



# Hipertensión y riesgo vascular

[www.elsevier.es/hipertension](http://www.elsevier.es/hipertension)



## COMUNICACIONES PÓSTER

### **XI CONGRESO ARGENTINO DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL** 10 al 12 Abril de 2014 Hotel InterContinental Buenos Aires

#### Trabajos libres en investigación básica seleccionados para el Premio “Prof. Dr. Carlos María Taquini”

#### BP1. LA DISMINUCIÓN DE LA CAPACIDAD DE REPARACIÓN ENDOTELIAL ESTÁ ASOCIADA AL DISBALANCE AUTONÓMICO EN LA HIPERTENSIÓN CONTROLADA

E.M.V. de Cavanagh<sup>1,2</sup>, S.A. González<sup>1,2</sup>, F. Inserra<sup>1</sup>, P. Forcada<sup>1,2</sup>,  
C. Castellaro<sup>1,2</sup>, S. Obregón<sup>1,2</sup>, M.J. Casarini<sup>2</sup>, P. Kempny<sup>2</sup>  
y C. Kotliar<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Biomédicas, Universidad Austral. <sup>2</sup>Centro de  
Hipertensión Arterial, Departamento de Cardiología,  
Hospital Universitario Austral, Buenos Aires, Argentina.

**Introducción:** Las células progenitoras endoteliales tempranas (CPE-tempranas) y las CPE-tardías contribuyen a la regeneración endotelial; además, pueden rescatar células endoteliales dañadas al transferirles organelas a través de nanotubos tuneladores (NTT). En roedores, la movilización de CPE de la médula ósea es dependiente de la actividad simpática y las catecolaminas están involucradas en la modulación de la revascularización post-isquémica, sugiriendo que la desregulación autonómica puede afectar negativamente la reparación endotelial. En humanos, evidencias indirectas sugieren la existencia de una relación entre la disautonomía y la movilización de CPE.

**Objetivo:** Investigar si el desequilibrio autonómico en la hipertensión esencial está asociado al deterioro de las CPE.

**Métodos:** Treinta pacientes hipertensos esenciales controlados [PAS/PAD = 130 (120-137)/85 (61-88) mmHg; 81,8% hombres], y diez normotensos sanos [(114 (107-119)/75,5 (65-79) mmHg; 80% hombres] fueron estudiados. Las CPE-tempranas y CPE-tardías se obtuvieron cultivando células mononucleares de sangre periférica sobre fibronectina o colágeno durante 9 y 21 días, respectivamente, y fueron caracterizadas por inmunohistoquímica. Los NTT fueron identificados por microscopía/inmunohistoquímica. Los perfiles autonómicos se estudiaron analizando los componentes de baja- (LF) y

alta frecuencia (HF) de la variabilidad de la frecuencia cardíaca a corto plazo durante: un período de reposo de 5 min, una maniobra de espiración/inspiración, y un Stroop-test de colores y palabras. Las modulaciones de las actividades simpática/parasimpática cardíacas fueron evaluadas como LF/HF (%) y el poder HF (ms<sup>2</sup>), respectivamente.

**Resultados:** En pacientes hipertensos controlados, la cantidad de CPE-tempranas, CPE-tempranas que emitían NTT, CPE-tardías y CPE-tardías que emitían NTT eran 41%, 77%, 50% y 88% menores que en individuos normotensos ( $p < 0,008$ ). En pacientes hipertensos controlados, (1) el número de CPE-tardías se relacionó a) positivamente con la reserva cardíaca parasimpática durante la maniobra de espiración/inspiración ( $Rho = 0,45$ ,  $p = 0,031$ ) y b) negativamente con la respuesta cardíaca simpática durante el test de estrés ( $Rho = -0,426$ ,  $p = 0,045$ ) y (2) el número de CPE-tempranas se relacionó positivamente con la dilatación braquial mediada por flujo ( $Rho = 0,655$ ;  $p = 0,049$ ); esto último sugiere que alteraciones en las CPE afectarían la función vascular. Para investigar si los niveles plasmáticos de epinefrina y norepinefrina contribuirían a la asociación negativa observada en pacientes hipertensos entre la hiperactividad simpática/hipoactividad parasimpática y el número de CPE-tempranas, CPE-tardías y NTT, las CPE fueron incubadas en presencia de estas catecolaminas. Ex vivo, la exposición de CPE-tempranas y tardías a epinefrina o norepinefrina mostró una relación dosis-respuesta negativa para la adhesión celular a fibronectina y colágeno; epinefrina inhibió el crecimiento de CPE-tardías, pero epinefrina y norepinefrina estimularon el crecimiento de CPE-tempranas -aunque en menor medida que su efecto inhibitorio sobre la adhesión.

**Conclusiones:** En pacientes hipertensos controlados la hiperactividad simpática/hipoactividad parasimpática están negativamente asociadas con las CPE, sugiriendo que la reducción de la activación simpática o el aumento de la activación parasimpática favorecerían la reparación endotelial. Estas observaciones podrían ayudar a explicar el conocido riesgo cardiovascular residual alto descripto en los pacientes hipertensos controlados. El próximo paso sería investigar si el uso de antagonistas simpáticos se asocia al aumento del número de CPE y la mejoría de la función endotelial en pacientes hipertensos.

## BP2. EL RECEPTOR MAS DE ANGIOTENSINA-(1-7) Y EL RECEPTOR B2 DE BRADIQUININA INTERACCIONAN FORMANDO UN HETERO-OLIGÓMERO. CONSECUENCIAS FUNCIONALES

B.D. Cerrato, H.E. Grecco y M.M. Gironacci.

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.

**Objetivo:** La angiotensina-(1-7) (Ang)-(1-7), a través del receptor Mas, y la bradiquinina (BK), a través del receptor B2, ejercen efectos que llevan a una disminución de la presión arterial, oponiéndose y balanceando así el efecto presor característico de la Ang II. Está demostrado, que ambos ligandos, tienen la capacidad de potenciar su efecto biológico al actuar juntos, y además, que cualquiera de ellos pierde su efecto biológico, si el receptor del otro se encuentra knockeado o antagonizado. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G (RAPG). Se ha demostrado que los RAPG existen como homo-oligómeros y hetero-oligómeros, modulando su función biológica. La oligomerización de los RAPG regula sus propiedades fisiológicas y farmacológicas, actuando sobre la internalización, transducción de señales, reciclado y degradación de los RAPG. Teniendo en cuenta que existen evidencias fisiológicas que demuestran una fuerte interacción entre la Ang-(1-7) y la BK, nuestro objetivo es investigar si los receptores Mas y B<sub>2</sub> que median sus efectos, interaccionan formando un hetero-oligómero, y si ello afecta la funcionalidad de cada uno de los receptores.

**Métodos:** Se determinó la formación del hetero-oligómero Mas-B<sub>2</sub> por la técnica de Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) en células de riñón embrionario humano (HEK 293) las que fueron co-transfectadas con las construcciones que expresan el receptor Mas fusionado a la YFP y el receptor B<sub>2</sub> fusionado a la CFP (Mas-YFP y B<sub>2</sub>-CFP respectivamente). 48h después se evaluó la existencia de interacción entre ambos receptores en forma constitutiva, o bien, si es inducida por los ligandos, así como la funcionalidad del hetero-oligómero formado por ensayos de unión hormona-receptor.

**Resultados:** Las células HEK 293 transfectadas con cada una de las construcciones por separado demostró que las quimeras (Mas-YFP y B<sub>2</sub>-CFP) se expresan correctamente en la membrana plasmática, que fueron reconocidas por cada uno de los ligandos y su

estimulación produjo la activación de transducción de señales, lo cual demuestra la correcta funcionalidad de las mismas. Cuando se realizó FRET en las células HEK 293 transfectadas con ambas construcciones, o sea que expresan ambas quimeras en la misma célula, se observó que existe una interacción constitutiva entre los receptores Mas y B<sub>2</sub> en la membrana plasmática. La estimulación con el ligando, Ang-(1-7) o BK, produjo redistribución de la fluorescencia producto de las quimeras Mas-YFP y B<sub>2</sub>-CFP dentro de vesículas intracelulares. Estas células presentaron FRET positivo. Esto sugiere que el ligando estimula la internalización del hetero-oligómero formado. Por ensayos de unión-receptor observamos que la estimulación con BK por 30 minutos, indujo la internalización del receptor B<sub>2</sub> en un 91 ± 4% y un 53 ± 3% de los receptores Mas, mientras que la estimulación con Ang-(1-7) indujo la internalización del receptor Mas en un 82 ± 6% y un 58 ± 4% de los receptores B<sub>2</sub>.

**Conclusiones:** Nuestros resultados demuestran que existe interacción entre los receptores Mas y B<sub>2</sub>, un hetero-oligómero constitutivo, y que este hetero-oligómero es internalizado por estímulo de cualquiera de sus ligandos, disminuyendo así, no solo los receptores en membrana del receptor correspondiente del ligando, sino también, del otro receptor.

## BP3. MECANISMOS VASCULARES Y RENALES INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DE HIPERTENSIÓN POR DEFICIENCIA DE ZINC DURANTE LA VIDA FETAL Y POSNATAL

F. Mendes Garrido, N. Gobetto, L. Juriol, M. Dasso, V. Radionovas, D. Cardelli, G. Wenk, R. Elesgaray, A. Costa, M. Gironacci, A. Tomat y C. Arranz

Cátedras de Fisiología y de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. IQUIMEFA-IQUIFIB-CONICET.

**Introducción:** Ratas macho sometidas a deficiencia prenatal y postnatal de zinc presentan aumento de presión arterial (PA) e inadecuada función renal en la adultez, con disminución del número de nefronas, fibrosis, disfunción del sistema del óxido nítrico (NO), aumento del estrés oxidativo y apoptosis renal.

**Objetivos:** Estudiar, en ratas macho adultas expuestas a restricción moderada de zinc durante la vida fetal, la lactancia y/o el crecimiento post-destete: 1) Componentes del sistema renina an-

Tabla BP3.

	Cc	Bb	Bc
PAS(mmHg)	123 ± 1	142 ± 1*	146 ± 2*
Corteza renal			
Contenido de AngII (ng/g.tej.)	1,1 ± 0,1	2,7 ± 0,8*	1,4 ± 0,2
Expresión ARNmECA/GADPH vs Cc	1, 0 ± 0,08	6,4 ± 0,6*†	1,2 ± 0,1
Expresión proteica AT-1R/β-actina vs Cc	1,00 ± 0,09	2,8 ± 0,2*	2,2 ± 0,2*
Aorta torácica			
Aart (mm <sup>2</sup> )	2,29 ± 0,09	1,7 ± 0,1*†	2,5 ± 0,2
Am/Aluz (%)	22,8 ± 0,4	23,0 ± 0,4	23,8 ± 0,6
Co-media (score)	1,1 ± 0,6	3,1 ± 0,3*†	1,6 ± 0,3
Actividad NOS (pmol l [ <sup>14</sup> C] L-Citrulina/g tej.min)			
Basal	225 ± 5	172 ± 4*	160 ± 8*
+ Aminoguanidina	215 ± 3	170 ± 7	161 ± 9
+ 7-Nitroindazol	218 ± 3	172,2 ± 0,1	171 ± 18
+ Calmidazolium	55 ± 2‡	64,3 ± 0,4§	61 ± 9#
Respuesta vasorrelajante a acetilcolina (% relajación respecto a contracción máxima con fenilefrina 10-5M)			
Emax	90 ± 1	76 ± 5*	77 ± 3*

†p < 0,01 vs Bc; \*p < 0,01 vs Cc; ‡p < 0,0001 vs NOS basal Cc; §p < 0,0001 vs NOS basal Bb; #p < 0,0001 vs NOS basal Bc.

giotensina (SRA) renal; 2) Morfología y reactividad de la aorta torácica, actividad de NO sintasa (NOS) y sus isoformas.

**Métodos:** Ratas Wistar hembras recibieron dieta baja en zinc (B, 8 ppm) o control (C, 30 ppm) durante la preñez hasta el destete. Un grupo de crías macho nacidas de madres B continuaron con dieta B(Bb) o C(Bc), respectivamente hasta la adultez. Las crías de madres C recibieron dieta C (Cc). A los 81 días se determinó PA sistólica (PAS, método tail-cuff). En corteza renal determinamos: contenido de angiotensina II (AngII) por radioinmunoensayo, expresión de ARNm de enzima convertidora de angiotensina (ECA) por RT-qPCR y expresión proteica de receptores AT1 (AT1-R) por western blot. En aorta torácica se determinó: en cortes con Sirius Red: Aart (área de sección transversal), Am/Aluz (área de la media/área de luz), Co-media (colágeno en capa media, score de 0-4). La actividad de la NOS (utilizando [<sup>14</sup>C]L-arginina como sustrato) y sus isoformas (eNOS, nNOS, iNOS) en presencia de: aminoguanidina (1 mM), inhibidor de iNOS; 7-nitroindazol (10  $\mu$ M), inhibidor de nNOS; Calmidazolium (1  $\mu$ M), antagonista de calmodulina.

**Resultados:** Respuesta máxima de anillos (Emáx) a la acetilcolina ( $10^{-11}$ - $10^{-8}$ M). ANOVA de una-vía, test a posteriori Bonferroni (n = 6 /grupo).

**Conclusiones:** El inadecuado aporte prenatal y postnatal de zinc incrementa la actividad del SRA de corteza renal, lo cual contribuiría al desarrollo de alteraciones renales y al aumento de la PA en las ratas macho adultas. Bb presenta aortas más pequeñas que presentan signos de fibrosis en la capa media y menor actividad NOS. La restricción de zinc durante la vida fetal y la lactancia deja una impronta que no puede corregirse con el aporte adecuado de zinc post-destete. La deficiencia de zinc prenatal y postnatal induce cambios vasculares y en el SRA-renal que contribuirían a la programación de alteraciones cardio-reno-vasculares en la adultez.

#### BP4. EL INTERCAMBIADOR $\text{Na}^+/\text{H}^+$ CARDÍACO (NHE-1) COMO PUNTO DE BIFURCACIÓN DE LA HIPERTROFIA CARDÍACA HACIA EL FENOTIPO FISIOLÓGICO O PATOLÓGICO

A.M. Yeyes, M.C. Villa-Abrille, N.G. Pérez e I.L. Ennis

Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP-CONICET.

**Introducción:** La hiperactividad del NHE-1 juega un papel crítico en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca (HC) patológica, sin embargo su vinculación con la HC fisiológica no ha sido dilucidada.

**Objetivo:** Evaluar la relevancia del NHE-1 en el desarrollo de HC fisiológica.

**Métodos y resultados:** Utilizamos ratas Wistar macho adultas sometidas a una rutina de entrenamiento (natación, 90 min/día, 5 días/semana, 3 meses; grupo E) y sus respectivos controles sedentarios (grupo S). El entrenamiento provocó el desarrollo de HC (peso biventricular/longitud tibial 22,0 vs 24,3 mg/mm, S vs E; p < 0,05). La HC fue de tipo fisiológico ya que no se evidenció fibrosis (% de colágeno intersticial 1,73 ± 0,05 vs 1,42 ± 0,09; S vs E; p < 0,05) ni cambios significativos en la expresión del marcador de HC patológica BNP. Exploramos las rutas de señalización intracelular involucradas hallando activación de la ERK1/2 (100 ± 18,4 vs 164 ± 17,4%; S vs E; p < 0,05) pero no de la fosfatasa calcineurina, crítica en la fisiopatología de la HC patológica (100 ± 10,2 vs 95,6 ± 12,5%; S vs E; p < 0,05). La vía de ERK1/2 fosforila y activa al NHE-1, por ello evaluamos la fosforilación del intercambiador en el sitio de consenso para esta vía (residuo Ser703) detectando un aumento (100 ± 9,25 vs 134 ± 10,15; S vs E; p < 0,05) de modo similar a lo que ocurre en la HC patológica. La hiperactividad del NHE-1 provoca aumento del  $\text{Na}^+$  intracelular que favorece el aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular a través del modo inverso del inter-

cambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Este incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  se asocia a activación de la calcineurina y el desarrollo de HC patológica. Por ello exploramos en cardiomocitos aislados la función del NHE-1 en presencia de IGF-1, el inductor más relevante de HC fisiológica. La actividad del NHE-1 evaluada según el eflujo de  $\text{H}^+$  ( $J_{\text{H}}$ ) durante la recuperación de una acidosis sostenida (situación en la que la fosforilación del NHE-1 por la vía de la ERK1/2 es responsable de estimular su actividad) fue significativamente reducida en presencia de IGF-1 ( $J_{\text{H}}$  a pH 6,8: 3,11 ± 0,41 vs 1,41 ± 0,26, control vs IGF-1 respectivamente, p < 0,05). Este efecto se previno cuando el IGF-1 se utilizó en presencia de wortmanina, inhibidor de PI3-K, eslabón inicial en la señalización intracelular disparada por activación del receptor de IGF-1 ( $J_{\text{H}}$  a pH 6,8: 3,04 ± 0,47). Estos resultados junto al antecedente de la propuesta de una fosforilación inhibitoria del NHE-1 por AKT motivaron el análisis de la fosforilación del NHE-1 en el sitio de consenso para AKT en el miocardio hipertrófico de las ratas entrenadas. Hallamos un aumento significativo de la fosforilación en dicho sitio en el miocardio hipertrófico (100 ± 9,6 vs 152 ± 19,4%; S vs E; p < 0,05). **Conclusiones:** El NHE-1 sería un punto de bifurcación en la señalización intracelular que conduce al desarrollo de HC fisiológica y patológica. La hiperactividad del NHE-1 favorecida por su fosforilación por la vía de la ERK1/2 conduciría al aumento del  $\text{Na}^+$  y del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, activación de calcineurina y desarrollo de HC patológica. En cambio, la fosforilación inhibitoria del NHE-1 dependiente AKT evitaría su hiperactividad desviando la señalización hacia el fenotipo de HC fisiológica.