración celular. Pese a que

las láminas de tipo A se expresan en la mayoría de las células diferenciadas se conoce muy poco sobre la expresión y el papel de la lámina A/C en el sistema inmune. La acumulación del mutante de lámina A, progerina, causa el síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS), una enfermedad rara caracterizada por producir envejecimiento prematuro, enfermedad cardiovascular y muerte a una edad media de 13 años. El ratón *Lmna*^{G609G/G609G} expresa y acumula progerina y presenta las principales manifestaciones clínicas de los pacientes de HGPS.

Objetivos: Estudiar el papel de la lamina A/C y el efecto de la progerina en la activación de la célula T tras el reconocimiento de un antígeno.

Métodos: Se han realizado estudios funcionales y moleculares empleando células T Jurkat que expresan de forma estable GFP, GFP-Lamina A o GFP-Progerina. También se han analizado esplenocitos procedentes de ratones carentes de lamina A/C u obtenidos del ratón progerico *Lmna*^{G609G/G609G} así como linfoblastos T humanos en los que se ha silenciado la expresión de lamina A/C.

Resultados: La lamina A/C se expresa en una fracción de células T CD4⁺ de ratón y humano. La activación de la célula T mediada por la estimulación del receptor de la célula T (TCR) produce la inducción de la expresión de la lamina A/C. Experimentos de ganancia y pérdida de función demuestran que la lamina A/C es a su vez un importante potenciador de la activación de la célula T. Los mecanismos moleculares implicados en el control de la lamina A/C en la activación de la célula T están relacionados con la modulación de la polimerización de actina, la activación de proteínas de señalización y el control de la posición y transcripción de genes entre otros mecanismos. A diferencia de los efectos de la expresión de lámina A/C en el sistema inmune, la acumulación de progerina no produce cambios en la polimerización de actina, la señalización celular, la transcripción y el posicionamiento de genes que provoquen una mayor activación de la célula T tras el reconocimiento de un antígeno.

Conclusiones: Nuestros experimentos atribuyen por primera vez un papel funcional de la lamina A/C en el sistema inmune como regulador de la activación de la célula T tras el reconocimiento de un antígeno. Además hemos observado una activación deficiente de las células T que expresan progerina, sugiriendo un nuevo mecanismo que podría contribuir a la etiopatogénesis del síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford.

3. AUMENTO DE LA LIBERACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO NEURONAL Y DISMINUCIÓN DE LA FUNCIÓN ADRENÉRGICA EN ARTERIA MESENTÉRICA DE RATA GESTANTE

E. Sastre¹, L. Caracuel¹, N. de las Heras², V. Lahera², G. Balfagón¹ y J. Blanco-Rivero¹

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid. ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Introducción: Durante las fases finales del embarazo se producen una serie de adaptaciones cardiovasculares con el fin de asegurar el aporte sanguíneo al feto, entre las cuales destaca un incremento importante del flujo sanguíneo. El tono vascular de la arteria mesentérica está regulado, entre otros factores, por los distintos tipos de innervación, principalmente, adrenérgica y nitrérgica. El objetivo del presente estudio fue analizar si la gestación afecta la respuesta vasomotora inducida por estimulación eléctrica (EE) en arteria mesentérica de rata, así como la participación de las innervaciones adrenérgica, y nitrérgica en estas posibles modificaciones.

Métodos: Se utilizó la arteria mesentérica superior de ratas hembra de la cepa Sprague-Dawley divididas en dos grupos experi-

mentales: 1) Hembras vírgenes en fase estro y 2) Ratatas gestantes en el día 18 de la gestación. Se analizaron las variaciones de la respuesta vasoconstrictora a EE (200 mA, 0,3 ms, 1-8 Hz, 30 s) en presencia/ausencia de 1 µmol/L del antagonista de los receptores α-adrenérgicos fentolamina y del inhibidor inespecífico de la óxido nítrico sintasa (NOS) L-NAME. Asimismo, se analizaron las respuestas vasomotoras a noradrenalina (NA) y al donante de óxido nítrico (NO) DEA-NO, así como la liberación de NO mediante fluorescencia.

Resultados: La respuesta contráctil inducida por EE fue significativamente menor en las ratas gestantes. La fentolamina redujo la respuesta a EE en ambos grupos, pero en menor medida en los animales gestantes. La respuesta contráctil a NA fue menor en las ratas gestantes. La contracción inducida por EE fue aumentada por L-NAME sólo en segmentos de animales gestantes. La vasodilatación inducida por DEA-NO fue similar en segmentos de ambos grupos experimentales, mientras que la liberación de NO inducida por EE fue mayor en las ratas gestantes.

Conclusiones: La disminución en la respuesta vasoconstrictora a EE en arteria mesentérica de rata gestante, producida por el incremento en la liberación de NO de origen neuronal, y la disminución de la función de la innervación adrenérgica, podrían contribuir a la marcada vasodilatación característica de la gestación.

Subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009-10374) y el Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2012-38530).

4. LA EPLERENONA ATENÚA LA ESTEATOSIS Y APOPTOSIS CARDÍACA EN LA RATA DIABÉTICA TIPO-II OBESA

E. Ramírez Bustillo¹, S. Ares Carrasco¹, B. Picatoste Botija¹, A. Caro Vadillo², J. Tuñón Fernández¹ y O. Lorenzo González¹

¹IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid. ²Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid.

Introducción: La esteatosis y la apoptosis cardíaca son procesos clave en la miocardiopatía diabética, sin embargo aún no se cuenta con una terapia efectiva. El bloqueante específico del receptor de aldosterona, eplerenona, ha demostrado propiedades anti-fibróticas en el corazón diabético.

Objetivos: Estudiar el papel de la eplerenona en los procesos de esteatosis y apoptosis cardíaca asociados a diabetes tipo-II obesa.

Métodos: Se utilizó un modelo de ratas ZDF (Zucker diabetic fatty) no hipertensas compuesto por veinte ratas ZDF y diez ZL (Zucker lean). Una vez establecida la diabetes, diez ratas ZDF recibieron eplerenona (25 mg/Kg/día). Tras 16 semanas de tratamiento se examinó la estructura y función cardíaca, y se aislaron los corazones y plasmas para posteriores estudios histológicos y bioquímicos. La línea celular de cardiomiocitos H9c2 se utilizó para los ensayos *in vitro*.

Resultados: En comparación con las ratas ZL, las ZDF mostraron hiperglicemia e hiperlipidemia. Los corazones ZDF presentaron esteatosis e incremento de moléculas transportadoras de ácidos grasos (FAT/CD36, FABP3) y enzimas de la β-oxidación (ACADL, ACADM). Además, apoptosis y activación de la vía pro-apoptótica Fas. El tratamiento con eplerenona atenuó la hiperlipidemia, esteatosis y expresión de FAT/CD36 y FABP3. Además, aminó la apoptosis y la activación del sistema Fas. En cardiomiocitos, elevadas concentraciones de palmitato produjeron un incremento en la entrada y acumulación de ácidos grasos así como de apoptosis pero a través de un mecanismo independiente de Fas. Interesantemente, la coestimulación con eplerenona mitigó estos efectos.

Conclusiones: La diabetes tipo-II experimental asociada a obesidad produce esteatosis y apoptosis cardíacas. Sin embargo, el tratamiento con eplerenona atenúa estas respuestas a través de la inhibición de factores pro-esteatóticos y apoptóticos.

5. PAPEL DE LA LIPOCALINA ASOCIADA A GELATINASA DE NEUTRÓFILOS (NGAL) EN EL REMODELADO CARDIOVASCULAR INDUCIDO POR LA ALDOSTERONA

A. Tarjus¹, S. El Moghrabi¹, C. Latouche¹, P. Rossignol², F. Zannad², N. Farman¹, N. López-Andrés³ y F. Jaisser¹

¹Centre de Recherches des Cordeliers, Inserm U872 Équipe 1, Paris. ²Inserm U961, Nancy. ³Centro de Investigación Biomédica, Navarra Biomed, Pamplona.

Introducción: La lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) es una proteína circulante que pertenece a la familia de lipocalinas y se une a la metaloproteínasa-9 modulando su estabilidad y actividad. Nuestro grupo ha descrito que NGAL es una diana de la aldosterona y de su receptor mineralocorticoide en células endoteliales, células de músculo liso vascular y cardiomiocitos.

Objetivos: NGAL puede ser un mediador de los efectos profibroticos y proinflamatorios inducidos por la aldosterona a través de los receptores de mineralocorticoides en el sistema cardiovascular.

Métodos: Ratones Wild type (WT) y Knock Out (KO) para NGAL se nefrectomizaron y fueron tratados con aldosterona + sal (200 µg/kg/día de aldosterona, 1% NaCl) durante 4 semanas. La presión arterial se midió por pletismografía en la cola y la reactividad vascular se analizó por miografía. La fibrosis y la inflamación se cuantificaron por RT-PCR, western blot, inmunohistoquímica y ELISA.

Resultados: En ratones nefrectomizados, la administración de aldosterona + sal incrementó la presión arterial sólo en los ratones WT, mientras que el peso relativo del corazón aumentó tanto en los ratones WT como NGAL KO. La contracción inducida por fenilefrina y cloruro potásico fue mayor en la aorta de los ratones WT y NGAL KO tratados con aldosterona + sal en la misma medida. Las respuestas a los vasodilatadores (acetilcolina y nitroprusiato sódico) disminuyeron en los animales tratados con aldosterona + sal en ambos grupos de animales. La administración de aldosterona + sal aumentó el péptido N-terminal del colágeno de tipo I en los ratones WT pero no en los animales KO. Sólo los ratones WT tratados con aldosterona + sal presentaron un aumento de la fibrosis perivascular, de la expresión del colágeno de tipo I y de las lesiones inflamatorias en el corazón. En la aorta, solo los ratones WT tratados con aldosterona + sal presentaron un aumento de la fibrosis, de la expresión del colágeno de tipo I y de la osteopontina.

Conclusiones: La inactivación de NGAL previene la fibrosis inducida por la administración de aldosterona + sal en ratones nefrectomizados. Nuestros resultados sugieren que NGAL juega un papel clave en la fibrosis y la inflamación inducidas por la aldosterona a través de los receptores mineralocorticoides. En consecuencia, NGAL podría ser, potencialmente, una nueva diana terapéutica para prevenir la fibrosis y la inflamación cardiovascular.

6. LA COLESTASIS EXTRAHEPÁTICA A LARGO PLAZO DISMINUYE LA RESPUESTA VASOCONSTRICTORA A FENILEFRINA EN ARTERIA MESENTÉRICA DE RESISTENCIA DE RATA

L. Caracul¹, E. Sastre¹, I. Prieto², V. Lahera³, M.A. Aller⁴, J. Arias⁴, G. Balfagón¹ y J. Blanco-Rivero¹

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid. ²Hospital Universitario La Paz, Madrid. ³Departamento de Fisiología; ⁴Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Introducción: La colestasis obstructiva se caracteriza clínicamente por ictericia, acoluria, acolia, cirrosis hepática e hiperten-

sión portal, causando una alta tasa de morbi-mortalidad en el área clínica humana. La colestasis extrahepática experimental es el modelo más utilizado para estudiar la colestasis obstructiva, ya que cursa con un Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS), caracterizada por circulación hiperdinámica, hiperactividad simpática periférica y disfunción multiorgánica. El objetivo del presente estudio fue analizar las posibles alteraciones en la función vascular producidas por la colestasis extrahepática a largo plazo.

Métodos: Se utilizaron segmentos de arteria mesentérica de resistencia (AMR) de ratas macho de la cepa Wistar, divididas en dos grupos experimentales: 1) ratas sometidas a colestasis extrahepática microquirúrgica (8 semanas de post-operatorio) y 2) ratas control pseudo-operadas. Se realizaron los estudios de reactividad vascular mediante miografía de alambres. Se analizó la respuesta vasodilatadora a acetilcolina (ACh) y la respuesta contráctil a fenilefrina (Phe) en presencia/ausencia del inhibidor no selectivo de la sintasa de óxido nítrico (NOS) L-NAME (100 µM) y del inhibidor inespecífico de la ciclooxigenasa, indometacina (10 µM).

Resultados: La colestasis extrahepática no modificó la relajación dependiente de endotelio mediada por ACh en AMR. La respuesta contráctil inducida por Phe fue menor en segmentos arteriales de ratas colestáticas. La incubación con L-NAME aumentó la contracción inducida por Phe de manera similar en ambos grupos experimentales. La incubación con indometacina únicamente disminuyó la respuesta contráctil a Phe en arterias de animales pseudo-operados.

Conclusiones: La disminución en la respuesta vasoconstrictora a Phe en AMR de rata sometida a colestasis extrahepática podría ser debida a una disminución en la liberación y/o respuesta de prostanoïdes de naturaleza contráctil, descartándose la participación del NO en esta respuesta contráctil.

Subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2009-10374, SAF2012-38530).

7. RELACIÓN ENTRE ESTRÉS OXIDATIVO Y ALTERACIONES MECÁNICAS VASCULARES EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE PROGRAMACIÓN FETAL DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

P. Rodríguez Rodríguez¹, Y. Gutiérrez Arzapalo¹, D. Muñoz Valverde², L. López de Pablo León¹, M.C. González García¹, M.R. López Giménez³ y S.M. Arribas Rodríguez¹

¹Departamento de Fisiología; ²Facultad de Medicina-Gabinete Veterinario; ³Medicina Preventiva y Salud Pública (UAM), Madrid.

Introducción: El crecimiento intrauterino adverso se asocia con bajo peso al nacer y el desarrollo posterior de hipertensión y enfermedades cardiovasculares (ECV), conocido como programación fetal de la ECV. En humanos y en modelos experimentales de programación fetal se ha encontrado disfunción endotelial y alteraciones estructurales y mecánicas vasculares (Martyn et al. Br Heart J. 1995;73:116-21; Nuyt. Clinical Science. 2008;114:1-17; Oren et al. Am J Hypertens. 2003;16:76-9; Poston. Microcirculation. 2011;18:256-66). El estrés oxidativo está en la base de numerosas patologías, incluida la ECV por lo que es plausible que el estrés oxidativo sea el denominador común de las alteraciones cardiovasculares asociadas a la programación fetal. Nuestro objetivo fue determinar en un modelo experimental de programación fetal inducido por restricción nutricional durante la gestación si a edades tempranas se producen alteraciones mecánicas o estructurales vasculares y su asociación con biomarcadores séricos de estrés oxidativo.

Métodos: Ratras Sprague Dawley se sometieron a restricción nutricional durante la gestación (reducción del 50% de ingesta diaria entre los días 10-21 de gestación, ratas R) o con dieta ad libitum (ratas control, C). La descendencia se utilizó a los 21 días de edad. En estas ratas se determinó el peso, longitud de la tibia, longitud de la aorta in situ y su retracción elástica tras la disección y se obtuvo una muestra de sangre. En el plasma se determinaron carbonilos, glutatión y tioles mediante técnicas de espectrofotometría y se estudió la mecánica pasiva de la aorta en un sistema de medida de la tensión isométrica en ausencia de calcio.

Resultados: Comparadas con ratas C, la descendencia de ratas R presentó al destete: 1) menor peso corporal y similar longitud de la tibia; 2) menor retracción de la aorta $R = 19,7 \pm 0,8$; $C = 22,6 \pm 0,9$.

Conclusiones: La desnutrición durante la gestación produce en edades tempranas bajo peso, alteraciones mecánicas vasculares y un aumento del daño oxidativo a pesar de la elevación (probablemente compensatoria) de algunos sistemas de defensa antioxidante. Estas alteraciones pueden estar relacionadas con el desarrollo de hipertensión y ECV en la edad adulta.

Financiación: Plan Nacional (FEM2009-13434-C02-02 y FEM2012-37634-C03-01).

8. MODIFICACIONES EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN PACIENTES CON ANEURISMA DE AORTA ASCENDENTE CON VÁLVULA AÓRTICA BICÚSPIDE RESPECTO A TRICÚSPIDE

J. Modrego¹, J. Cobiella², A. Segura³, J. Silva², L. Maroto², A. Ayaón², N. de las Heras⁴, V. Lahera⁴, E. Rodríguez² y A. López Farré¹

¹Unidad de Investigación Cardiovascular, Servicio de Cardiología;

²Servicio de Cirugía Cardíaca, Instituto Cardiovascular, Hospital Clínico San Carlos, Madrid. ³Instituto de Ciencias de la Salud, Talavera de la Reina, Toledo. ⁴Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Los aneurismas aórticos torácicos de pacientes con válvula aórtica bicúspide se desarrollan con anterioridad que en pacientes con válvula aórtica tricúspide. Este hecho podría deberse a diferencias hemodinámicas del flujo sanguíneo al verse modificada la válvula aórtica e incluso a diferente carga hipertensiva entre ambos grupos de pacientes. Los mecanismos moleculares por los que sucede este hecho aún no están claramente establecidos. Nuestro objetivo fue analizar si existían diferencias en la expresión de proteínas relacionadas con el citoesqueleto y el metabolismo energético en aneurismas aórticos torácicos entre pacientes con válvula aórtica bicúspide y tricúspide. Los aneurismas aórticos torácicos se obtuvieron de 12 pacientes con válvula aórtica bicúspide y 11 pacientes con válvula aórtica tricúspide durante la sustitución de la válvula aórtica con reconstitución de la aorta ascendente dilatada. Existía una mayor proporción de pacientes hipertensos en el grupo tricúspide (9/11) respecto al bicúspide (3/12). Las proteínas fueron analizadas usando electroforesis bidimensional, espectrometría de masas y Western blotting. La vimentina fue la única proteína relacionada con el citoesqueleto cuya expresión era diferente entre ambos grupos de pacientes. Se observó reducción en la expresión del transportador de glucosa (GLUT-1) y un incremento en la isoforma 1 de la triosafosfato isomerasa, isoforma 1 de la a-enolasa y en la piruvato quinasa en el grupo bicúspide respecto al tricúspide. Sin embargo, las actividades enzimáticas tanto de la triosafosfato isomerasa como de la piruvato deshidrogenasa estaban reducidas en el grupo bicúspide

respecto al tricúspide. Además, el contenido de piruvato, contenido de lactato, y actividad de la lactato deshidrogenasa era mayor en el grupo bicúspide comparado con el tricúspide. Aunque en el aneurisma proveniente de pacientes con válvula aórtica bicúspide existía un mayor contenido de TGF- β 1, este hecho no se correlacionó mediante el test de Spearman con el aparente estado anaeróbico del aneurisma aórtico. Estos resultados sugieren que el metabolismo de la glucosa en aneurismas aórticos torácicos puede diferir entre pacientes con válvula aórtica bicúspide y pacientes con válvula aórtica tricúspide. Esto puede contribuir a la temprana formación del aneurisma en pacientes con válvula aórtica bicúspide.

9. LA TESTOSTERONA REDUCE LA ACTIVIDAD METABÓLICA DE LAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE PACIENTES DIABÉTICOS E HIPERTENSOS CON ISQUEMIA CORONARIA ESTABLE

P. Rodríguez¹, J.J. Zamorano-León¹, J. Modrego¹, L. Azcona¹, C. Macaya¹, N. de las Heras², V. Lahera² y A. López-Farré¹

¹Unidad de Investigación Cardiovascular, Servicio de Cardiología, Instituto Cardiovascular, Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

La testosterona es un marcador de protección cardiovascular cuyos niveles decrecen con la edad y también en pacientes con factores de riesgo cardiovascular como es el caso de la hipertensión arterial. No se ha descrito si la testosterona podría modificar la expresión de enzimas implicadas en el metabolismo energético de las células mononucleares, células directamente implicadas en el desarrollo de la placa ateromatosa, en pacientes diabéticos e hipertensos con un elevado riesgo cardiovascular. El objetivo de este estudio fue analizar in vitro el efecto de la testosterona sobre la expresión de proteínas asociadas al metabolismo energético en células mononucleares de pacientes con enfermedad coronaria estable, determinando si este efecto es más evidente en pacientes de mayor riesgo cardiovascular como los pacientes diabéticos e hipertensos (D+H). Para realizar el estudio se obtuvieron células mononucleares de pacientes D+H (n = 12) y no D+H (n = 12) que fueron incubados en presencia o ausencia de testosterona 10 nmol/L. Se realizó el análisis proteómico de las células mononucleares de cada grupo mediante electroforesis bidimensional (IPG 17 cm, pH 3-10). En ausencia de testosterona se observó una mayor expresión de alfa-enolasa (D + H: $26,29 \pm 5,54$ vs no D + H: $11,81 \pm 4,57$, $p = 0,037$) y de succinil CoA sintetasa (D + H: $56,75 \pm 19,50$ vs no D + H: $19,58 \pm 5,40$, $p = 0,048$), enzimas fundamentales en la glicólisis y ciclo de Krebs respectivamente, en las células mononucleares de D + H al compararlo con los no D + H. No se observaron cambios significativos en otras enzimas metabólicas analizadas como piruvato deshidrogenasa, piruvato quinasa, lactato deshidrogenasa, ATP sintasa, ubiquinol reductasa, fructosa 2,6 bifosfato aldolasa o gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa. En presencia de testosterona, en los pacientes D + H se observó una reducción de la expresión de alfa-enolasa y succinil CoA sintetasa hasta niveles semejantes a los no D+H. En células mononucleares de pacientes no D + H, la presencia de 10 nmol/L de testosterona no modificó la expresión de ninguna de las enzimas analizadas. Como conclusión se ha detectado un aumento de la expresión de algunas enzimas implicadas en la glicólisis y ciclo de Krebs en células mononucleares de pacientes D + H en condiciones fisiológicas. La testosterona parece capaz de regular este aumento metabólico lo que provocaría una menor activación de las células mononucleares de pacientes diabéticos con hipertensión y enfermedad coronaria establecida.

10. HIPERURICEMIA RELACIONADA CON FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

L.A. Matos de la Cruz, L.J. Erazo García, K.M. Ruiz Ribero, A. González Albert, V. Valerio Urena, A. Zaragoza Ripoll, D. Crespo Álvarez, R. Suero Sierra, A. Bruján García y J.E. Pereñíguez Barranco

Centro de Salud Espinardo, Murcia.

Objetivos: Numerosos estudios epidemiológicos han comprobado la relación entre la hiperuricemia y los factores de riesgo cardiovascular, como la HTA, diabetes, el síndrome metabólico, y la enfermedad renal. Evaluamos la asociación de hiperuricemia con dichos factores.

Métodos: Se estudian 2 cupos de medicina de familia (MF) compuestos por 2.911 pacientes mayores de 14 años, el total de hiperuricemia asciende a 467 (16,04%). Utilizando criterios de garantía de calidad resultando una muestra de 140, elegidos de forma aleatoria 1 de cada 3, los cuales serán motivos de nuestro estudio.

Resultados: Tomamos como referencia valores de ácido úrico > 6 mg/dl (20,6%), entre 7 y 9 mg/dl (70,2%), > 10 (8,5%), de éstos el 28,4% desarrollaron gota. Los grupos de edad son: 65 años 34%. Formados por 105 hombres (74,5%) y 35 mujeres (24,8%). Se observan las siguientes relaciones: el 25,8% son diabéticos tipo II de los cuales el 39,1% está diagnosticado desde hace más de 5 años, el 59,2% < 5 años. De los no diabéticos el 16,3% presenta una glucemia basal alterada. Son hipertensos 61,7%, de los cuales 46% diagnosticados hace más de 5 años. El 58% presentan dislipemia, el 43,3% tienen síndrome metabólico, y 14,9% presenta insuficiencia renal crónica.

Conclusiones: La asociación más importante de la hiperuricemia la encontramos con la HTA, seguido de hiperlipidemia, síndrome metabólico y diabetes. En cuanto al tiempo de diagnóstico la hiperuricemia en aproximadamente la mitad de los casos fue diagnosticada primero que los factores de riesgo antes mencionados. A la luz de los resultados obtenidos la hiperuricemia podría ser un indicador de futuros factores de riesgo cardiovascular.

11. ANGIOTENSINA II INDUCE LA SÍNTESIS Y EXPRESIÓN DE GREMLIN EN EL RIÑÓN

C. Lavoz Barria¹, R. Rodríguez Díez¹, J. Egido², S. Mezzano³ y M. Ruiz Ortega¹

¹Laboratorio de Biología Celular y Enfermedades Renales;

²Laboratorio de Enfermedades Renales, Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid. ³Departamento de Nefrología, Escuela de Medicina, Universidad Austral, Valdivia, Chile.

Introducción: El estudio del rol de angiotensina II (AngII) en la progresión de la enfermedad renal es un campo muy activo de investigación en biomedicina. Los fármacos que bloquean el sistema renina-angiotensina (SRA) es una de las mejores estrategias terapéuticas empleadas en clínica para el tratamiento de pacientes con enfermedades renales crónicas. Gremlin es un gen de desarrollo que se re-exprende en situaciones patológicas, incluida la enfermedad renal, y se ha sugerido que es un mediador del daño en nefropatía diabética. Recientemente, hemos descrito que Gremlin actúa como un mediador de las acciones fibróticas de TGF- β en células renales.

Objetivos: Investigar la relación entre AngII y Gremlin en riñón. Para ello, evaluamos si AngII es capaz de regular su expresión y síntesis renal, y si este factor es un mediador de alguna de las acciones inducidas por AngII.

Métodos: Modelo de infusión sistémica de AngII en ratas Wistar de 3 meses de edad (minibombas osmóticas subcutáneas) a 100 ng/kg/min durante 2 semanas. Algunos animales fueron tratados

diariamente con el antagonista AT1 valsartán (10 mg/kg día en el agua de bebida), empezando un día antes de la infusión de AngII. Como control se utilizaron ratas infundidas con salino de la misma edad ($n = 8$ animales por grupo). Modelo de obstrucción ureteral unilateral (UUO) en ratones C57BL/6 machos, no tratados o tratados con el antagonista AT1 losartán (10 mg/kg día en el agua de bebida), y estudiados a los 5 días. Los estudios *in vitro* se realizaron en células túbulo epiteliales humanas (línea HK-2) tratadas con AngII (10^{-7} mol/L) durante 24 o 48 horas y realizamos el bloqueo de Gremlin utilizando un RNA de interferencia pequeño (siRNA). Los resultados fueron analizados por diferentes técnicas (Western blot, PCR en tiempo real, Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia).

Resultados: En el riñón de ratas infundidas con AngII se indujo la expresión génica de Gremlin, que no aparece en los animales control. Mediante tinción inmunohistoquímica observamos que en respuesta a AngII existe un aumento en la síntesis renal de Gremlin localizada principalmente en células tubulares. Este aumento se correlacionó con la presencia de fibrosis túbulo intersticial. El bloqueo del receptor AT1 disminuyó los niveles de Gremlin (mRNA y proteína) hasta niveles similares a los controles. En el modelo de daño renal por obstrucción del uréter se observaron niveles elevados génicos y proteicos de Gremlin, que se revertieron con losartán. En células HK-2, AngII produce un aumento de Gremlin tanto a nivel génico como de proteína. La estimulación con Gremlin induce la transición epitelio mesenquimal (TEM) de estas células. El bloqueo de Gremlin mediante silenciamiento génico inhibió la TEM causada por AngII. En células transfectadas con un siRNA frente a Gremlin, que inhibe su expresión génica, bloqueó el aumento en la expresión del marcador mesenquimático vimentina y del factor profibrótico fibronectina, inducidos por AngII, comparado con células transfectadas con un siRNA control y estimuladas con AngII.

Conclusiones: Estos datos sugieren que angiotensina II modula la expresión de Gremlin en el riñón y proponen a Gremlin como una diana terapéutica en enfermedades renales.

12. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA DISMINUCIÓN DE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA INDUCIDA POR L-CARNITINA

A.J. Blanca Lobato¹, M.V. Ruiz Armenta¹, S. Zambrano Sevilla¹, A. Mate Barrero¹, E. Revilla Torres² y C.M. Vázquez Cueto¹

¹Departamento de Fisiología; ²Departamento de Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla.

Objetivos: Es bien conocida la afectación de órganos diana, como el corazón y riñón, como consecuencia de un incremento continuado en las cifras de presión arterial. La L-carnitina es una molécula con propiedad antihipertensiva y antioxidante entre otras, pero no se han descrito las señales intracelulares implicadas al respecto. Teniendo en cuenta que uno de los principales factores implicados en el origen y desarrollo de la hipertensión arterial es el aumento en la producción de anión superóxido, nuestro objetivo ha sido evaluar las señales intracelulares por las cuales la L-carnitina podría actuar atenuando el aumento en la producción de dicho anión.

Métodos: Se han usado células epiteliales renales (NRK-52E) estimuladas con angiotensina II (Ang II), estableciéndose de este modo un fenotipo hipertensivo en el cual se produce un aumento en la producción de anión superóxido. La producción de anión superóxido se ha determinado mediante quimioluminiscencia empleando lucigenina, analizándose el efecto de inhibidores específicos de proteínas claves en diferentes rutas de señalización: vía PI3K/Akt (wortmanina), vía p38 MAPK (SB203580), vía ERKs (PD98059), vía de la PKC (BIS I). Además, se han utilizado otros in-

hibidores para determinar la fuente de producción de anión superóxido (rotenona, oxipurinol y DPI).

Resultados: Los resultados muestran que la mayor parte de anión superóxido generado tras la estimulación con Ang II proviene de la enzima NADPH oxidasa. Esta producción de superóxido se ve disminuida por la adición de L-carnitina. La presencia de los inhibidores específicos de las rutas de señalización intracelular mencionados anteriormente reduce la producción de anión superóxido inducida por angiotensina, sugiriendo a estas rutas como posibles vías de actuación de la L-carnitina.

Conclusiones: En la línea celular NRK-52E, la L-carnitina atenúa la producción de anión superóxido proveniente de la enzima NADPH oxidasa e inducida por Ang II, estando las vías de señalización PI3K/Akt, PKC, p38 MAPK y ERKs implicadas en tal efecto.

Agradecimientos: Instituto de Salud Carlos III-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación, PN de I+D+I 2008-2011 (PS09/01395).

13. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN RATÓN TRANSGÉNICO QUE SOBREEXPRESA LA LISIL OXIDASA EN CÉLULA MUSCULAR LISA VASCULAR

M. Orriols¹, A. Guadall¹, A. de Diego², M.A. Navarro³, P. Muniesa³, J. Osada³, J. Martínez González¹ y C. Rodríguez¹

¹Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC), IIB-Sant Pau, Barcelona. ²Unidad de transgénesis del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza. ³Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza y CIBEROBN, Zaragoza.

Introducción y objetivos: La lisil oxidasa (LOX), enzima clave en la síntesis y maduración de la matriz extracelular, juega un papel relevante en el mantenimiento de la homeostasis vascular. Asimismo, este es un enzima multifuncional que controla la actividad biológica de factores de crecimiento y regula la expresión génica a través de mecanismos poco estudiados y relacionados con su localización nuclear. Actualmente se desconocen en gran medida los mecanismos a través de los cuales la LOX regula la expresión génica, la identidad de sus genes diana y las consecuencias que la actividad nuclear de la LOX puede tener sobre la funcionalidad de las células vasculares. El objetivo de este estudio ha sido generar un modelo de ratón transgénico que sobre-expresa LOX humana en células musculares lisas vasculares (CMLV), para analizar las consecuencias de dicha sobre-expresión sobre la función vascular y la expresión de genes clave en la progresión y estabilidad de la lesión aterosclerótica.

Métodos: La secuencia codificante para la lisil oxidasa humana (hLOX) se situó bajo el control de un promotor mínimo de SM22a, y la construcción resultante se microinyectó en el pronúcleo de un cigoto fertilizado procedente de una hembra de la cepa Balb/c. Se obtuvieron 3 animales fundadores que se retrocruzaron con ratones C57BL/6J para dar lugar a 3 líneas estables de ratones transgénicos con expresión dirigida a CML (Tg-hLOX^{SMC}). La sobre-expresión del transgén se analizó mediante PCR a tiempo real e inmunohistoquímica. Mediante la técnica de explantes se obtuvieron CMLV de la aorta de animales control y Tg-LOX^{SMC}. En estas células se analizó el patrón de expresión de la LOX mediante PCR a tiempo real, western blot e inmunocitoquímica. La funcionalidad de la proteína secretada se caracterizó analizando su capacidad de inducir la polimerización de colágeno soluble.

Resultados: Se generaron tres líneas de ratones transgénicos Tg-LOX^{SMC} fenotípicamente normales que sobrevivieron sin desarrollar malformaciones y sin problemas para procrear. El análisis por PCR a tiempo real demostró que LOX se expresaba fundamentalmente a nivel vascular, tal y como también determinaron los estudios inmunohistoquímicos en aorta y en la arteria carótida. Asimismo, tal y

como cabía esperar, se detectó una fuerte expresión del transgén en otros tejidos ricos en CML como en útero y vejiga. Las CMLV obtenidas a partir de los animales transgénicos presentaban un incremento en la expresión de LOX evaluada por PCR a tiempo real y western blot, así como una mayor secreción de este enzima al medio de cultivo. La proteína LOX secretada por estas células es funcional ya que los sobrenadantes procedentes de CMLV obtenidas a partir de ratones Tg-LOX^{SMC} indujeron una polimerización de colágeno superior a la inducida por aquellos procedentes de animales control.

Conclusiones: Se ha generado un ratón transgénico para la LOX que constituirá un modelo útil para evaluar el papel de este enzima en el control de la función vascular.

14. CROCETINA, UN CAROTENOIDE DERIVADO DEL AZAFRÁN (CROCUS SATIVUS L.), MEJORA LA RELAJACIÓN VASCULAR INDUCIDA POR ACETILCOLINA EN HIPERTENSIÓN

A. Mancini¹, M. Carmona², M. Carmona³, J. Serrano-Díaz², G.L. Alonso², E. Nava⁴ y S. Llorens⁴

¹Universidad de L'Aquila, L'Aquila. ²ETS Ingenieros Agrónomos, Albacete. ³Parque Tecnológico y Científico de Albacete, Albacete.

⁴Facultad de Medicina, Albacete.

Objetivos: Está bien establecido que la disfunción endotelial (DE) es un reflejo de la fisiopatología vascular. Esta DE, en experimentación *ex vivo*, está marcada por una deficiente respuesta vasodilatadora. En hipertensión (HT) se observa alteración de la vasorrelajación (VR), asociada normalmente a una menor biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) por tanto, estudios que provean información sobre agentes que mejoren la VR son necesarios, por su potencial beneficio en el tratamiento de la enfermedad vascular. En este sentido, varios trabajos indican que el azafrán (*Crocus sativus* L. (AZ)) posee propiedades hipotensoras, pero no se conocen los mecanismos vasculares subyacentes. El objetivo de este trabajo es estudiar si el AZ y uno de sus constituyentes, la crocetina (CCT), el compuesto bioactivo del AZ que pasa al torrente circulatorio tras el metabolismo, pueden mejorar la vasodilatación en HT.

Métodos: Se ha estudiado mediante miografía la VR en segmentos de aorta (AO) torácica procedentes de ratas Wistar (W), como control de normotensión (NT) y de ratas SHR (S), como control de HT. Se ha ensayado la respuesta vasodilatadora inducida por dosis crecientes de acetilcolina (ACH, 10⁻⁹-10⁻⁵M) en presencia o ausencia de crocetina (CCT) o azafrán (AZ) a la concentración de 1.2 × 10⁻⁵M. Se valoraron las vías de la óxido nítrico sintasa (NOS) y de la ciclooxigenasa (COX), realizando las curvas anteriores en presencia de los inhibidores L-NAME e Indometacina (IND), respectivamente. Se ha analizado el efecto máximo (E_{máx}) producido por la ACH y la potencia del fármaco (pD₂) en las diferentes condiciones experimentales. La CCT y AZ se extrajeron en fase acuosa. El cálculo para la comparación de las dosis suministradas, se determinó mediante espectrometría (Ultravioleta-Visible, UV-Vis) y cromatografía (HPLC-DAD).

Resultados: La VR inducida por la ACH fue significativamente menor en AO de ratas S (E_{máx} = 51 ± 2) que en la de W (E_{máx} = 81 ± 3). El AZ no modificó la VR de la AO ni en W (E_{máx} = 87 ± 2) ni en S (E_{máx} = 58 ± 7). La CCT mejoró significativamente la VR en la aorta de ratas W (E_{máx} = 94 ± 1) y de S (E_{máx} = 78 ± 4), siendo más importante el incremento producido en las últimas. L-NAME abolió la respuesta inducida por la ACH, en presencia y ausencia de AZ y CCT. En presencia de IND, la VR aumentó en AO de ratas W (E_{máx} = 90 ± 2) y de S (E_{máx} = 91 ± 1), siendo más notable este aumento en S, esta

respuesta no se modificó por la adición de CCT. Sin embargo, la adición de AZ, disminuyó el efecto producido por la IND en S ($E_{\text{máx}} = 85 \pm 3$), no produciendo cambios en W.

Conclusiones: La CCT produce una importante mejora en la VR aórtica inducida por la ACH en HT y en menor grado, también en NT. En este efecto de la CCT, no están implicadas las vías endoteliales de la NOS y COX. El AZ solo tuvo resultado activo en HT cuando se inhibió la COX, es probable que algún otro compuesto, de todos los que conforman su compleja composición, actúe impidiendo la acción vasodilatadora de la CCT y además esta acción, al menos en HT, podría implicar la liberación de un factor vasoconstrictor independiente de la vía de la COX o el bloqueo de algún canal que dirija hiperpolarización dependiente de endotelio. Se requiere más investigación para esclarecer los mecanismos involucrados en estas acciones. Aun así, este estudio provee evidencias del potencial efecto terapéutico de la CCT aislada en HT.

15. EFECTOS ANTIATEROSCLERÓTICOS DE UN EXTRACTO CON ALTO CONTENIDO EN POLIFENOLES OBTENIDO DE LA FIBRA INSOLUBLE DE ALGARROBA (FIA): IMPLICACIÓN DE SIRT1

M. Valero Muñoz¹, S. Ballesteros¹, B. Martín Fernández¹, L. Pérez Olleros², B. Ruiz Roso², V. Lahera¹ y N. de las Heras¹

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina;

²Departamento de Nutrición y Bromatología I, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid.

Objetivos: El objetivo de nuestro estudio fue evaluar los efectos potenciales de una fibra dietética insoluble obtenida de pulpa de algarroba (FIA) con alto contenido (> 80%) en polifenoles sobre las alteraciones estructurales, funcionales y moleculares asociadas con el desarrollo de la aterosclerosis en conejos con dislipemia mixta. Así mismo, estudiamos la expresión vascular de SIRT1, que podría actuar como posible mediador de estos efectos.

Métodos: Para llevar a cabo el estudio se utilizaron conejos New Zealand alimentados durante 8 semanas con dieta estándar (CT: control) o experimental (DL: 0,5% colesterol y 14% aceite de coco). La mitad de animales DL fue tratado simultáneamente con FIA (1 g/Kg/día) (DL+ FIA). Al final del tratamiento se determinó el área de lesión aterosclerótica, la función endotelial y la expresión proteica de marcadores de inflamación (CD36, TNF- α y PAI1) y fibrosis (TGF- β y colágeno-I) y SIRT1 en aorta.

Resultados: El área de lesión aterosclerótica fue $14,01 \pm 2,55\%$ en DL e inexistente en CT y se redujo ($p < 0,05$) en los animales tratados con FIA (DL+FIA: $2.59 \pm 0.89\%$). La relajación dependiente de endotelio inducida por acetilcolina fue menor ($p < 0,05$) en DL que en CT y se normalizó con FIA. Asimismo, la expresión vascular de eNOS, disminuida en DL, se normalizó en los animales tratados con FIA. La expresión vascular de mediadores inflamatorios (CD36, TNF- α y PAI1), y fibróticos (TGF- β y colágeno-I) fue mayor ($p < 0,05$) en DL que en CT. FIA normalizó todos los parámetros anteriores ($p < 0,05$). La expresión de SIRT1 fue menor ($p < 0,05$) en animales DL que en CT. El tratamiento con FIA aumentó significativamente la expresión vascular de SIRT1 en conejos DL.

Conclusiones: El tratamiento con FIA disminuye el desarrollo aterosclerótico en conejos dislipémicos, como demuestran la reducción del área de lesión aterosclerótica, la mejora de la función endotelial y la disminución de los mediadores inflamatorios y fibróticos en estos animales. Dado el alto contenido de polifenoles de FIA, y el demostrado efecto estimulador que algunos de ellos ejercen sobre SIRT1, se podría proponer que los efectos anti-ateroscle-

róticos observados de FIA podrían ser mediados, al menos en parte, por la estimulación de los polifenoles sobre la expresión vascular de SIRT1.

16. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN UN MODELO GENÉTICO DE MICROALBUMINURIA

H. Pulido Olmo¹, C. Steireif², C. Fernández García-Prieto³, B. Somoza³, L.M. Ruilope⁴, G. Ruiz Hurtado⁴, I. Aranguez¹, M. Gil Ortega³, R. Kreutz² y M.S. Fernández Alfonso¹

¹Instituto Pluridisciplinar y Facultad de Farmacia, UCM, Madrid.

²Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, Charité Universitätsmedizin, Berlin. ³Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Alimentación, Facultad de Farmacia, Universidad CEU-San Pablo, Madrid. ⁴Unidad de Hipertensión, Instituto de Investigación imas12, Hospital 12 de Octubre, Madrid.

Objetivos: Las ratas Munich Wistar Frömter (MWF) desarrollan una albuminuria espontánea y progresiva. El objetivo de este estudio fue analizar la relación entre microalbuminuria y disfunción endotelial. Para ello se determinó la función endotelial en aortas aisladas de 1) ratas MWF, 2) espontáneamente hipertensas (SHR) y 3) Wistar Kyoto (WKY), las dos últimas con bajo grado de albuminuria.

Métodos: Se utilizaron ratas macho de 12 semanas de edad de las cepas MWF y se compararon con ratas SHR y normotensas WKY ($n = 10$ por cepa). Se analizó la función vascular en un baño de órganos, así como la producción vascular de anión superóxido por microscopía confocal. Puesto que la albuminuria en MWF es, en gran parte, atribuible a los loci de carácter cuantitativo (QTL) en los cromosomas 6 y 8 (RNO6 y RNO8) se utilizaron, además, ratas MWF en las cuales RNO6 o RNO8 se sustituyeron por el respectivo cromosoma de SHR (MWF-6SHR y MWF-8SHR).

Resultados: La potencia (PD2) de la acetilcolina (ACh) para inducir relajación fue significativamente menor en aorta de MWF (PD2 = $6,2 \pm 0,1$) en comparación con Wistar-Kyoto (WKY) (PD2 = $7,1 \pm 0,1$) o SHR (PD2 = $7,3 \pm 0,1$; $p < 0,01$). En todas las cepas, L-NAME abolió la relajación a ACh, mientras que la indometacina no mostró ningún efecto en WKY ni en MWF, indicando la participación exclusiva de óxido nítrico (NO) como el factor relajante endotelial en estas cepas. Las contracciones a noradrenalina (NA) se incrementaron significativamente en aortas de MWF en comparación con WKY y SHR, lo que confirma la disfunción endotelial. La producción de anión superóxido fue mayor en aortas de MWF en comparación con SHR y WKY. La albuminuria se suprimió significativamente en las ratas MWF-6SHR (-85%) y MWF-8SHR (-92%) en comparación con MWF. Curiosamente, la relajación a ACh y la contracción a NA se restauraron a niveles normales sólo en la cepa MWF-8SHR, pero no en MWF-6SHR, debido a un aumento en la biodisponibilidad de NO.

Conclusiones: Este estudio demuestra que la disfunción endotelial en ratas MWF con albuminuria espontánea precede al desarrollo de hipertensión. Además, la disfunción endotelial se debe a una disminución en la biodisponibilidad de NO por un aumento en la producción de anión superóxido. La sustitución de RNO8, pero no de RNO6, restaura la función endotelial en MWF, aunque el intercambio de ambos suprime la albuminuria progresiva de MWF. Este es el primer estudio que demuestra un QTL que afecta al desarrollo de disfunción endotelial y de albuminuria.

Agradecimientos: este trabajo se ha realizado gracias a SAF2011-25303, GR921641, DFG KR1152-3-1 y a la Fundación Mutua Madrileña.

17. EFECTOS DEL FACTOR Xa Y DEL RIVAROXABÁN SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO DE LA ARTERIA FEMORAL DE PACIENTES DIABÉTICOS SOMETIDOS A AMPUTACIÓN DEL MIEMBRO INFERIOR

G. Moñux¹, S. González¹, J. Modrego², M. Hernando¹, P. Rodríguez², J. Serrano¹, J.J. Zamorano-León², N. de las Heras³, V. Lahera³ y A. López-Farré²

¹Servicio de Cirugía Vascular; ²Unidad de Investigación Cardiovascular, Servicio de Cardiología, Instituto Cardiovascular, Hospital Clínico San Carlos, Madrid. ³Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

La pared vascular utiliza el metabolismo aeróbico de la glucosa para su funcionamiento fisiológico. El objetivo fue analizar, mediante proteómica, si el factor Xa puede producir cambios en el patrón de expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo energético de la arteria femoral de pacientes diabéticos sometidos a amputación y si el rivaroxabán podría modificarlo. Se incluyeron 12 pacientes diabéticos con amputación del miembro inferior, de los cuales se extrajo un segmento de la arteria femoral, realizándose distintas incubaciones del tejido: a) con medio de cultivo (control), b) con 0,025 μ M de factor Xa, c) con 5 μ M de rivaroxabán mas 0,025 μ M de factor Xa durante 24 horas a 37° C. Las proteínas relacionadas con el metabolismo energético fueron identificadas en los segmentos de la arteria femoral en el control, incubación con factor Xa y con Factor Xa mas rivaroxabán, cuya expresión fue diferente ($p < 0,05$) en los grupos de estudio (ver tabla). En conclusión, el factor Xa estimula la expresión de proteínas relacionadas con la glucólisis y el metabolismo anaerobio (lactato deshidrogenasa). Además, el aumento de la creatina kinasa puede sugerir un requerimiento energético mayor inducido por factor Xa, probablemente por utilizar la vía anaeróbica, lo que podría sugerir una mayor distensibilidad y peor funcionalidad vascular. El rivaroxabán previene estos efectos inducidos por el factor Xa, lo que podría beneficiar la función de la pared aórtica diabética.

18. EL TRANSPORTE ENDOTELIAL DE L-CARNITINA DISMINUYE EN RATAS HIPERTENSAS

C.M. Vázquez Cueto¹, E. Guzmán Gutiérrez², R. Salsoso Rodríguez², S. Zambrano Sevilla¹, M.V. Ruiz Armenta¹, A.J. Blanca Lobato¹, F. Pardo Vasquez², A. Leiva Mendoza², A. Mate Barrero¹ y L. Sobrevía Luarte²

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla. ²Laboratorio de Fisiología Celular y Molecular (CMPL), División de Obstetricia y Ginecología, Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile.

Objetivos: Estudios realizados previamente por nuestro grupo de trabajo han demostrado los efectos beneficiosos de la L-carnitina

en la hipertensión arterial así como en el daño orgánico asociado. Uno de sus efectos es el hipotensor y vasodilatador. En este trabajo nos proponemos estudiar el transporte endotelial de L-carnitina en ratas hipertensas, caracterizando sus transportadores e identificando la presencia de los mismos.

Métodos: hemos usado cultivos primarios de células endoteliales provenientes de aorta de ratas (RAEC) normotensas (Wistar Kyoto rats, WKY) e hipertensas (*Spontaneously hypertensive rats*, SHR). La captación en velocidad inicial (v_i) de L-carnitina (1-40 μ M, 5 μ Ci/mL, 37°C, 0-60 segundos), así como la determinación de los parámetros cinéticos velocidad máxima (V_{max}) y K_m se estudiaron en ausencia y en presencia de sodio. La expresión génica de los transportadores se determinó por técnicas de RT-PCR usando primers correspondientes a los transportadores de L-carnitina.

Resultados: La captación de L-carnitina presentó un componente sodio-dependiente ($v_i = 0,003 \pm 0,002$ pmol/ μ g proteína/segundo) y otro sodio-independiente ($v_i = 0,004 \pm 0,0003$ pmol/ μ g proteína/segundo) en RAEC de ratas normotensas. Las ratas hipertensas presentan una disminución del componente sodio-dependiente ($v_i = 0,001 \pm 0,0001$ pmol/ μ g proteína/segundo), sin alterar significativamente el componente sodio-independiente. El transporte sodio-dependiente de L-carnitina fue saturable y disminuyó de forma significativa en las RAEC de ratas hipertensas con respecto a las normotensas ($V_{max} = 0,20 \pm 0,03$ y $0,42 \pm 0,06$ pmol/ μ g proteína/minuto, respectivamente). Los estudios de expresión génica indican la presencia de los transportadores de L-carnitina OCTN1 y OCTN2, en las RAEC de ratas normotensas e hipertensas, con una marcada disminución en la expresión del transportador OCTN2 en ratas hipertensas con respecto a las normotensas, sin diferencias significativas en la expresión del OCTN1.

Conclusiones: El endotelio de aorta de ratas hipertensas presenta una menor capacidad de transporte sodio-dependiente de L-carnitina, disminuyendo la expresión génica del transportador OCTN2, lo que sugiere un posible papel de este compuesto en el control del tono vascular en la hipertensión arterial.

Agradecimientos: Instituto de Salud Carlos III-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación, PN de I+D+I 2008-2011 (PS09/01395), Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) (D/031187/10, A1/036123/11), CONICYT (ACT-73 PIA, AT-24120944, AT-24120941), FONDECYT (1110977, 11110059, 3130583). EG-G y RS son alumnos becarios de doctorado CONICYT-Chile; RS es becaria de doctorado de la Facultad de Medicina, PUC-Chile; AB disfruta de un contrato del Instituto de Salud Carlos III-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación, PN de I+D+I 2008-2011 (PS09/01395).

Tabla comunicación 17.

Proteína	Control (U.A.)	Fxa (U.A.)	Fxa + rivaroxabán
Metabolismo energético			
Creatina kinasa	7,97 \pm 3,80	40,16 \pm 13,46*	13,12 \pm 5,30†
Lactato deshidrogenasa	10,49 \pm 5,68	40,48 \pm 19,64*	6,08 \pm 1,92†
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	5,54 \pm 2,88	25,27 \pm 8,16*	21,16 \pm 13,60†
Triosafofosfato isomerasa			
Isoforma 1	8,10 \pm 3,37	33,45 \pm 19,89*	7,62 \pm 2,19†
Isoforma 2	7,60 \pm 4,01	40,41 \pm 21,47*	12,50 \pm 7,23†

U.A.: Unidades arbitrarias; $p < 0,05$. *Fxa frente a control; †Fxa + rivaroxabán frente a Fxa.

19. PAPEL DE LA FOSFORILACIÓN DE LA S10 DE P27 EN EL DESARROLLO DE ANEURISMA AÓRTICO-ABDOMINAL, HIPERTROFIA CARDÍACA E HIPERTENSIÓN

P. Molina Sánchez¹, V. Esteban Vázquez^{1,3}, J.J. Fuster Ortuño^{1,2}, J.M. Redondo Moya³ y V. Andrés García¹

¹Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular Molecular y Genética, Departamento de Epidemiología, Aterotrombosis e Imagen; ²Laboratorio de Regulación Génica en Remodelado Vascular e Inflamación, Departamento de Biología Vascular e Inflamación, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid. ³Laboratory of Molecular Cardiology, Whitaker Cardiovascular Institute, Boston University School of Medicine. Boston, MA, EE.UU.

Objetivos: El papel del inhibidor del ciclo celular p27 ha sido ampliamente descrito en multitud de procesos patológicos. En el ámbito cardiovascular, su acción antiproliferativa le confiere un papel protector frente a enfermedades como hipertrofia cardíaca, restenosis o aterosclerosis. En los últimos años se ha descrito que ciertas modificaciones postraduccionales de p27 están involucradas en el control de mecanismos celulares independientes del proceso de división celular. Así, nuestro laboratorio ha demostrado que la ausencia de fosforilación de p27 en serina 10 (S10) favorece el desarrollo de aterosclerosis por un mecanismo independiente del ciclo celular mediado por la vía de señalización de Rho. El objetivo del presente estudio es investigar si dicha fosforilación participa en el desarrollo de otras patologías del sistema cardiovascular, en particular en el contexto de la hipertensión y enfermedades asociadas como el aneurisma aórtico-abdominal (AAA) y la hipertrofia cardíaca.

Métodos: Se analizaron ratones de fenotipo silvestre y ratones que expresan una versión mutante de p27 con sustitución de S10 por alanina, un aminoácido no fosforilable (ratones p27S10A). En ambos grupos de animales se implantaron bombas osmóticas que liberan Angiotensina II (1 µg/kg/min) para producir hipertensión arterial y generar un modelo de formación de AAA y de hipertrofia cardíaca. Se hizo un seguimiento de la evolución de dichas enfermedades mediante ecografía abdominal y torácica y se analizó la expresión de distintos miembros de la vía de señalización AngII-AT1R-Rho-MLC a través de PCR cuantitativa y Western Blot.

Resultados: Los ratones p27S10A presentaron niveles superiores de presión arterial diastólica al compararlos con sus controles silvestres, diferencias que se vieron aumentadas tras la administración de angiotensina II. Los ratones mutantes presentaron también una mayor susceptibilidad al desarrollo de AAA y un mayor volumen cardíaco tras el estímulo hipertensivo. Datos preliminares sugieren que este fenotipo asociado a la ausencia de fosforilación de p27 en S10 podría deberse a un incremento de la actividad de la vía de señalización AngII-AT1R-Rho-MLC.

Conclusiones: La ausencia de fosforilación de p27 en S10 favorece un estado hipertensivo así como la formación de AAA y de hipertrofia cardíaca en ratones. Esto sugiere un papel protector de dicha fosforilación en la enfermedad cardiovascular.

20. RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES CIRCULANTES, EL RIESGO CARDIOVASCULAR Y LA PRESENCIA DE SÍNDROME METABÓLICO EN PACIENTES HIPERTENSOS

D. Gómez Garre, A. Ortega Hernández, P. Muñoz-Pacheco, M. Abad Cardiel, E. Villar, M. Ávila Sánchez-Torija, N. Martell Claros y A. Fernández-Cruz

Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

Introducción: Diversos estudios han puesto de manifiesto que los pacientes hipertensos presentan, con más frecuencia que los

sujetos normotensos, una agrupación de factores de riesgo, principalmente los relacionados con el metabolismo hidrocarbonado o dislipidemia. Además, se ha demostrado que la presencia de síndrome metabólico (SM) potencia el daño vascular de la hipertensión e incrementa el riesgo de presentar alguna complicación cardiovascular. La disfunción endotelial se considera en la actualidad una de las primeras manifestaciones de la enfermedad vascular y la arteriosclerosis y se ha demostrado que se asocia con los principales factores de riesgo cardiovascular. Tradicionalmente se ha pensado que el endotelio dañado o inexistente provenía de la replicación de células endoteliales adyacentes. Sin embargo, cada día cobra mayor relevancia la idea del papel fundamental de las células progenitoras endoteliales circulantes (CPEs), provenientes de la médula ósea, en la regeneración/formación del endotelio vascular. Se ha demostrado que el número de EPCs aumenta significativamente en pacientes con disfunción endotelial, daño vascular e infarto agudo de miocardio, asumiéndose que el número y la funcionalidad de estas células podrían reflejar la capacidad endógena de reparación del vaso.

Objetivos: Estudiar la relación entre el número de componentes del SM, el número de CPEs circulantes y el riesgo cardiovascular en una población de pacientes hipertensos.

Métodos: Hemos estudiado 116 pacientes hipertensos. A todos los pacientes no diagnosticados de diabetes, se les realizó una sobrecarga oral de glucosa para poder clasificarlos como pacientes con glucosa anómala en ayunas, intolerancia a hidratos de carbono o diabéticos. Los niveles plasmáticos de CPEs [medidas como células CD34+/KDR+, CD34+/CD144+ (VE-cadherina) o CD14+/CD105+ (endoglin)] se midieron mediante citometría de flujo. El riesgo cardiovascular se valoró cuantificando el grosor íntima media (GIM) carotídeo mediante eco-Doppler. Los pacientes con 5 componentes se han unido al grupo de 4 componentes por su escaso número (n = 4).

Resultados: Nuestra población tenía una edad media de 63 ± 14 años, y una duración de la hipertensión de 12,6 ± 10,7 años. Todos los pacientes estaban tratados y controlados, con una presión arterial sistólica/diastólica de 127 ± 18/75 ± 12 mmHg. Más de la mitad de los pacientes (60,3%) presentaban SM; de los cuales el 67,2% tenían 3 componentes, el 27,1% tenían 4 y el 5,7% presentaban los 5 componentes del SM. Los pacientes con 1-2 componentes mostraron unos niveles de CPEs CD34+/CD144+ [0,68% (RIQ: 0,17-1,22%)] similares a los que tenían los pacientes con 3 componentes [0,66% (0,39-1,42%)]. Sin embargo, los pacientes que tenían 4 componentes presentaron una disminución significativa del número de CPEs [0,37% (0,37-0,59)] (p < 0,001). No encontramos ninguna asociación entre el número de CPEs CD34+/KDR+, o de CD14+/CD105+ y el número de componentes del SM. A medida que aumentó la presencia de factores de riesgo en los pacientes, se observó un incremento en el GIM, que se correlacionó negativamente con el número de células CD34+/CD144+ (r = -0,158, p = 0,125).

Conclusiones: La presencia simultánea de 4-5 componentes del SM se asocia con un menor número de CPEs CD34+/CD144+, que puede ser, al menos en parte, responsable del aumento del riesgo cardiovascular que presentan estos pacientes. Es posible que estas células puedan servir como marcadores de riesgo cardiovascular, así como una posible línea de abordaje terapéutico en pacientes hipertensos con SM.

21. IMPLICACIÓN DEL IGF-2 Y LOS RECEPTORES HÍBRIDOS IRA/IGF-1R EN LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR

A. Gómez-Hernández¹, L. Perdomo¹, O. Escribano¹, Y.F. Otero¹, G. García-Gómez¹, S. Fernández¹, N. Beneit¹, N. de las Heras² y M. Benito¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, CIBERDEM;

²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UCM, Madrid.

Objetivos: Estudiar el papel de IGF-2, de las isoformas del receptor de la insulina (IRA e IRB) así como de los receptores híbridos (IRA/IGF-1R e IRB/IGF-1R) en la proliferación de células de músculo liso vascular (VSMCs).

Métodos: Para estudiar el papel de ambas isoformas del receptor de la insulina (IR) en la proliferación de VSMCs, implicada en el inicio del proceso aterogénico, generamos nuevas líneas de VSMC que tuvieran ambas isoformas del IR (WT VSMCs; IRLoxP^{+/+} VSMCs), sin el IR (IR^{-/-} VSMCs) o que expresen exclusivamente la IRA (IRA VSMCs) o la IRB (IRB VSMCs). Para valorar *in vivo* el papel tanto de las isoformas del IR como de los receptores híbridos (IR/IGF-1R), utilizamos dos modelos experimentales de distinto grado de daño vascular. El primero era un modelo clásico de aterosclerosis, como es el ratón ApoE^{-/-} de 24 semanas de edad. El segundo de ellos, un modelo carente del receptor de la insulina en el tejido adiposo marrón (BATIRKO), que desarrolla lipoatrofia marrón, alteraciones en el metabolismo de la glucosa y a las 52 semanas de edad, obesidad, resistencia a la insulina vascular y disfunción vascular.

Resultados: La insulina y los estímulos proaterogénicos aumentaron la expresión de la IRA, sin modificar la expresión de IRB, en IRLoxP^{+/+} VSMCs. Además, la insulina vía ERKs y los estímulos proaterogénicos tanto por la activación de las ERK como de p38, indujeron un mayor nivel de proliferación en las células IRA VSMCs que en las IRB VSMCs. Este último efecto, podría deberse a una mayor expresión de los receptores de Ang II, ET-1 y TXA₂ en IRA VSMCs así como una mayor asociación basal entre la IRA y dichos receptores. Por otro lado, los niveles de los receptores de TNF- α (TNF-R1 y TNF-R2) fueron muy similares tanto en las IRA como en las IRB VSMCs. Sin embargo, el TNF- α indujo una mayor asociación entre la IRA y el TNF-R1 de manera tiempo dependiente. Otro de los objetivos del presente trabajo era estudiar el papel de IGF-2 en la proliferación de las VSMCs. En este sentido, las acciones aterogénicas de IGF-2 podrían estar favorecidas por el aumento de expresión de la IRA. Así, IGF-2 y TNF- α indujeron un aumento significativo de la expresión de IRA e IGF-1R así como de la formación de receptores híbridos IRA/IGF-1R correlacionándose con que ambos estímulos inducen una mayor proliferación en IRA VSMCs que en IRB VSMCs. *In vivo*, se observó un aumento significativo de la expresión de IRA, TNF-R1 e IGF-1R así como una mayor asociación entre la IRA y el TNFR-1 o IGF-1R en la aorta de ratones ApoE^{-/-} y BATIRKO con respecto a sus controles. Finalmente, un grupo de ratones BATIRKO de 52 semanas fue tratado con anticuerpo anti-TNF- α durante 6 semanas, mejorando su control glucémico, las alteraciones vasculares y un descenso de la expresión de los receptores estudiados así como su asociación con la IRA.

Conclusiones: Nuestros datos sugieren que la IRA y su asociación con el TNF-R1 e IGF-1R confiere una ventaja proliferativa a las células de músculo liso vascular, principalmente en respuesta a TNF- α e IGF-2, pudiendo tener relevancia en el inicio del proceso aterosclerótico.

22. LA ADIPOQUINA VISFATINA INDUCE SENESCENCIA EN CÉLULAS ENDOTELIALES A TRAVÉS DE SU ACTIVIDAD NICOTINAMIDA FOSFORIBOSILTRANSFERASA

L.A. Villalobos Rodríguez¹, A. Uryga², A. Leivas¹, R. Carraro³, J. Erusalimsky², C. Sánchez-Ferrer¹ y C. Peiró¹

¹Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid. ²Cardiff Metropolitan University, Cardiff, Reino Unido. ³Hospital Universitario de la Princesa, Madrid.

Introducción: El tejido adiposo es un órgano endocrino activo que libera una familia de sustancias llamadas adipoquinas. En enfermedades como la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2, la producción desequilibrada de estas adipoquinas se encuentra ligada tanto a la resistencia a la insulina como a la inflamación sistémica y la disfunción endotelial. La senescencia vascular es una respuesta al estrés asociada con la aterosclerosis y el daño vascular. En este trabajo se investiga la capacidad de la visfatina, una adipoquina con actividad nicotinamida fosforibosiltransferasa (Nampt), y cuyos niveles circulantes están elevados en obesidad y diabetes tipo 2, para inducir senescencia en las células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC).

Métodos: La senescencia celular se determinó por tinción de β -galactosidasa a pH 6,0 (SA- β gal), distinguiéndose las células senescentes por una coloración azul. Los niveles de p53 se midieron por la técnica de Western blotting. Los puntos de daño en el ADN y la disfunción telomérica inducida (TIFs) se examinaron por inmunofluorescencia indirecta usando el anticuerpo anti-fosfo-histona γ H2A.X y el anticuerpo anti-TRF-1.

Resultados: La exposición de los cultivos de HUVEC a visfatina (10, 25, 50 y 100 ng/ml) durante 24 h dieron por resultado un incremento de la tinción de SA- β gal dependiente de la concentración. A la concentración de 50 ng/ml, la visfatina incrementó significativamente los niveles celulares de la proteína pro-senesciente p53. El peróxido de hidrógeno (50 μ mol/l, 24 h) fue empleado como control positivo de la actividad SA- β gal y la inducción de p53. Además, la visfatina provocó daño telomérico asociado al ADN de una manera dependiente de la concentración. El tratamiento de las células con visfatina 50 ng/ml durante 24, 48, 72 y 96 horas provocó un aumento de la tinción de SA- β gal dependiente del tiempo. Los efectos senescentes de la visfatina (50 ng/ml) sobre la inducción de los niveles de p53, la actividad y el daño en el ADN fueron prevenidos por el inhibidor de la actividad Nampt APO866 (10 μ mol/L) y mimetizados por el producto de la reacción Nampt, el mononucleótido de nicotinamida (100 μ mol/L).

Conclusiones: La adipoquina visfatina induce la senescencia en células endoteliales humanas través de la actividad Nampt. Por lo tanto, la visfatina puede actuar como un enlace entre la disregulación del tejido adiposo y las complicaciones vasculares en el contexto de los desórdenes metabólicos.

23. PAPEL DE LA PROTEÍNA RCAN1 EN MACRÓFAGOS, EN EL DESARROLLO DE ATROSCLEROSIS

N. Méndez Barbero¹, V. Esteban Vázquez¹, S. Sánchez Donoso¹, A. Escolano¹, K. Urso¹, C. Rodríguez², V. Andrés¹, J. Martínez González², J.M. Redondo¹ y M.R. Campanero³

¹Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid.

²CSIC-ICCC, IIB Sant Pau, Barcelona. ³IIB Alberto Sols CSIC-UAM, Madrid.

La aterosclerosis es una enfermedad vascular compleja caracterizada por la deposición de sustancias lipídicas en la pared de las arterias, que provoca una reacción inflamatoria con un consecuente remodelado vascular. La enfermedad aterosclerótica es la mayor causa de muerte por enfermedad cardiovascular ya que es la responsable de infartos de miocardio, ictus o enfermedades vasculares periféricas. Por este motivo, han sido muchos los estudios preclínicos llevados a

cabo en ratones deficientes en apolipoproteína E, (ApoE^{-/-}-capaces de desarrollar hipercolesterolemia y placas de ateroma) para estudiar posibles marcadores o moléculas involucradas en este proceso. En estudios previos hemos demostrado la importancia de la proteína RCAN1 (regulador de calcineurina), como molécula implicada en otras patologías vasculares como son el desarrollo de aneurisma abdominal aórtico y restenosis arterial. En el caso de la aterosclerosis, hemos demostrado que en pacientes que muestran lesiones ateroscleróticas en las arterias coronarias, la expresión de Rcan1 se ve inducida si se compara con zonas no dañadas de este mismo paciente. Además la expresión de Rcan1 se ve restringida a zonas ricas en células de músculo liso vascular (CMLVs) y a macrófagos. De igual manera que vemos en humanos, en ratones ApoE^{-/-} también observamos una inducción de la expresión de la proteína Rcan1 en tejido aórtico lesionado. Rcan1 en placas de ateroma de ratones se expresa en macrófagos, células endoteliales y CMLVs. Además, *in vitro* la expresión de Rcan1 es inducida en estos tres tipos celulares después de su tratamiento con lipoproteínas oxidadas de baja densidad (oxLDL). La deficiencia de Rcan1 en ratones ApoE^{-/-} alimentados con dieta rica en colesterol reduce tanto la extensión de la aterosclerosis a nivel aórtico, como el grado de desarrollo de la lesión, ya que estos ratones muestran lesiones menos avanzadas. Además y teniendo en cuenta la importancia de la estenosis aórtica provocada por lesiones ateroscleróticas, como marcador en humanos de riesgo cardiovascular, hemos desarrollado una técnica de microscopia para obtener información 3D del volumen de estas lesiones siendo capaces de obtener información volumétrica de cada ateroma utilizando las aortas *en face*. Estos datos indican que los ratones deficientes en Rcan1 además de presentar menos área de lesión presentan menos volumen de lesión y por tanto vasos menos estenosados. Los efectos que encontramos *in vivo* los hemos relacionado con los datos *in vitro* observados en uno de los tipos celulares más importantes en la inducción de la patología, como son los macrófagos. Hemos observado que macrófagos deficientes en Rcan1^{-/-} tienen menos capacidad de captación de oxLDL del medio, lo que supondría que se vería disminuida su posibilidad de transformación en célula espumosa. También relacionado con este mecanismo, hemos observado que macrófagos deficientes en Rcan1 son resistentes a la inhibición que ejercen las oxLDL sobre la emigración de estos fuera de la placa, lo que implicaría que son menos retenidos en las lesiones favoreciendo la resolución de la patología. Al contrario, los macrófagos Rcan1^{+/+} quedarían retenidos en las lesiones enriqueciendo la placa de células espumosas que favorecerán la formación de la capsula necrótica y la posible trombosis del vaso. Además hemos comprobado que macrófagos ApoE^{-/-}-Rcan1^{-/-} expresan altos niveles de marcadores antiinflamatorios, como son la interleuquina 10, receptor de manosa, o la arginasa comparado con macrófagos ApoE^{-/-}-Rcan1^{+/+} tanto *in vitro* como *in vivo*. Por todo esto, y con el objetivo de esclarecer el papel de RCAN1 en los macrófagos en el desarrollo de ateroma, se realizaron trasplantes de médula ósea. Los resultados mostraron que trasplante de células hematopoyéticas de ApoE^{-/-}-Rcan1^{-/-} en animales receptores ApoE^{-/-} confiere resistencia a la enfermedad aterosclerótica. Estos resultados apoyan el papel pro-aterogénico de Rcan1 en macrófagos y definen a esta proteína como diana terapéutica para esta enfermedad vascular.

24. LA SITAGLIPTINA ATENÚA LA FIBROSIS CARDÍACA ASOCIADA A DIABETES TIPO-II PRINCIPALMENTE A TRAVÉS DE SU EFECTO INSULINOTRÓPICO

B. Picatoste Botija¹, S. Ares Carrasco¹, E. Ramírez Bustillo¹, A. Caro Vadillo², J. Egido de los Ríos¹, J. Tuñón Fernández¹ y O. Lorenzo González¹

¹IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid. ²Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid.

Introducción: La fibrosis cardíaca es un proceso clave en el desarrollo de la miocardiopatía diabética pero carece de una terapia

efectiva. La sitagliptina incrementa los niveles circulantes de la incretina insulínica GLP-1 (glucagon like peptide-1) mediante el bloqueo de su degradación a péptido inactivo GLP-1 (9-36). GLP-1 posee receptores específicos en el corazón.

Objetivos: Estudiar el potencial efecto de la sitagliptina sobre el corazón diabético.

Métodos: Ratos Goto-Kakizaki (GK), diabéticos tipo-II no hipertensos, fueron tratadas con sitagliptina (10 mg/Kg/día), metformina (200 mg/Kg/día) o vehículo durante 10 semanas. Además se utilizaron ratos wistar como grupo control (n = 10 por grupo). Después se realizó un test de tolerancia a glucosa y evaluación de la estructura y función cardíaca. Finalmente se extrajo la sangre y los corazones para el análisis de los diferentes parámetros bioquímicos e histológicos. Las líneas de cardiomiocitos HL-1 y fibroblastos TFBs se utilizaron para los experimentos *in vitro*.

Resultados: Las ratas GK desarrollaron hiperlipidemia, hiperglicemia e intolerancia a glucosa. Además, mostraron hipertrofia y fibrosis cardíaca, y sobreexpresión de factores profibróticos (TGFβ, CTGF y fibronectina). Sin embargo, a diferencia del tratamiento con metformina, la sitagliptina incrementó los niveles de GLP-1 circulantes y redujo estos eventos. En HL-1 y TFBs la estimulación con altas concentraciones de glucosa o ácido graso (palmitico) estimuló la expresión y secreción de factores profibróticos. Interesantemente, la coestimulación con GLP-1 o GLP-1 (9-36) previno estos efectos profibróticos. Sin embargo, la incubación de GLP-1 con sitagliptina no potenció el efecto antifibrótico.

Conclusiones: La sitagliptina, a través del aumento de los niveles circulantes de GLP-1, puede controlar la hiperglicemia y la hiperlipidemia en la rata diabética pero además, atenúa la fibrosis cardíaca asociada. Interesantemente, debido a que GLP-1(9-36) induce similares acciones antifibróticas que GLP-1 en cardiomiocitos y fibroblastos, el efecto observado en las ratas tratadas podría deberse principalmente al efecto insulínico.

25. LA GALECTINA-3: UNA NUEVA DIANA TERAPÉUTICA EN LA FIBROSIS Y DISFUNCIÓN CARDIO-VASCULO-RENAL INDUCIDA POR LA ALDOSTERONA

N. López-Andrés¹, L. Calvier², M. Miana³, V. Cachofeiro³, E. Martínez-Martínez³, P. Lacolley², F. Zannad² y P. Rossignol²

¹Centro de Investigación Biomédica Navarra Biomed, Pamplona.

²Inserm U961, Nancy. ³Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Introducción: La aldosterona (Aldo) está implicada en las alteraciones cardiovasculares y renales asociadas con el desarrollo de insuficiencia cardíaca (IC), pero los mecanismos son desconocidos. La galectina-3 (Gal-3) es una lectina que se une a los beta-galactósidos, cuya expresión aumenta en IC.

Objetivos: En nuestro trabajo investigamos la implicación de la Gal-3 en la fibrosis y disfunción cardio-vasculo-renal inducida por la aldosterona.

Métodos y resultados: Ratos Wistar se trataron durante tres semanas con Aldo-sal combinada con espironolactona o pectina de limón modificada (MCP), un inhibidor de la Gal-3. Las ratas tratadas con Aldo-sal presentaron un aumento en los niveles de Gal-3 en el corazón, la aorta y el riñón. El tratamiento con Aldo-sal indujo hipertensión, disfunción cardíaca, y un aumento del peso del corazón, del diámetro de los cardiomiocitos, de la fibrosis y de la inflamación miocárdica. A nivel vascular, el tratamiento con Aldo-sal indujo un aumento del espesor de la aorta y de la deposición de colágeno y fibronectina. Los animales tratados con Aldo-sal presentaron un aumento de la fibrosis glomerular y túbulo-intersticial en riñón, fenómeno que se acompañó de una transición epitelio-mesenquimal y de microalbuminuria. El tratamiento con espironolactona o con MCP normalizó todos los parámetros cardíacos, vascular-

res y renales analizados, incluyendo los niveles de Gal-3. Por otra parte, ratones WT y knockout para la Gal-3 se trataron con Aldo durante 6 horas. La infusión con Aldo incrementó los niveles de Gal-3 y de colágeno en el corazón, la aorta y el riñón de los ratones WT. Sin embargo, los ratones knockout para la Gal-3 tratados con Aldo no presentaron aumento de colágeno en ninguno de los órganos analizados.

Conclusiones: En el hiperaldosteronismo experimental, el aumento de Gal-3 se asocia a la fibrosis cardíaca, vascular y renal, así como a la disfunción de los tres órganos. La fibrosis y la disfunción cardio-vásculo-renal se previenen con la MCP, un inhibidor de la Gal-3, así como en los ratones que no expresan la Gal-3. Nuestros resultados sugieren un papel clave para la Gal-3 en el remodelado cardio-vásculo-renal inducido por la Aldo. La Gal-3 podría ser una nueva diana terapéutica en pacientes con IC.

26. EFECTO DE UN INHIBIDOR DE LA LISIL OXIDASA SOBRE LAS ALTERACIONES CARDÍACAS ASOCIADAS A LA OBESIDAD EN RATA

E. Martínez Martínez¹, M. Miana¹, R. Jurado López¹, A. Briones², M. Luaces³, M. Valero Muñoz¹, J. Martínez González⁴, C. Rodríguez⁴, N. López Andrés⁵ y V. Cachofeiro¹

¹Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología, Universidad Complutense, Madrid. ²Facultad de Medicina, Departamento de Farmacología, Universidad Autónoma, Madrid. ³Servicio de Cardiología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid. ⁴Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC), IIB-Sant Pau, Barcelona. ⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Nancy.

Introducción: La obesidad se asocia con el remodelado cardíaco que se caracteriza por cambios en el fenotipo de los miocitos y en la matriz extracelular (MEC), que favorecen el desarrollo de fibrosis miocárdica. El remodelado de la MEC es por tanto, un proceso crítico que compromete la función cardíaca y contribuye de forma activa al fallo cardíaco. El colágeno (fundamentalmente el tipo I) y en menor medida la fibronectina y la laminina son los principales componentes de la MEC en el corazón. Los niveles de MEC requieren un control preciso del equilibrio entre su síntesis y su degradación. Una de las etapas clave en la síntesis y maduración de la MEC es la catalizada por la enzima lisil oxidasa (LOX), que permite el entrecruzamiento de las fibras de colágeno y elastina y la formación de una MEC estable e insoluble.

Objetivos: Estudiar los efectos de un inhibidor de la LOX, el beta-aminopropionitrilo (BAPN), sobre las alteraciones cardíacas en un modelo de obesidad inducido por dieta en rata, así como los posibles mecanismos involucrados.

Métodos: Se utilizaron ratas macho Wistar (150 ± 5 g p.c.) que se dividieron en 4 grupos: (I) alimentadas con una dieta estándar (11% de grasa; grupo CT, n = 8); (II) alimentadas con una dieta rica en grasa (33,5% de grasa; grupo OB, n = 8); (III) alimentadas con una dieta rica en grasa y tratados con BAPN (100 mg/kg/día) en el agua de bebida (grupo OB+LOXi; n = 10); (IV) alimentadas con una dieta estándar y BAPN en el agua de bebida (grupo LOXi; n = 8), durante 6 semanas. Al final del período de evolución se valoró la función cardíaca mediante ecocardiografía, los niveles de colágeno total mediante tinción con rojo Sirio en el corazón. Asimismo, se midió la expresión proteica de colágeno I, MMP-2, TIMP-1 TGF-β, CTGF y galectina-3 en el corazón. Finalmente se evaluó la producción de aniones superóxido mediante la técnica de fluorescencia inducida por DHE.

Resultados: Los animales alimentados con una dieta rica en grasa presentaron un incremento del peso corporal de un 26% con respecto al grupo CT. En comparación con las ratas control no se observaron diferencias ni en la PAS, FEVI, PP, SIV, DTDVI, DTSVI o en el acortamiento fraccional. Las ratas obesas presentaron un aumento

del peso relativo del corazón, de los niveles cardíacos de colágeno I, TGF-β, galectina-3, junto con un incremento en la fracción de volumen de colágeno (p < 0,05) en comparación con las ratas control, sin modificación de la expresión de CTGF en el corazón. Por el contrario, se observó un descenso en los niveles de MMP-2 (p < 0,05) en las ratas obesas, sin modificación en los niveles de TIMP-1. También se observó un aumento de los niveles de aniones superóxido en el grupo OB (p < 0,05). El tratamiento con BAPN redujo de manera significativa el incremento de peso corporal en los animales alimentados con una dieta rica en grasa (p < 0,01) aunque no modificó el peso corporal en el grupo LOXi. La inhibición de la LOX redujo también el aumento del peso relativo del corazón, de la fibrosis y sus mediadores así como la producción de anión superóxido observado en los animales alimentados con una dieta rica en grasa (p < 0,05), aunque no se vio ningún efecto sobre el incremento de galectina-3 observado en los animales OB.

Conclusiones: Los datos sugieren que la obesidad se asocia con un proceso fibrótico, que parece ser un evento temprano y que podría predisponer a alteraciones cardíacas. Este aumento de la MEC parece ser consecuencia tanto de un aumento de la síntesis de colágeno como una reducción de su degradación. La LOX podría participar en la fibrosis y en el estrés oxidativo observado en animales obesos mediante la estabilización de la MEC, además de aumentar la síntesis de colágeno y de factores profibróticos como el TGF-β; y disminuyendo la degradación de la misma.

27. IMPLICACIÓN NOR-1 EN LA BIOLOGÍA VASCULAR: RESULTADOS DE UN MODELO ANIMAL QUE SOBRE-EXPRESA DICHO RECEPTOR NUCLEAR EN CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES (CMLV)

B. Ferrán¹, R. Rodríguez Calvo¹, A. de Diego², O. Calvayrac¹, M.A. Navarro³, J. Alonso¹, P. Muniesa³, J. Osada², C. Rodríguez¹ y J. Martínez González¹

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

Introducción: Estudios previos de nuestro grupo han demostrado que el receptor nuclear NOR-1 (NR4A3) está implicado en la proliferación y supervivencia de las células vasculares y está sobre-expresado en placas ateroscleróticas de pacientes con cardiopatía isquémica. Sin embargo, los datos procedentes de animales modificados genéticamente son contradictorios en lo que se refiere a participación de este receptor en la formación de neointima en respuesta al daño.

Objetivos: El objetivo de este estudio ha sido generar un modelo de ratón transgénico que sobre-exprese NOR-1 humano en células musculares lisas vasculares (CMLV), y analizar las consecuencias de dicha sobre-expresión en la hiperplasia de la íntima inducida por daño vascular y en la expresión de genes clave en el proceso inflamatorio-aterogénico.

Métodos: La secuencia codificante para el receptor NOR-1 humano (hNOR-1) se situó bajo el control de un promotor mínimo de SM22a, y la construcción resultante fue utilizada para generar dos líneas estables de ratones transgénicos con expresión dirigida a CMLV (Tg-hNOR-1^{hVSMC}). La sobre-expresión del transgén se analizó mediante PCR a tiempo real, Western blot e inmunohistoquímica. La carótida izquierda de estos animales fue sometida a ligación para inducir daño mecánico. Transcurridas tres semanas los animales se sacrificaron y se prepararon secciones de la región intervenida que se tiñeron con hematoxilina-eosina, y se cuantificó la formación de neointima. Mediante la técnica de explantes se obtuvieron CMLV de la aorta de animales control y Tg-NOR-1^{hVSMC}. En estas células, se analizó la actividad transcripcional de NOR-1 me-

diente ensayos de transfección con vectores reporteros (luciferasa) y la capacidad de unión de este factor a sus secuencias reguladoras mediante EMSA. Como índice de proliferación celular se utilizó la incorporación de [³H]-timidina.

Resultados: Se generaron dos líneas de ratones transgénicos que expresaban hNOR-1 en tejidos ricos en SMC, sobre todo en aorta, donde su nivel de expresión fue similar en ambas líneas transgénicas. La sobre-expresión se corroboró mediante *Western blot* e inmunohistoquímica. En los ratones Tg-hNOR-1^{+VSMC} la formación de neointima inducida por ligación de la arteria carótida fue superior a la observada en ratones control (2,36 veces).

Conclusiones: Nuestros resultados *in vivo* apoyan el papel de NOR-1 en proliferación de CMLV y remodelado vascular. Este modelo de ratón transgénico NOR-1 podría ser una herramienta útil para el estudio de enfermedades vasculares fibroproliferativas.

28. PAPEL DE LA INTEGRINA LIGADA A QUINASAS (ILK) EN EL PROCESO INFLAMATORIO GENERADO POR LA ANGIOTENSINA II EN EL RIÑÓN

M. Alique¹, E. Civantos¹, S. Rayego-Mateos¹, E. Sánchez-López¹, C. Lavoz¹, R. Rodríguez-Díez¹, J. Egido¹, D. Rodríguez-Puyol², M.P. Ruiz-Torres² y M. Ruiz-Ortega¹

¹Laboratorio de Biología Celular y Enfermedades Renales, Universidad Autónoma, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

²Departamento de Fisiología, Universidad de Alcalá, Madrid.

Introducción: Actualmente el bloqueo del sistema renina angiotensina es una de las mejores estrategias terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad renal, sin embargo estos fármacos solo retrasan la evolución de la enfermedad por lo que la investigación de nuevas dianas es clave en estas patologías. La angiotensina II (AngII) juega un papel clave en la progresión de las enfermedades renales, regulando entre otros procesos la respuesta inflamatoria. La integrina ligada a quinasas (ILK) está implicada en la interacción célula-matriz extracelular y regula numerosos procesos como proliferación, migración, adhesión y angiogénesis, pero se desconoce su papel en los procesos inflamatorios en el riñón. Actualmente el bloqueo del sistema renina angiotensina es una de las mejores estrategias terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad renal, sin embargo estos fármacos solo retrasan la evolución de la enfermedad por lo que la investigación de nuevas dianas es clave en estas patologías. La angiotensina II (AngII) juega un papel clave en la progresión de las enfermedades renales, regulando entre otros procesos la respuesta inflamatoria. La integrina ligada a quinasas (ILK) está implicada en la interacción célula-matriz extracelular y regula numerosos procesos como proliferación, migración, adhesión y angiogénesis, pero se desconoce su papel en los procesos inflamatorios en el riñón.

Objetivos: El estudio de la vía de señalización de ILK como posible mediador en el proceso inflamatorio renal inducido por AngII.

Métodos: Se ha generado un modelo de ratón knockout condicional para ILK (sistema Cre-Lox inducible con tamoxifeno) al que se le ha administrado AngII durante 7 días, mediante bombas osmóticas subcutáneas (100 ng/kg/min), determinándose por diferentes técnicas (inmunohistoquímica, PCR cuantitativa, western blot, y ELISA) la expresión de mediadores inflamatorios, factores de transcripción y proteínas quinasas. Los estudios *in vitro* se han realizado en la línea de células tubulares proximales humanas HK-2.

Resultados: Los ratones infundidos con AngII presentaron una respuesta inflamatoria renal, caracterizada por aumento del infiltrado intersticial de monocitos/macrófagos y linfocitos T, y un incremento de genes pro-inflamatorios y de moléculas de adhesión (IL-6, MCP-1, RANTES e ICAM-1). En los animales deficientes en ILK infundidos con AngII no se produjo esta respuesta inflamatoria renal, presentando un número de células inflamatorias y unos niveles de factores pro-inflamatorios renales similares a los controles (ra-

tones deficientes en ILK y en ratones de fenotipo salvaje, ambos infundidos con salino). El NF- κ B es un factor de transcripción clave en la regulación de la inflamación renal. En animales deficientes en ILK, AngII no activó NF- κ B en riñón. Los estudios *in vitro*, confirmaron la participación de ILK en la regulación de NF- κ B. En células HK-2 el bloqueo de ILK mediante silenciamiento génico, utilizando un RNA pequeño de interferencia (siRNA), bloqueó la activación del NF- κ B (fosforilación de p-65 y translocación nuclear), y disminuyó la sobreexpresión de mediadores pro-inflamatorios inducidos por AngII, comparándolo con las células transfectadas con siRNA control. Evaluamos diversas proteínas quinasas relacionadas con ILK. *In vitro*, AngII activó Akt pero no GSK3 α/β . En los ratones deficientes en ILK se disminuyeron los niveles de Akt fosforilado pero no se modificaron los de GSK3 α/β .

Conclusiones: Nuestros datos muestran que ILK, via regulación de la activación de NF- κ B, participa en la inflamación renal inducida por AngII. Estos resultados aportan nueva información sobre los mecanismos intracelulares activados por AngII y proponen a ILK como una diana terapéutica en las enfermedades renales asociadas a aumento de AngII.