



COMUNICACIONES PÓSTER

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

Oviedo, 11-13 de marzo de 2015

Investigación preclínica

1. PAPEL PROTECTOR DEL ÁCIDO OLEICO EN LA RESISTENCIA CARDIOVASCULAR A LA INSULINA Y EN EL DESARROLLO E INESTABILIDAD DE LA PLACA ATEROSCLERÓTICA

N. Beneit¹, L. Perdomo¹, Y.F. Otero¹, O. Escribano¹,
S. Díaz-Castroverde¹, N. de las Heras², M. Benito¹
y A. Gómez-Hernández¹

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, CIBERDEM; ²Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, RECAVA, UCM.

Objetivo: Diversos estudios han identificado un papel diferencial de los ácidos grasos saturados e insaturados en relación a sus efectos a nivel cardiovascular. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales el ácido oleico protege en las células cardiovasculares no son tan conocidos. Por estos motivos, nos planteamos estudiar el efecto protector del oleato y diferencial con respecto al palmitato en la resistencia a la insulina y en el inicio, desarrollo e inestabilidad del proceso aterosclerótico.

Métodos: Para llevar a cabo este estudio se utilizaron diferentes líneas de células cardiovasculares, como cardiomocitos neonatales (CMs), células de músculo liso vascular (VSMCs) y células endoteliales (ECs). Para los estudios de señalización de insulina se han realizado Western blot e immunoprecipitaciones, para analizar la expresión de los genes implicados en la disfunción vascular se ha utilizado la PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) y para el estudio de la proliferación y apoptosis de las VSMCs se realizaron experimentos de incorporación con BrdU, ciclo celular y Western blot.

Resultados: En primer lugar, mediante Western blot demostramos que el oleato no sólo no indujo resistencia cardiovascular a la insulina sino que además protegió frente a la resistencia a la insulina inducida por el palmitato o el TNF- α . Uno de los mecanismos que podría estar implicado es la reducción de la activación de JNK-1/-2 o NF- κ B por el oleato. Nosotros también observamos que el oleato es capaz de reducir la expresión de MCP-1 e ICAM-1 y au-

mentar la expresión de eNOS inducida por citoquinas proinflamatorias en ECs por qRT-PCR. Además, nuestros resultados demuestran también que el oleato reduce la proliferación inducida por TNF- α , angiotensina II o palmitato, además de disminuir la apoptosis inducida por el TNF- α o la tapsigargina en VSMCs. Finalmente, el oleato también fue capaz de reducir los niveles proteicos de PAI-1 inducidos por el TNF- α en células de músculo liso vascular a través de la reducción de la activación de NF- κ B.

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren un papel diferencial entre el oleato y el palmitato a nivel cardiovascular y aportan nuevos datos que soportan el papel protector del oleato como principal componente lipídico del aceite de oliva virgen, clave en la dieta mediterránea. Así, el oleato protege frente a la resistencia cardiovascular a la insulina, mejora la disfunción y activación endotelial y finalmente, reduce la proliferación y apoptosis de las VSMCs contribuyendo a mejorar el proceso aterotrombótico y su estabilidad.

2. DIMORFISMO SEXUAL EN LA PROGRAMACIÓN FETAL DE LA HIPERTENSIÓN EN LA RATA. ESTUDIO DEL REMODELADO DE LA AORTA AL DESTETE Y EN LA EDAD ADULTA

P. Gutiérrez¹, P. Rodríguez¹, D. Ramiro¹, A.L. López de Pablo¹,
P. Prachaney³, M.C. González¹, J. Regadera² y S.M. Arribas¹

¹Departamento de Fisiología; ²Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia; ³Department of Anatomy.

Introducción: El estrés durante la etapa fetal -por desnutrición, hipoxia, inadecuada placentación, entre otros- es un factor de riesgo del desarrollo de hipertensión en el adulto, fenómeno conocido como programación fetal. Este incremento de la presión arterial ha sido asociado con alteraciones vasculares estructurales o funcionales y es menos acentuado en hembras. Sin embargo, no se conoce si existe dimorfismo sexual en las alteraciones vasculares ni si se manifiesta en etapas tempranas del desarrollo. El objetivo del presente trabajo es estudiar si la programación fetal induce alteraciones en la estructura vascular en la etapa pre-púber que puedan justificar las diferencias en el desarrollo de hipertensión entre machos y hembras.

Métodos: Se utilizó un modelo experimental de programación fetal en rata Sprague-Dawley. Las ratas gestantes fueron alimentadas con dieta estándar *ad libitum* (Control, C) o con un 50% de la ingesta de las ratas C durante la segunda mitad de la gestación (Restringidas, R). Cada camada se ajustó a 12 individuos que se dividieron en dos grupos (3 machos y 3 hembras), uno para el estudio a los 21 días y otro para su estudio a los 6 meses de edad. La presión arterial sistólica y diastólica (PAS, PAD) se midió bajo analgesia con medetomidina (0,25 mg/kg) y anestesia con ketamina (0,75 mg/kg) mediante un catéter insertado en la arteria ilíaca. La estructura de la arteria aorta se estudió en anillos y secciones longitudinales teñidos con el colorante nuclear DAPI, mediante microscopía confocal de fluorescencia. Para analizar la estructura de la aorta se midieron: el diámetro interno, el grosor de la capa media y de la adventicia y el número de células de la adventicia, calculándose el área de la sección de corte (ASC) y la densidad celular.

Resultados: A los 21 días de edad, las ratas R en comparación con las C presentaron: 1) valores de PAS y PAD similares; 2) valores similares de diámetro interno; 3) valores similares de grosor de la media; 4) valores similares de grosor de la adventicia, pero menor densidad de células; 5) ninguno de los parámetros estudiados presentó diferencias significativas entre machos y hembras. A los 6 meses de edad se observó: 1) valores de PAS y PAD significativamente mayores en machos R con respecto a C y similares entre hembras R y C; 2) diámetro interno de la aorta similar entre machos R y C, pero mayor diámetro en hembras R que en las C; 3) mayor grosor y ASC de la media, tanto en machos como en hembras; 4) mayor grosor y similar densidad de células de la adventicia, tanto en machos como en hembras.

Conclusiones: La desnutrición fetal programa la hipertensión en la edad adulta sólo en los machos y se presenta asociada a remodelado hipertrófico de la aorta sin cambios en el diámetro interno. El remodelado hipertrófico “outward” de la aorta que presentan las hembras R en la edad adulta puede contribuir a que no desarrollen hipertensión. Este dimorfismo sexual puede estar asociado, entre otros factores, con el efecto protector de los estrógenos.

3. FACTORES MOLECULARES IMPLICADOS EN EL EFECTO HIPOLIPEMIANTE Y DE SENSIBILIZACIÓN A LA INSULINA DE UN EXTRACTO DE JENGIBRE EN RATAS CON SOBREPESO

A. Galiana, M. Valero-Muñoz, B. Martín-Fernández, S. Ballesteros, M. Klett-Mingo, M.B. Ruiz-Roso, V. Lahera y N. de las Heras

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

Objetivo: El objetivo del estudio fue evaluar los factores moleculares implicados en los efectos de un extracto de jengibre sobre el perfil lipídico y la sensibilidad a la insulina en el hígado de ratas con sobrepeso inducido por una dieta grasa.

Métodos: Se utilizaron ratas Wistar macho divididas en tres grupos: i) ratas alimentadas con dieta estándar como grupo control (C); ii) ratas alimentadas con dieta alta en grasa (33,5% de grasa saturada) como grupo con sobrepeso (SBP); y iii) ratas alimentadas con dieta alta en grasa tratadas con extracto de jengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) (SBP+JEN, 250 mg Kg⁻¹ dia⁻¹) en el agua de bebida. El periodo de evolución y tratamiento fue de 5 semanas. Se determinaron las concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina, colesterol total (Col-T), triglicéridos (TG), lipoproteína de baja densidad (LDL), leptina y adiponectina. En el hígado se valoró la expresión proteica de: el transportador de glucosa 2 (GLUT-2); glicerol 3 fosfato aciltransferasa (GPAT, enzima limitante de la síntesis de TG); colesterol 7 alfa hidroxilasa (CYP7A1, enzima limitante de la síntesis de ácidos biliares a partir de colesterol); los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR α y PPAR γ), el

receptor X hepático (LXR), la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroles (SREBP1c), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y colágeno tipo 1.

Resultados: El peso corporal fue mayor ($p < 0,05$) en las ratas SBP que en C, y el tratamiento con JEN lo redujo ($p < 0,05$). Los niveles plasmáticos de glucosa e insulina aumentaron en las ratas SBP respecto a las ratas C ($p < 0,05$), y disminuyeron ($p < 0,05$) en las ratas SBP tratadas con jengibre (SBP+JEN). Los niveles plasmáticos de Col-T y TG fueron mayores ($p < 0,05$) en las ratas SBP que en las C, y el tratamiento con JEN los redujo ($p < 0,05$). Las concentraciones plasmáticas de adiponectina fueron comparables en las ratas C y SBP, y las de leptina fueron mayores ($p < 0,05$) en las ratas SBP que en las C. El tratamiento con el extracto de JEN aumentó los niveles de adiponectina y redujo los de leptina ($p < 0,05$). La expresión proteica en hígado de GPAT (fue mayor ($p < 0,01$) en ratas SBP que en C, y el tratamiento con JEN redujo ($p < 0,001$) su expresión. La expresión de CYP7A1 hepática fue comparable en los tres grupos. La expresión de PPAR α , PPAR γ y GLUT-2 fue menor ($p < 0,05$) en ratas SBP que en C, y el tratamiento con JEN aumentó la expresión de estos tres parámetros ($p < 0,05$). La expresión de LXR y SREBP1c aumentó en las ratas SBP respecto a las C, y el tratamiento con JEN lo normalizó. La expresión hepática de colágeno tipo I y CTGF fue mayor ($p < 0,01$) en SBP y disminuyó ($p < 0,01$) en las ratas SBP+JEN.

Conclusiones: La reducción de las concentraciones plasmáticas de lípidos y la sensibilización a la insulina del extracto de jengibre en las ratas con SBP, podrían atribuirse al menos en parte, a los efectos beneficiosos ejercidos sobre los factores hepáticos implicados en el metabolismo de la glucosa y los lípidos. La mejora en los niveles de leptina, adiponectina, PPAR α , PPAR γ , LXR, SREBP1c, CTGF y colágeno tipo 1 parecen ser cruciales en los efectos del extracto de jengibre. Por tanto, la utilización del extracto de jengibre podría considerarse una estrategia terapéutica alternativa para el tratamiento de las alteraciones metabólicas y hepáticas asociadas al sobrepeso.

El estudio fue financiado por Biosearch, S.A. Proyecto PRONAOS otorgado por el centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI) a través del programa CENIT, iniciativa “Ingenio 2010” y por una subvención de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología de España (SAF2011-30396).

4. EFECTO MODULADOR DE LA L-CARNITINA SOBRE LA ACTIVACIÓN DE LA NADPH OXIDASA POR ENDOGLINA SOLUBLE EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE LA VENA UMBILICAL HUMANA

C.M. Vázquez¹, C. Martínez², R. Fernández², A.J. Blanca¹, M.V. Ruiz¹, J.L. Miguel¹, A. Leiva³, R. Salsoso³, L. Sobrevia³ y A. Mate¹

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. ²Departamento de Ginecología y Obstetricia, Hospital Quirón Sagrado Corazón. ³Laboratorio de Fisiología Molecular y Celular, División de Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Objetivo: La preeclampsia (PE) es una alteración hipertensiva del embarazo que cursa con un deficiente remodelado de las arterias uterinas durante el desarrollo placentario y con la aparición de disfunción endotelial en la unidad materno-fetal. Existen diversos mecanismos relacionados con la patogenia y fisiopatología de la disfunción endotelial subyacente en la PE. Entre ellos destacan el aumento de estrés oxidativo mediado por la enzima NADPH oxidasa, así como la liberación de factores antiangiogénicos que inhiben la producción de óxido nítrico, como el soluble *fms-like tyrosine kinase-1* (sFlt-1) y la endoglina soluble (sEng). Estudios previos de nuestro grupo han mostrado que la L-carnitina (LC) tiene propieda-

des antioxidantes en modelos animales de hipertensión arterial, modulando la función de la enzima NADPH oxidasa. Puesto que se han descrito también alteraciones en el metabolismo de la LC en mujeres preeclámpicas, el objetivo de este trabajo es evaluar la actividad y expresión de las diferentes isoformas de la enzima NADPH oxidasa, en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*) incubadas con sEng, estudiando su modulación por parte de la LC y las rutas de señalización implicadas.

Métodos: Las HUVEC se han obtenido a partir de cordones umbilicales procedentes de embarazos normales, mediante el empleo de colagenasa. Las células se han cultivado en medio M-199 suplementado con 20% de suero y 1% de penicilina/estreptomicina. Cuando alcanzan confluencia, se incuban en presencia de medio M-199 mínimo (4% suero) con sEng (10 ng/mL, 24h) y, en su caso, L-carnitina (1 mM, 24h + 30 min. preincubación). Se han realizado medidas de actividad NADPH oxidasa mediante quimioluminiscencia y utilizando lucigenina (5 µM), NADPH (0,1 mM) y homogeneizados de HUVEC (en cantidad equivalente 30 µg de proteína), en presencia y ausencia de inhibidores específicos de distintas fuentes productoras de anión superóxido. La expresión génica y proteica de las subunidades de la NADPH oxidasa se ha evaluado por PCR a tiempo real y *Western blotting*, respectivamente. También se han analizado las vías de señalización intracelulares implicadas en el efecto de la sEng, mediante el empleo de inhibidores específicos.

Resultados: La producción de anión superóxido está aumentada en el grupo de células incubadas con sEng. Esta alteración se debe a una mayor actividad y expresión de la enzima NADPH oxidasa. La LC revierte completamente estos parámetros. Además, la proteína quinasa C (PKC) parece estar involucrada en la sobreproducción de anión superóxido inducida por sEng.

Conclusiones: La endoglin soluble (sEng, factor antiangiogénico relacionado con la fisiopatología de la preeclampsia) produce un aumento de estrés oxidativo, a través de la activación de la enzima NADPH oxidasa, en HUVEC procedentes de embarazos sanos. La preincubación con L-carnitina previene esta alteración, lo que podría justificar el uso de este producto en la investigación de la fisiopatología y terapéutica de la preeclampsia.

Agradecimientos: Consejería de Igualdad, Salud y Políticas Sociales, Junta de Andalucía (PI-0060/2012).

5. EL EJERCICIO AERÓBICO MODERADO PREVIENE LAS ALTERACIONES EN LA FUNCIÓN DE LA INERVACIÓN PERIVASCULAR PROducIDA POR UNA DIETA RICA EN GRASA EN ARTERIA MESENTÉRICA DE RATA

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

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

Introducción: El objetivo fue analizar si la obesidad inducida por una dieta rica en grasa se asocia con cambios en la función de la inervación perivascular mesentérica, los mecanismos implicados así como la posibilidad de evitar estos efectos a través del ejercicio aeróbico moderado sobre esos cambios.

Métodos: Se utilizaron ratas Wistar macho (250-300g) divididos en tres grupos: (i) ratas alimentadas con dieta estándar (grupo control); (ii) ratas alimentadas con dieta rica en grasa (33,5% grasa) durante 8 semanas (grupo HFD); (iii) ratas HFD simultáneamente sometidas a entrenamiento aeróbico moderado (8 semanas, 5 veces a la semana durante 50 min). Se extrajo la arteria mesentérica superior y se analizó la vasoconstricción inducida por estimulación eléctrica (EE) en presencia del antagonista α-adrenérgico, fentolamina; del antagonista purinérgico, suramina; y del inhibidor ines-

pecífico de la óxido nítrico sintasa (NOS), N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME). Se analizaron las respuesta vasomotoras a noradrenalina (NA) y al donante de óxido nítrico (NO) DEA-NO. Se valoró la liberación inducida por EE de NA, ATP y NO, así como la expresión de la NOS neuronal (nNOS) y la forma fosforilada (p-nNOS).

Resultados: La vasoconstricción inducida por EE fue mayor en el grupo HFD en comparación con el control. La fentolamina redujo la contracción inducida por EE en mayor grado en el grupo HFD, mientras que la suramina únicamente disminuyó la respuesta inducida por EE en el grupo control. La liberación de NA aumentó y la de ATP disminuyó en el grupo HFD. El L-NAME incrementó la respuesta inducida por EE en mayor medida en el grupo control. La expresión de nNOS y p-nNOS disminuyó en el grupo HFD en comparación con el control. Ninguno de los cambios observados en el grupo HFD se observaron en el grupo HFD sometido a entrenamiento. Las respuestas vasomotoras a NA y DEA-NO fueron similares en todos los grupos experimentales.

Conclusiones: El incremento en la liberación de NA y el descenso en la liberación de NO de origen neuronal, contribuyen al incremento en la respuesta vasoconstrictora inducida por EE en arteria mesentérica de ratas HFD. El ejercicio físico moderado previene todos esos cambios, indicando que el entrenamiento físico evita las alteraciones en la función de la inervación perivascular producidas por una dieta rica en grasa.

Subvencionado por Fundación Mapfre y Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2012-38530).

6. PAPEL DE LA GALECTINA-3 EN EL REMODELADO CARDIACO ASOCIADO A LA HIPERTENSIÓN EN RATA

E. Martínez-Martínez¹, M. Miana², M. Luaces³, F. Islas³, R. Jurado-López², E. Rousseau⁴, A. Fernández¹, P. Rossignol⁴, V. Cachofeiro² y N. López¹

¹Navarrabiomed-Fundación Miguel Servet. ²Universidad Complutense de Madrid. ³Hospital Clínico San Carlos. ⁴Université de Lorraine And CHU de Nancy.

Objetivo: La hipertensión arterial (HTA) predispone a la aparición de cambios tanto en la estructura como en la función cardíaca, siendo considerada como una de las principales causas que favorecen la aparición de insuficiencia cardíaca. En los últimos años, la galectina-3 (Gal-3) ha emergido como un mediador de daño cardíaco en diferentes modelos de insuficiencia cardíaca. El objetivo de este estudio fue estudiar los efectos de un inhibidor de la actividad de la Gal-3 (el MCP), sobre las alteraciones cardíacas en un modelo de hipertensión en rata, así como los posibles mecanismos involucrados.

Métodos: Se utilizaron 4 grupos de ratas macho: 1) Wistar-Kyoto (WKY), 2) ratas espontáneamente hipertensas (SHR), 3) WKY tratadas con MCP (100 mg/kg/día) en el agua de bebida, y 4) SHR tratadas con MCP. El tratamiento se mantuvo durante 6 semanas, en las cuales se monitorizó la presión arterial. Al final del tratamiento, se valoró la función cardíaca mediante ecocardiografía. La fibrosis miocárdica se cuantificó mediante tinción con rojo Sirio, y la expresión proteica de mediadores de fibrosis e inflamación (colágeno I, TGF-β, CTGF, Gal-3, OPN y MCP-1) mediante RT-PCR y western blot.

Resultados: El grupo de animales hipertensos mostró un aumento en los niveles de Gal-3 a nivel cardíaco, así como un aumento del peso relativo del corazón respecto al grupo WKY. Los datos ecocardiográficos muestran presencia de hipertrofia concéntrica en el grupo SHR, acompañada de una hipertrofia de cardiomiocitos a nivel histológico. No se observaron diferencias en la función sistólica en ninguno de los grupos estudiados. El tratamiento con MCP no tuvo ningún efecto sobre la función, la histología o los marcadores

de fibrosis e inflamación en las ratas WKY. En las ratas SHR, el tratamiento con MCP no modificó la presión arterial ni la hipertrofia cardiaca. Sin embargo, la inhibición de la Gal-3 previno la fibrosis intersticial observada en el grupo SHR. Junto con esta disminución en los niveles de colágeno total, el bloqueo de Gal-3 redujo los niveles cardíacos de colágeno tipo I, así como distintos mediadores profibróticos (TGF- β y CTGF) y marcadores proinflamatorios (OPN y MCP-1) que estaban aumentados en los animales hipertensos.

Conclusiones: Los datos muestran que el aumento de los niveles cardíacos de Gal-3 en un modelo de hipertensión se acompaña con un aumento de la fibrosis miocárdica, la cual podría predisponer a alteraciones estructurales y funcionales. El bloqueo de Gal-3 inhibe específicamente la fibrosis miocárdica en los animales hipertensos, independientemente de los niveles de presión arterial. La Gal-3 emerge como una nueva diana terapéutica en el proceso fibrótico asociado a patologías cardíacas.

7. PARICALCITOL PRESENTA EFECTOS

ANTIINFLAMATORIOS A TRAVÉS DE LA MODULACIÓN DE LA VÍA NO CLÁSICA DE NF κ B EN ENFERMEDADES RENALES EXPERIMENTALES

S. Rayego¹, J.L. Morgado¹, A.B. Sanz², J.M. Valdivielso³, J. Egido², A. Ortiz² y M. Ruiz¹

¹IIS Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid.

²IIS Fundación Jiménez Díaz. ³Departamento de Nefrología Experimental, Universidad de Lleida, Institut de Recerca Biomèdica de Lleida.

Objetivo: La enfermedad renal crónica (ERC) está caracterizada por una pérdida progresiva de la función renal que frecuentemente deriva en una enfermedad renal terminal y una elevada mortalidad. La deficiencia en vitamina D y sus metabolitos activos es una situación común en la patogenia de la ERC. Datos en modelos experimentales confirman el efecto de la vitamina D más allá del metabolismo mineral y óseo, demostrando que la vitamina D y sus análogos pueden revertir la progresión de la ERC a través de la prevención de la proliferación, inflamación y fibrosis. Sin embargo, los mecanismos implicados en sus acciones antiinflamatorias no son bien conocidos. Estudios previos han demostrado la contribución de la vía clásica de NF κ B1 en el daño renal, sin embargo apenas hay datos sobre la vía alternativa NF κ B2. Nuestro objetivo ha sido evaluar en diferentes modelos experimentales de daño renal si el efecto antiinflamatorio de paricalcitol es debido a la modulación de la vía clásica NF κ B1 o de su alternativa NF κ B2.

Métodos: El efecto de paricalcitol *in vivo* fue estudiado en distintos modelos de daño renal en ratones C57BL6. El efecto de TWEAK (citoquina inductora de apoptosis semejante al factor de necrosis tumoral) fue evaluado 24 horas después de la inyección intraperitoneal de TWEAK (0,5 μ g/por ratón). El modelo de obstrucción unilateral del uréter (UUO) consiste en la ligación del uréter izquierdo y el corte del mismo para evitar infecciones del tracto urinario. En ambos modelos, los animales fueron tratados con un análogo de la vitamina D (paricalcitol) (25 μ g/kg/día) comenzando 48 horas antes de la intervención. *In vitro* se realizaron experimentos en células tubulares, ya que se ha descrito que expresan los componentes de la vía alternativa NF κ B2.

Resultados: En ambos modelos experimentales (UUO y daño renal por TWEAK) el tratamiento con Paricalcitol disminuyó la respuesta inflamatoria renal, determinada por la disminución de infiltrado inflamatorio y de la expresión de genes proinflamatorios (IL-6, MCP-1; RANTES), como era esperado. Sorprendentemente paricalcitol no modificó la activación renal de la vía clásica de NF κ B1 (evaluada por cambios en niveles de fosforilación de I κ B- α y translocación nuclear de p65). Sin embargo, en ambos modelos se inhibió la activación de la vía de NF κ B2 caracterizada por la regula-

ción de factores como P100/p52, IKK- α o rel B, y de citoquinas reguladas exclusivamente por NF κ B2, como CCL19 y CCL21. Estos resultados se han confirmado *in vitro* en células tubuloepiteliales estimuladas con TWEAK en presencia o no de Paricalcitol.

Conclusiones: Nuestros resultados muestran que la modulación de la vía alternativa de NF κ B es un nuevo mecanismo de las acciones anti-inflamatorias del análogo de la vitamina D paricalcitol en el daño renal.

8. INVESTIGACIÓN DEL PAPEL DE LA QUIMIOQUINA CCL-8 EN EL DAÑO RENAL Y VASCULAR ASOCIADO A INFLAMACIÓN

M. Orejudo¹, R. Rodrigues¹, A.B. García¹, M. Alique¹, T. Bellón², J. Egido¹, R. Selgas² y M. Ruiz¹

¹Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz.

²Hospital Universitario La Paz-Idipaz.

Objetivo: La inflamación crónica es una característica común a las enfermedades renales y de sus complicaciones cardiovasculares. Las proteínas quimiotácticas de monocitos (MCPs) engloban una de las principales familias de citoquinas con motivo C-C, implicadas en la regulación de la respuesta inflamatoria. En estas proteínas se ha descrito diferencia de homología entre especies, lo que complica el abordaje de su estudio. La isoforma murina de MCP-2, también denominada CCL8, es una proteína quimoatrayente para monocitos, células T activadas y células dendríticas. La isoforma humana de CCL8 se une al receptor CCR2, mientras que la murina utiliza CCR8. Nuestro objetivo ha sido estudiar si CCL8 puede contribuir al daño vascular y renal.

Métodos: Se cuantificó la expresión génica de CCL8 y CCR8 en modelos animales de inflamación; obstrucción unilateral de uréter de 5 días y administración sistémica de Angiotensina II (100 mg/kg/min subcutáneo, estudio a 3, 7 y 14 días). Para evaluar la modulación de la respuesta inmune, se bloqueó la respuesta Th17 (con un anticuerpo neutralizante de su citoquina efectora IL-17A). *In vitro* se utilizaron células endoteliales de ratón (línea Mile Sven-1). Se realizó un modelo de administración de CCL8 (dosis 550 ng/g ratón; i.p), estudiándose a las 48 horas. Además, un grupo se trató con el inhibidor de NF- κ B parthenolide (3,5 mg/g, i.p diario, 24 horas anteriores). La expresión génica se evaluó por PCR cuantitativa.

Resultados: En todos los modelos animales de inflamación evaluados la expresión génica tisular de CCL8 aumenta cuando se produce el daño, comparado con el grupo control respectivo. Además, este aumento se revierte con el bloqueo de IL-17A. En el modelo de administración sistémica de angiotensina II detectamos un aumento de la expresión génica del receptor CCR8 con respecto al grupo control. Experimentos *in vitro* realizados en células endoteliales demostraron que CCL8 induce la expresión de algunos genes proinflamatorios y profibróticos. Hemos observado que la dosis de 100 ng/ml produce su mayor efecto proinflamatorio, observado a tiempos cortos (3-6 horas). *In vitro* observamos también que la expresión génica de CCR8 es mínima en estas células, pero en presencia de CCL8 los niveles de RNA mensajero aumentan exponencialmente. Finalmente, en el modelo de administración sistémica de CCL8 se analizó la expresión génica de los riñones de los ratones y se observó un incremento en los niveles de mRNA de MCP-1, IL-6, ICAM-1, osteopontina, TNF- α , el receptor CCR8 y el marcador de daño N-GAL. El bloqueo de NF- κ B, utilizando parthenolide, disminuyó la sobreexpresión de estos genes causada por CCL8, a niveles de los ratones control.

Conclusiones: *In vitro* e *in vivo* CCL8 regula genes proinflamatorios vía NF- κ B. En modelos de daño vascular y renal aumenta el eje CCL8/CCR8 asociado con inflamación indicando su importancia en estas patologías.

9. NOR-1 PREVIENE LA ACTIVACIÓN DE NFkB Y MODULA LA RESPUESTA INFLAMATORIA DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES

I. Martí-Pàmies¹, R. Rodríguez-Calvo¹, O. Calvayrac¹, J. Alonso¹, B. Ferrán¹, S. Aguiló¹, J. Crespo¹, A. Rodríguez-Sinovas², C. Rodríguez¹ y J. Martínez-González¹

¹Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC). ²Hospital Universitario e Instituto de Investigación del Vall d'Hebron, UAB.

Objetivo: Estudios recientes han evidenciado el papel de los receptores NR4A en la aterosclerosis y en la inflamación. Sin embargo, en la proliferación de las células musculares lisas vasculares (CMLV), NOR-1 (NR4A3) ejerce efectos antagonistas a los de Nur77 (NR4A1) y Nurr1 (NR4A2). El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de NOR-1 en la respuesta inflamatoria en las CMLV.

Métodos: El estudio se llevó a cabo en CMLV humanas en cultivo transducidas o no con lentivirus para sobre-expresar NOR-1, y en aorta de ratones transgénicos que sobre-expresan NOR-1 en las CMLV (TgNOR-1). La expresión génica se analizó mediante PCR a tiempo real, Western-blot e inmunocitoquímica. La activación de vías de señalización se analizó mediante Western-blot. Para determinar la actividad transcripcional se realizaron transfecciones transitorias y ensayos de retardo de la movilidad electroforética.

Resultados: Se evaluó el efecto de la ganancia de función de NOR-1 en la respuesta de las CMLV a estímulos inflamatorios. En CMLV humanas, la sobre-expresión de NOR-1 redujo la expresión de citoquinas (IL-1 β , IL-6 y IL-8) y quimiocinas (MCP-1 y CCL20) inducidas por el tratamiento de LPS. Se obtuvieron efectos similares en las células estimuladas con TNF α o LDL oxidadas. Por el contrario, la inhibición de NOR-1 mediante siRNA aumentó la expresión de dichos mediadores pro-inflamatorios. En aortas de ratones transgénicos que sobre-expresan NOR-1 humano en las CMLV, el aumento de expresión de citoquinas y quimiocinas en respuesta a tratamiento con LPS fue inferior al de animales control. Resultados similares se obtuvieron en las CMLV de los animales transgénicos. NOR-1 disminuyó la actividad transcripcional de promotores regulables por NF κ B y su elemento de respuesta. Además, NOR-1 impidió la activación de la vía de NF κ B a través de la disminución de la fosforilación y degradación de I κ B α y de la inhibición de la fosforilación y posterior translocación de p65 en el núcleo. Estos efectos se asociaron con una menor fosforilación de las vías de señalización implicadas en la activación de NF κ B (ERK1/2, p38 MAPK y JNK). Estos resultados se confirmaron *in vivo* en aorta de los animales TgNOR-1 tratados con LPS.

Conclusiones: Nuestros resultados indican que NOR1 actúa como modulador negativo de la respuesta inflamatoria inducida por estímulos inflamatorios agudos a nivel vascular.

10. REEXPRESIÓN DEL GEN DE DESARROLLO GREMLIN EN SITUACIONES DE DAÑO VASCULAR ASOCIADO A LA PRESENCIA DE FIBROSIS

R. Rodrigues¹, A.B. García¹, M. Orejudo¹, C. Lavoz¹, S. Mezzano³, J. Egido¹, R. Selgas² y M. Ruiz¹

¹IIS Fundación Jiménez Diaz. ²Unidad de Investigación, Servicio de Nefrología, Hospital Universitario de la Paz. ³Unidad de Nefrología, Instituto de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile.

Introducción: Gremlin es un miembro de la superfamilia de nudo de cisteína que incluye al factor TGF- β . Gremlin fue identificado como uno de los genes de desarrollo expresado en células mesangiales expuestas a altas concentraciones de glucosa. Recientemente hemos descrito que Gremlin es un mediador de las acciones profibróticas de TGF- β en células renales, actuando a través de la ruta de señalización de Smad, y se ha sugerido que puede ser un media-

dor del daño renal en la nefropatía diabética. En células endoteliales, Gremlin induce migración, invasión y angiogénesis mediante su unión al receptor VEGFR2, pero apenas hay datos a nivel vascular.

Objetivo: Investigar si Gremlin está expresado en situaciones de daño vascular y su posible papel en la regulación de la fibrosis vascular.

Métodos: Modelo de restenosis vascular en arteria femoral acompañado de infusión sistémica de angiotensina II (AngII) (minibombas osmóticas subcutáneas 1.000 ng/kg/min) durante 2 semanas. Los estudios *in vitro* se realizaron en cultivo primario de células vasculares de músculo liso de ratón obtenidas por el método de la colagenasa. Los resultados fueron analizados por diferentes técnicas (PCR en tiempo real, Western blot e inmunohistoquímica).

Resultados: En la aorta de los ratones infundidos con AngII se indujo un aumento en la expresión génica de Gremlin con respecto al grupo control. El aumento en la expresión de Gremlin se correlacionó con la expresión génica de otros factores profibróticos y proteínas de matriz extracelular. Mediante técnicas de inmunohistoquímica observamos la aparición de tinción positiva para Gremlin localizada principalmente en células vasculares de músculo liso, mientras que no encontramos tinción en las aortas de los animales control. El aumento en la síntesis vascular de Gremlin en respuesta a AngII se correlacionó con la presencia de fibrosis, determinado por tinción de fibronectina. En respuesta al daño en arteria femoral se observó restenosis vascular, caracterizada por aumento del grosor de la pared y acumulación de matriz extracelular. En la zona de lesión detectamos tinción positiva para Gremlin, en diferentes tipos celulares. En células de músculo liso vascular provenientes de cultivo primario la estimulación con Gremlin durante 48 horas indujo un aumento en la liberación de proteínas de matriz extracelular, fibronectina y colágeno.

Conclusiones: Estos datos sugieren que Gremlin se expresa en situaciones de daño vascular experimental, asociado a la presencia de fibrosis. Futuros estudios son necesarios para investigar si Gremlin puede ser considerado como una diana terapéutica antifibrótica en enfermedades cardiovasculares.

11. LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA EN CÉLULAS FAGOCÍTICAS PERIFÉRICAS ES DEBIDA EXCLUSIVAMENTE A LA ISOFORMA 2 DE LA NADPH OXIDASA (NOX2)

P. Saldanha¹, A. Pejenaute¹, O. Beloqui², M. Fortún Landecho², A. Fortuño³ y G. Zalba¹

¹Departamento de Bioquímica y Genética, Universidad de Navarra. ²Departamento de Medicina Interna, Clínica Universidad de Navarra. ³Área de Ciencias Cardiovasculares, CIMA, Universidad de Navarra.

Objetivo: El estrés oxidativo asociado a la activación de la familia de las NADPH oxidasas (NOXes) se asocia con la hipertensión arterial y la enfermedad vascular. Los cambios en la actividad NADPH oxidasa obedecen a variaciones en la regulación y/o expresión de la isoforma NOX2. Recientemente, se ha descrito que NOX4 puede aumentar su expresión y actividad en macrófagos, en la aterosclerosis humana. En este estudio pretendemos analizar el perfil de expresión de las NOXes en las células fagocíticas circulantes.

Métodos: El estudio se llevó a cabo en una población de individuos asintomáticos ($n = 220$), y en una población de pacientes con enfermedad arterial coronaria ($N = 20$). En ambas poblaciones se determinó la actividad NADPH oxidasa en las células mononucleadas de sangre periférica, por luminiscencia. Así mismo, se determinaron los niveles de mRNA de las isoformas NOX2, NOX4 y NOX5, en células mononucleadas de sangre periférica, mediante PCR en tiempo real. Se determinaron los niveles de LDL oxidadas y de longitud de telómeros, mediante ELISA y PCR, respectivamente. Se realizaron estudios de asociación de estos parámetros, entre sí, y con las variables clínicas analizadas.

Resultados: En la población asintomática, los niveles de expresión más altos entre las NOXes analizadas correspondieron a los de la isoforma NOX2, siendo casi indetectables los niveles de expresión de NOX4 y NOX5. En esta población, la actividad NADPH oxidasa correlacionaba positivamente con los niveles de expresión de la NOX2 y con los valores de presión arterial sistólica. De hecho, cuando analizábamos la población asintomática encontramos que la actividad NADPH oxidada y la expresión de NOX2 eran máximas en los pacientes con hipertensión arterial, no encontrando diferencias para NOX4 ni NOX5. Como era de esperar, los sujetos hipertensos comparados con los normotensos exhibían niveles más altos de LDL oxidadas, y longitudes más cortas de los telómeros. En la población sintomática, la actividad NADPH oxidasa y la expresión de NOX2 eran significativamente más altas que las encontradas en la población asintomática. Los niveles de expresión de NOX4 y NOX5 fueron similares, casi indetectables, a los descritos en la población asintomática. Finalmente, en la población sintomática, los niveles de LDL oxidadas y la longitud de los telómeros fueron máximos y mínimos, respectivamente.

Conclusiones: La actividad NADPH oxidasa determinada en células fagocíticas de sangre periférica está determinada exclusivamente por el grado de activación y los niveles de expresión de NOX2, en situaciones fisiológicas, siendo despreciable la participación en esta actividad de las isoformas NOX4 y NOX5.

12. EFECTO DEL RESVERATROL SOBRE MARCADORES OXIDATIVOS E INFLAMATORIOS EN CORAZÓN DE RATA EN RELACIÓN AL ENVEJECIMIENTO

R. Torregrosa¹, M. Miana¹, E. Vara², J.A. Fernández¹ y R. Gredilla¹

¹Departamento de Fisiología; ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

Diferentes estudios apoyan que varios aspectos del estilo de vida, incluyendo la dieta o la exposición a tóxicos ambientales, son importantes factores de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, tales como cardiopatía isquémica, insuficiencia cardiaca, infarto e hipertensión. Sin embargo, el factor de riesgo más importante en la aparición de patologías asociadas al sistema cardiovascular es el envejecimiento. Así, el determinante más importante de la salud cardiovascular de una persona es su propia edad. Debido al incremento en la esperanza de vida de la población en países occidentales, es de gran relevancia entender los mecanismos que subyacen al desarrollo de tales patologías durante el envejecimiento. Dos de los mecanismos que se consideran determinantes del envejecimiento son los procesos oxidativos e inflamatorios, que parecen también jugar un papel determinante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares asociadas al mismo. En la actualidad varias rutas de señalización se consideran relevantes en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares durante el envejecimiento, entre ellas, las mediadas por el sistema SIRT1-AMPK o por mTOR. La activación o inactivación, respectivamente, de estas dos vías han demostrado tener efectos beneficios y protectores a nivel cardiovascular. Una de las maneras clásicas de activar la vía de señalización por sirtuinas es la administración del fitoestrógeno resveratrol. El objetivo del presente estudio fue analizar si los efectos protectores a nivel cardiovascular del resveratrol están, al menos en parte, mediados por cambios en los procesos oxidativos e inflamatorios asociados al envejecimiento. Para ello se trató con resveratrol (10 mg/Kg/día) durante 10 semanas a animales viejos (22 meses) y se analizó el efecto del envejecimiento (animales jóvenes de 2 meses versus animales viejos de 24 meses) y del tratamiento con resveratrol (animales de 24 meses tratados versus animales de 24 meses sin tratar) sobre los niveles de parámetros oxidativos (HO1, HO2 e iNOS) e inflamatorios (INF γ , TNF α

e IL-10). Los resultados mostraron que en corazón los niveles de marcadores de estrés oxidativo y de inflamación se incrementaron con la edad. Además, este aumento se asoció a unos mayores niveles de marcadores apoptóticos (AIF, XIAP). Por otro lado, la administración de resveratrol a animales de 22 meses redujo de manera significativa los niveles de marcadores oxidativos, inflamatorios y apoptóticos, confirmando el papel cardioprotector del resveratrol y la relevancia que este fitoestrógeno puede tener en el mantenimiento de la salud cardiovascular durante el envejecimiento.

13. LA INHIBICIÓN DEL RECEPTOR DE LA LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD TIPO 1 INDUCE DISFUNCIÓN CARDIACA EN UN MODELO DE RATAS ESPONTÁNEAMENTE HIPERTENSAS

A. Ortega¹, L. Nasarre², P. Muñoz-Pacheco¹, A. Fernández-Cruz³, L. Badimón², V. Llorente² y D. Gómez-Garre¹

¹Laboratorio de Biología Vascular, Hospital Clínico San Carlos.

²Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau.

³Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, UCM.

Introducción: En la insuficiencia cardiaca (IC) se produce una alteración del metabolismo energético del corazón, el cual pasa de utilizar glucosa y ácidos grasos de cadena libre a utilizar principalmente glucosa, ocasionando una acumulación de ésteres de colesterol y triglicéridos en el miocardio. Numerosos estudios demuestran que este incremento de lípidos favorece la aparición de disfunción cardiaca y a la progresión de la IC. El principal responsable de la acumulación de ésteres de colesterol procedentes de las lipoproteínas es el receptor de la lipoproteína de baja densidad tipo 1 (LRP1), cuyo papel en la arteriosclerosis ha sido ampliamente establecido. Sin embargo, se desconoce su posible implicación en la insuficiencia cardiaca hipertensiva. El objetivo principal de este trabajo ha sido analizar la relación entre los niveles de LRP1 y de ésteres de colesterol en el miocardio y la función cardiaca en un modelo experimental de ratas espontáneamente hipertensas (SHHF).

Métodos: Utilizamos ratas SHHF de 2 meses de edad que se separaron en dos grupos: ratas no tratadas y ratas tratadas con la combinación de quinapril, (20 mg/kg/día), torasemida (3 mg/kg/día) y carvedilol (3 mg/kg/día) (SHHF+TC). A todos los animales se les realizó un seguimiento mediante eco-doppler hasta los 19 meses de edad. Como control, se utilizaron ratas Wistar normotensas de la misma edad. En el momento del sacrificio de los animales obtuvimos muestras de ventrículo izquierdo para el análisis de la expresión génica y proteica utilizando ensayos de PCR a tiempo real y Western blot, respectivamente, y para la cuantificación de los lípidos, que se realizó utilizando técnicas de cromatografía en capa fina tras la extracción de los lípidos.

Resultados: En comparación con las ratas wistar, las ratas SHHF mostraron una mayor expresión de LRP1 (proteína: $3,0 \pm 1,2$ vs $1,2 \pm 0,2$; $P < 0,05$) y 1,5-veces más cantidad de ésteres de colesterol. Los niveles de la proteína de unión a elementos reguladores de esterol 2 (SREBP-2) activa, factor de transcripción que regula la expresión de LRP1 negativamente, se encontraron significativamente reducidos ($2,5 \pm 0,5$ vs 25 ± 10 ; $p < 0,05$). La fracción de eyeción (marcador de disfunción cardiaca) se asoció negativamente con los niveles de LRP1 ($r = -0,886$; $p < 0,01$) y de ésteres de colesterol ($r = -0,771$; $p < 0,05$), y positivamente con los de SREBP-2 ($r = 0,854$; $p < 0,01$). El tratamiento farmacológico de las ratas SHHF durante 17 meses, normalizó la tensión arterial, atenuó la dilatación del ventrículo izquierdo y mejoró la función cardiaca. Con respecto a las ratas SHHF sin tratamiento, las ratas SHHF-TC presentaban unas disminución significativa en la expresión LRP1 (10 veces menos) y en la cantidad de ésteres de colesterol (5 veces menos), así como un incremento en la cantidad de SREBP-2 activo (unas 10 veces).

Conclusiones: Nuestros datos demuestran que el receptor LRP1 media la acumulación de ésteres de colesterol en el miocardio de las ratas SHHF, pudiendo contribuir al desarrollo de la disfunción cardiaca en las ratas SHHF. La modulación de la expresión del receptor LRP1 y de las proteínas SREBPs podría ser una buena diana terapéutica en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca hipertensiva

14. EFECTO VASOMOTOR DE LA SECUENCIA TDD, HOMÓLOGA A LA RGD HUMANA

L. Gamella¹, M.A. Sevilla¹, M.J. Montero¹, C. Bernabeu² y J.M. Lopez¹

¹Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca. ²Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Objetivo: Los péptidos conteniendo la secuencia arginina-glicina-aspártico (RGD) están implicados en la unión celular a través de integrinas. Se ha descrito que péptidos conteniendo la secuencia RGD pueden causar una vasodilatación independiente de endotelio a través de la interacción entre el dominio RGD y la integrina $\alpha v\beta 3$ presente en el músculo liso vascular (Mogford et al., Circ. Res. 1996;79:821-6). En ratones, la secuencia homóloga a RGD en algunas proteínas de membrana como endoglin o ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase)-15 es treonina-aspártico-aspártico (TDD), secuencia que también puede unirse a integrinas (Eto et al., J. Biol. Chem. 2000;275:34922-30; Rossi et al., Blood 2013;121:403-15). Debido a la importancia que el ratón está adquiriendo en el estudio de la fisiología cardiovascular, el objetivo del presente estudio es valorar si el péptido TDD tiene efectos vasomotores similares a los descritos para el fragmento RGD.

Métodos: Para llevar a cabo el estudio se ha utilizado la arteria torácica de ratones C57BL/6. Una vez limpias se cortaron en anillos de 2 mm, y en algunos de ellos se eliminó el endotelio mediante una ligera fricción con una aguja rugosa. Los anillos se montaron en un miógrafo de alambres y tras el proceso de normalización (Mulvany et al., Circ. Res. 1977;41:19-26) se sometieron a una tensión de 5 mN. La reactividad del tejido se comprobó con una solución de Krebs con 120 mM de potasio y la presencia/ausencia de endotelio mediante la respuesta a acetilcolina (10^{-7} M). Posteriormente se indujo la contracción con fenilefrina (PE 10^{-6} M), y cuando se alcanzó una meseta de contracción estable se realizaron curvas de relajación concentración-respuesta con el péptido (10^{-5} - 10^{-3} M). En otra serie de experimentos los anillos se incubaron con 10^{-3} M de TDD durante 30 minutos y se valoró el efecto sobre la respuesta contracturante a PE (10^{-8} - 10^{-3} M) y la respuesta relajante a nitroprusiato sódico (NTP, 10^{-8} - 10^{-4} M).

Resultados: La secuencia peptídica TDD produjo un efecto vasodilatador rápido y, dependiente de la concentración, tanto en anillos con endotelio como sin él. La relajación máxima alcanzada fue similar en ambos tipos de anillo ($87,5 \pm 1,7\%$ y $91,8 \pm 1,6\%$ en anillos con y sin endotelio). La incubación con TDD no alteró las curvas de respuesta contráctil a PE ni tampoco las de relajación inducida por NTP.

Conclusiones: La secuencia TDD presente en algunas glicoproteínas murinas parece tener un efecto vasodilatador similar al descrito para la secuencia RGD. Este efecto es independiente de la presencia de endotelio.

15. POLIMORFISMOS COMUNES EN EL GEN PCSK9 SE ASOCIAN CON MAYOR PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA Y DIASTÓLICA EN POBLACIÓN DE ALTO RIESGO CARDIOVASCULAR

J.V. Sorlí¹, F. Francés¹, O. Coltell², D. Godoy³, E.M. Asensio¹, R. Barragán-Arnal¹, F.J. Valderrama¹ y D. Corella¹

¹Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Universidad de Valencia y CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, ISCIII, Madrid. ²Departamento de Lenguajes y Sistemas Informáticos, Universitat Jaume I y CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición. ³Servicio de Medicina Interna, Hospital General Universitario de Valencia.

Objetivo: La proteína PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) es una proteasa sérica que se produce a nivel hepático y regula el número de receptores de LDL en las células hepáticas, uniéndose a los mismos y facilitando su degradación. Mutaciones en el gen PCSK9 (situado en 1p32.3) que resultan en hiperfunción se han relacionado con hipercolesterolemia familiar. Mientras que aquellas variantes relacionadas con hipofunción se han asociado con menores concentraciones de colesterol-LDL (c-LDL). Actualmente, la inhibición farmacológica de PCSK9 está siendo considerada una vía terapéutica novedosa para la hipercolesterolemia. Sin embargo, poco se sabe de la asociación de polimorfismos en dicho gen con presión arterial, aunque existen trabajos previos que han asociado concentraciones plasmáticas de PCSK9 con presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) y se ha demostrado que regula los canales epiteliales de sodio. Por ello nuestro objetivo es estudiar la asociación entre polimorfismos en el gen PCSK9 y presión arterial.

Métodos: Estudio transversal en 860 participantes de alto riesgo cardiovascular en el estudio PREDIMED-Valencia (media de edad 67 ± 7 años). La presión arterial se obtuvo por medición directa por métodos estandarizados. Mediante un array de alta densidad (Human Omni Express, Illumina) se determinaron 28 polimorfismos en el gen PCSK9. Se obtuvieron datos clínicos adicionales y de variables del estilo de vida. Se realizaron análisis estadísticos uni y multivariantes.

Resultados: Varios de los polimorfismos analizados mostraron asociaciones significativas con la PAS y/o PAD. Entre ellos los más relevantes fueron el rs662145 A > G (frecuencia del alelo menor G; MAF: 0.24) y el rs557435G > A (MAF A: 0.19), ambos intrónicos y sin asociaciones significativas con concentraciones de c-LDL. El rs662145 se asoció tanto con la PAS (AA: 146 ± 20 ; AG: 147 ± 21 y GG: 153 ± 20 mmHg, $p = 0,031$) como con la PAD (AA: 81 ± 10 ; AG: 83 ± 11 y GG: 85 ± 14 mmHg, $p = 0,010$), mientras que el rs557435 se asoció fundamentalmente con la PAD (GG: 81 ± 10 ; GA: 83 ± 11 y AA: 86 ± 13 mmHg, $p = 0,008$). Estas asociaciones permanecieron significativas tras ajuste multivariante por sexo, edad, diabetes, fármacos e índice de masa corporal.

Conclusiones: Variaciones en el gen PCSK9 parecen asociarse también con presión arterial en población de alto riesgo cardiovascular.

16. DIFERENTE MODULACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS POR LOS DOMINIOS EXTRACELULAR E INTRACELULAR DE ENDOGLINA

E. Núñez, C. Ollauri, A. Rodríguez, M. Pericacho y J.M. López

Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca. Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca.

Objetivo: Endoglin (Eng, CD105) es una glicoproteína transmembrana característica del endotelio relacionada con diferentes procesos vasculares, siendo uno de los más importantes la regulación de la angiogénesis. Se ha demostrado que la expresión de esta

proteína aumenta en tejidos con una angiogénesis activa. Además, alteraciones en el gen de Eng o en la expresión del mismo conllevan disfunción endotelial y defectos en la angiogénesis, el desarrollo de las células murales y la maduración de los vasos sanguíneos. Tradicionalmente, se ha considerado que estas alteraciones se deben al papel de Eng como coreceptor de TGF-β. Así, se sabe que en las células endoteliales Eng modula la interacción de TGF-β con determinados miembros de su complejo de receptores, regulando así la señal intracelular que se transmite. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que el dominio extracelular de Eng es capaz de interactuar directamente con integrinas, lo que abre la posibilidad a nuevos efectos de Eng independientes de la señalización de TGF-β. Se conocen dos isoformas de Eng ancladas a la membrana que se diferencian exclusivamente en su dominio intracelular y que parecen tener efectos sobre la angiogénesis opuestos. La isoforma larga (L-Eng) es la mayoritaria y más estudiada, y parece favorecer el proceso angiogénico. Sin embargo, existe una segunda isoforma, S-Eng o isoforma corta, que carece de gran parte dominio citoplasmático y a la que se le han atribuido propiedades antiangiogénicas. Nuestra hipótesis es que si las isoformas de Eng modulan de manera distinta la angiogénesis, tiene que deberse a efectos en los que está implicado el dominio intracelular, pero que puede haber aspectos de la angiogénesis en los que las respuestas de una y otra isoforma sean iguales. En ese caso se trataría de efectos mediados exclusivamente por el dominio extracelular. Por lo tanto, el objetivo que nos planteamos con este trabajo es analizar qué funciones desempeñan los dominios intracelular y extracelular de endoglinina en la modulación de los distintos procesos implicados en la angiogénesis.

Métodos: Analizamos la respuesta angiogénica *in vivo* en ratones C57BL6 que sobreexpresan L o S-Eng evaluando la tasa de reperfusión de la pata posterior tras ligadura completa de la arteria femoral. Además, cuantificamos la invasión endotelial en angiorreactores (tubos llenos de Matrigel y factores proangiogénicos) implantados subcutáneamente en estos animales. Finalmente, analizamos el número y las características de los pseudocapilares que crecen a partir de anillos de aorta de estos ratones incubados en Matrigel®.

Resultados: Hemos observado que la sobreexpresión de S-Eng conlleva un retraso significativo en la reperfusión postisquémica así como una reducción de la invasión endotelial en angiorreactores. La sobreexpresión de la isoforma larga no conlleva diferencias en estos procesos respecto a los ratones *wild type*. Analizando los experimentos con anillos de aorta, en los ratones que sobreexpresan S-Eng se observan diferencias con los *wild type* en el proceso de gemación (*sprouting*).

Conclusiones: El dominio extracelular de Eng parece tener un efecto antiangiogénico *in vivo* que no se debe a una inhibición del *sprouting*, y que se revierte cuando está presente el dominio intracelular.

17. PERFILES PROTEICOS ESPECÍFICOS EN ORINA Y EXOSOMAS RESPONDEN AL DESARROLLO DE ALBUMINURIA DE NOVO Y SU EVOLUCIÓN EN PACIENTES HIPERTENSOS TRATADOS CON BLOQUEANTES DEL SRAA

L. Gonzalez-Calero¹, M. Martín-Lorenzo¹, M. Baldán-Martín², F. de la Cuesta², G. Ruiz-Hurtado³, J. Segura⁴, M.G. Barderas², L.M. Ruilope³, F. Vivanco¹ y G. Álvarez-Llamas¹

¹IIS-Fundacion Jiménez Diaz, UAM. ²Hospital Nacional de Parapléjicos, SESCAM. ³Instituto de Investigación i+12, Hospital 12 de Octubre. ⁴Hospital 12 de Octubre.

Introducción: A pesar del efecto beneficioso del bloqueo del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), existe cierta resis-

tencia en algunos pacientes tal que no se llega a impedir un progreso de la enfermedad. La microalbuminuria es uno de los predictores de dicha evolución y está descrito que determinados pacientes con tratamiento crónico de SRAA presentan una alta prevalencia de albuminuria, llegando a aparecer microalbuminuria *de novo* en un elevado porcentaje de individuos normoalbuminúricos. Actualmente, no se conocen marcadores capaces de predecir la evolución clínica de estos pacientes.

Objetivo: Obtener una huella molecular en orina asociada al desarrollo y evolución de la albuminuria en pacientes hipertensos crónicamente tratados, tal que permita evaluar la respuesta terapéutica a la acción de los inhibidores de SRAA (i-SRAA).

Métodos: Mediante estrategias ómicas, se han investigado cambios en el proteoma de la orina y de sus microvesículas exosomales. Se ha reclutado una primera cohorte de 21 individuos sanos y 53 pacientes hipertensos en tratamiento con i-SRAA, clasificados como a) normoalbuminúricos que se mantuvieron como tal (N), b) normoalbuminúricos que desarrollaron microalbuminuria *de novo* (NM) y c) microalbuminúricos que se mantuvieron estables en esa condición (M), incluyendo diabéticos y no diabéticos, durante un periodo de 3 años. Se llevó a cabo un análisis diferencial por DIGE y (iTRAQ)LC-MS/MS en las muestras de orina y exosomas. En una segunda cohorte de 18 controles sanos y 90 pacientes se confirmaron los marcadores moleculares respondedores a albuminuria *de novo*, hipertensión y microalbuminuria por una metodología complementaria de espectrometría de masas (SRM).

Resultados: El análisis diferencial y posterior confirmación reveló la existencia de un panel de 5 proteínas respondedoras a la condición de hipertensión *per se* o a la existencia de albuminuria (*de novo* y mantenida). El análisis de exosomas de la orina ha permitido identificar adicionalmente una huella molecular proteica específicamente respondedora tanto al desarrollo de microalbuminuria *de novo* en pacientes normoalbuminúricos como a la existencia de microalbuminuria prolongada en el tiempo.

Conclusiones: Hemos identificado una huella molecular específica de proteínas de la orina y exosomales que reflejan el distinto comportamiento clínico de los pacientes hipertensos con distintos grados de afectación renal y distinta respuesta al tratamiento farmacológico con inhibidores del SRAA. La monitorización de estas dianas moleculares en pacientes normoalbuminúricos podría servir para identificar aquellos pacientes con tendencia a desarrollar albuminuria *de novo* y por tanto predecir su resistencia al tratamiento.

18. EFECTOS DEL EJERCICIO FÍSICO CRÓNICO SOBRE LOS FACTORES Y MECANISMOS IMPLICADOS EN EL PROCESO DE PARDEAMIENTO DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO EN RATAS

M. Klett-Mingo¹, B. Martín-Fernández¹, S. Ballesteros¹, E. Sastre², L. Caracuel², J. Blanco-Rivero², A. Galiana¹, V. Lahera¹ y N. de las Heras¹

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

Objetivo: El objetivo del estudio fue evaluar en ratas con sobrepeso inducido por una dieta rica en grasa saturada, los efectos del ejercicio físico crónico sobre las alteraciones metabólicas y la disfunción del tejido adiposo blanco (TAB) y marrón (TAM), así como los factores y mecanismos implicados en el proceso de pardeamiento del TAB y en la función del TAM.

Métodos: Para llevar a cabo el estudio se utilizaron ratas macho Wistar (250-275 g) alimentadas con una dieta estándar (C) o con alto contenido calórico (33,5% de grasa saturada) para inducir sobrepeso (SBP). La mitad de los animales de cada grupo realizó 30 minutos diarios de ejercicio en tapiz rodante (+E) durante 8 sema-

nas (5 veces a la semana durante 50 min). Al final del periodo de evolución se determinaron las concentraciones plasmáticas de glucosa, colesterol total, triglicéridos e irisina. Se valoró la expresión proteica de los principales factores implicados en el pardeamiento del TAB y en la función del TAM: FNDC5/irisina en TAB, y proteína desacoplante-1 (UCP1) en TAB, TAM y músculo esquelético.

Resultados: El peso corporal y el peso de los paquetes de TAB lumbar y epididimal, fueron mayores en las ratas SBP ($p < 0,05$) que en C y disminuyeron ($p < 0,05$) en estas ratas tras las 8 semanas de ejercicio físico crónico (SBP+E). En las ratas con SBP el peso del gastrocnemio y del sóleo fueron mayores ($p < 0,05$) que en las ratas C, y el ejercicio físico los normalizó. Los niveles plasmáticos de glucosa, colesterol total y triglicéridos fueron mayores ($p < 0,05$) en las ratas SBP que en las C, y el ejercicio físico los redujo ($p < 0,05$). La concentración plasmática de irisina fue menor ($p < 0,05$) en las ratas SBP que en C, y el ejercicio físico tendió a aumentarla. La expresión proteica de FNDC5/irisina en TAB fue comparable entre las ratas C y con SBP, y el ejercicio físico crónico aumentó significativamente su expresión. En las ratas SBP la expresión proteica de la UCP1 fue menor ($p < 0,05$) en TAB, TAM y músculo esquelético (gastrocnemio) que en C. El ejercicio aumentó su expresión significativamente.

Conclusiones: El ejercicio físico crónico en ratas con SBP mejora el perfil metabólico, y aumenta la concentración circulante de irisina y la expresión de FNDC5/irisina en TAB. Esto se asocia a un aumento de la expresión de UCP1 en TAB, TAM y músculo esquelético, lo que sugiere pardeamiento del TAB y mejora de la función del TAM.

19. EFECTOS DE LAS PROANTOCIANIDINAS SOBRE LAS ALTERACIONES CARDIACAS PRODUCIDAS POR LA ALDOSTERONA EN RATAS A TRAVÉS DEL BLOQUEO DEL RECEPTOR DE MINERALOCORTICOIDES

B. Martín¹, N. de las Heras¹, M. Valero¹, S. Ballesteros¹, Y.Z. Yao², A. Galiana¹, M. Klett¹, P. Stanton², P. Fuller² y V. Lahera¹

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. ²Prince Henry's Institute of Medical Research, Clayton, Australia.

Objetivo: Estudiar los efectos de un extracto de almendra rico en proantocianidinas (EPRO) en las alteraciones cardíacas producidas por la aldosterona y su efecto sobre la actividad del receptor de mineralocorticoideos (RM). Confirmar que las proantocianidinas son las responsables de dichos efectos.

Métodos: Se utilizaron ratas macho Wistar que recibieron una dosis diaria de aldosterona (1 mg/Kg/día s.c.) + NaCl al 1% en el agua de bebida. Un grupo de animales recibió aldosterona y fue tratado con EPRO (100 mg/Kg/día) en el agua de bebida y otro grupo fue tratado con espironolactona (ES, 200 mg/Kg/día s.c.), simultáneamente. Como controles se utilizaron animales a los que se les administró el vehículo de la aldosterona y dos grupos fueron tratados con EPRO o con ES. El periodo de evolución fue de 21 días. Se analizó la hemodinámica cardiaca, la expresión génica de factores fibróticos, inflamatorios, pro-oxidantes y del mediador de las acciones de la aldosterona; quinasa regulada por suero tipo 1 (SGK-1). Para valorar la capacidad de EPRO para actuar como un antagonista del RM se realizó un ensayo de transactivación en células transfundidas con un vector para el RM estimuladas con aldosterona y co-incubadas con EPRO o ES. Con el fin de confirmar que las PROA eran las responsables de los efectos observados se realizó una cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Además se obtuvieron distintas fracciones del extracto con las que posteriormente se co-incubaron las células estimuladas con aldosterona.

Resultados: El tratamiento con EPRO disminuyó significativamente la hipertensión y la disfunción diastólica producidas por la

aldosterona. La expresión génica de SGK-1, junto con la de los mediadores de fibrosis, inflamación y oxidación, aumentados por la aldosterona disminuyó significativamente con EPRO. La actividad transcripcional del RM aumentada por la estimulación con aldosterona disminuyó significativamente con la co-incubación con EPRO a dosis crecientes. El análisis del extracto mediante HPLC confirmó que son las PROA las responsables de los efectos observados. La actividad transcripcional del RM en células estimuladas con aldosterona y co-incubadas con la fracción correspondiente a las proantocianidinas disminuyó significativamente hasta normalizar sus valores. Los efectos producidos por el tratamiento con EPRO fueron comparables a los producidos por el antagonista del RM, espironolactona.

Conclusiones: Los efectos observados con el tratamiento con EPRO en las ratas tratadas con aldosterona + sal sugieren que el extracto de almendras rico en proantocianidinas se encuentra actuando como un antagonista del RM. Dentro de los componentes de dicho extracto, las proantocianidinas son los compuestos responsables de los efectos beneficiosos observados.

20. EL EJERCICIO INDUCE EL DESARROLLO DE LA CARDIOMIOPATÍA ARRITMOGÉNICA DE VENTRÍCULO DERECHO EN RATONES QUE EXPRESAN PLACOFILINA-2 MUTANTE

J.A. Bernal, F.M. Cruz, D. Sanz, M. Roche, J. García, G. Pizarro, J. García, J. Ruiz y B. Ibáñez

CNIC.

Introducción: Se ha propuesto que el ejercicio induce el desarrollo de la cardiomiopatía de ventrículo derecho (ARVC); sin embargo la investigación en este campo está limitada por la falta de modelos animales que expresen mutaciones asociadas con esta patología.

Objetivo: Estudiar el empate del ejercicio en el desarrollo de ARVC en ratones que expresan un mutante un gen mutante de placofilina-2 (PKP2) usando virus adeno-asociados (AAV).

Métodos: Hemos desarrollado un nuevo modelo animal transgénico específico de tejido cardíaco basado en el uso de AAV para comprobar si la combinación de una mutación encontrada en pacientes con AVRC y el ejercicio disparan el desarrollo de la enfermedad.

Resultados: La expresión estable del mutante de PKP2 (c.2203C > T), que codifica la proteína mutante R735X, se consigue después de tan solo 4 semanas tras una sola inyección intravenosa con virus AAV-R735X. El estudio de resonancia magnética (MRI) en animales que expresan la proteína durante más de 10 meses demostró que estos animales no desarrollan ningún fenotipo relacionado con ARVC. Por el contrario, cuando estos animales se sometieron a protocolos de entrenamiento 4 semanas después de ser infectados con AAV-R735X se observó una disfunción del ventrículo derecho (VD) similar al observado en pacientes con ARVC: reducción de la función sistólica del VD y anomalías en el movimiento de la pared libre del VD. A nivel histológico el VD de los animales entrenados que han sido infectados con AAV-R735X muestran deslocalización de la proteína de unión entre cardiomiositos conexina 43 (Cx43), cambio que no se observa en animales sedentarios.

Conclusiones: El ejercicio dispara el desarrollo de un fenotipo similar al de ARVC en animales infectados con el mutante de PKP2 R735X. Esta mutación parece que actúa como un dominante negativo. Este nuevo sistema basado en la expresión de variantes mutantes de distintos genes usando AAVs en ratones silvestres tiene un gran potencial para el estudio del efecto de mutaciones en cardiomiopatías complejas.

21. JQ1 MODULA LAS RESPUESTAS INFLAMATORIAS Y FIBRÓTICAS EN EL RIÑÓN MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE LOS BROMODOMINIOS BET

J.L. Morgado¹, B. Suárez², S. Rayego¹, R.M. Rodríguez², C. Lavoz¹, C. López² y M. Ruiz¹

¹Cellular Biology of Renal Diseases Laboratory, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma. ²Department of Immunology, Hospital Universitario Central de Asturias.

Objetivo: La familia de proteínas BET (“bromodomain and extra-terminal”, BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT) reconocen específicamente residuos de lisina acetilados, una modificación post-traduccional clave en la regulación de la expresión génica. Estudios recientes han demostrado el papel fundamental de estas proteínas en la modulación de la respuesta inflamatoria, y el gran potencial terapéutico de sus inhibidores en el tratamiento de procesos inflamatorios agudos y crónicos. Nuestro objetivo ha sido investigar el papel de las proteínas BET en el daño renal experimental, determinando su papel en la regulación de la expresión de genes pro-inflamatorios y pro-fibróticos. Para ello, se evaluó el efecto de la inhibición de los bromodomios BET, mediante el empleo del inhibidor JQ1.

Métodos: Los estudios *in vivo* se han realizado en el modelo de obstrucción unilateral del uréter (UUO) en ratones C57BL/6, y los estudios *in vitro* en células tubuloepiteliales renales humanas (HK2) y fibroblastos murinos estimuladas con TNF-alfa, o TGFbeta.

Resultados: El modelo de daño renal por UUO se caracteriza principalmente por infiltrado intersticial y fibrosis. El tratamiento con JQ1 disminuyó la presencia de infiltrado inflamatorio (neutrófilos, monocitos/macrófagos y linfocitos T CD4+) en los riñones obstruidos alcanzando valores similares a los controles. El aumento en la expresión de varios genes proinflamatorios (IL-6, MCP-1, RANTES) fue bloqueado tras tratamiento con JQ1 tanto en el modelo *in vivo*, como en experimentos *in vitro* en la línea renal HK2. El silenciamiento génico de BRD2 y BRD4, mediante siRNA, disminuyó parcialmente la expresión de estos genes. Posteriormente, mediante técnicas de immunoprecipitación de la cromatina (ChIP) demostramos que BRD4 se une específicamente a las histonas acetiladas presentes en la región promotora de los genes inflamatorios IL-6, MCP-1, RANTES regulando así su expresión génica. Estudios adicionales en la ruta NF-kB, demostraron que el tratamiento con JQ-1 bloquea la translocación nuclear de p65. Esta proteína se activa por acetilación de la lisina 310, sugiriendo un efecto antiinflamatorio de JQ1 por un mecanismo independiente de la remodelación de la cromatina. Por último, en el UUO hemos observado que JQ1 bloqueó el aumento en la expresión renal de los marcadores de daño (KIM-1 y NGAL), de factores profibróticos y de proteínas de matriz extracelular. Además en fibroblastos murinos la estimulación al alza de proteínas de matriz extracelular (fibronectina y colágeno tipo I) inducida por TGF-beta se inhibió por JQ-1, sugiriendo una implicación adicional en los procesos pro-fibróticos.

Conclusiones: Nuestros resultados muestran que la inhibición de los bromodomios BET utilizando JQ1 disminuye la respuesta inflamatoria renal, a través del remodelamiento de la cromatina en las regiones promotoras de genes específicos o adicionalmente inhibiendo la ruta de activación del NF-kB. Estos resultados demuestran que el tratamiento con inhibidores de las proteínas BET podrían tener importantes aplicaciones terapéuticas en la inhibición de las respuestas inflamatorias y pro-fibróticas producidas en la enfermedad renal.

22. LA DELECIÓN DE γ -SECRETASAS PROTEGE FRENTE A LA HIPERTROFIA CARDIACA INDUCIDA POR ANGIOTENSINA-II EN UN MODELO MURINO

J. Rivera¹, G. Guzmán², R. Villa¹, J. Orbe³, C. González¹, M. Serrano⁴, J. Díez³, V. Andrés¹ y A. Maraver⁵

¹Departamento de Epidemiología, Aterotrombosis e Imagen, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC).

²Unidad deImagen Cardiaca, Departamento de Cardiología, Hospital Universitario La Paz, Idipaz. ³División de Ciencias Cardiovasculares, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Universidad de Navarra. ⁴Grupo Supresión Tumoral, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). ⁵Instituto de Investigación Oncológica de Montpellier (IRCM).

Objetivo: Aunque existen evidencias que demuestran la relación entre hipertensión pulmonar y la vía de señalización de Notch, su papel en la hipertensión sistémica y los procesos patológicos asociados a la misma están poco estudiados. Por tanto, nuestro principal objetivo consistió en analizar el papel que desempeña dicha vía en el desarrollo y mantenimiento de la hipertensión y la hipertrofia cardiaca asociada. Igualmente, analizamos el potencial de los inhibidores de γ -secretasas (GSI) como agente terapéutico.

Métodos: Hemos generado un modelo murino inducible en el que es posible eliminar de un modo controlado la expresión del complejo de γ -secretase. Dicho modelo nos ha permitido estudiar la actividad de la ruta de Notch *in vitro* en respuesta al tratamiento con angiotensina-II (Ang-II) en células de musculatura lisa vascular (VSMC) aisladas de las aortas de estos animales. De forma complementaria hemos analizado *in vivo* las consecuencias de la supresión del complejo de γ -secretasas en hipertensión e hipertrofia cardíaca, en un modelo de angiotensina, mediante vías alternativas (deleción génica y el uso de GSI). Por último, hemos analizado y comparado muestras de tejido vascular procedente de individuos hipertensos con y sin hipertrofia cardiaca.

Resultados: El tratamiento de VSMC con Ang-II induce la activación de la ruta de señalización de Notch tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. La supresión de la actividad γ -secretasa mediante supresión génica en animales adultos produjo una disminución significativa en los valores de hipertensión e hipertrofia sin mostrar efectos adversos. Además, el tratamiento con GSI redujo la hipertrofia cardíaca inducida por Ang-II tanto *in vitro* como *in vivo*. Finalmente, hemos identificado niveles elevados de Notch5, un target específico en la cascada de señalización, en tejido vascular obtenido de pacientes hipertensos con hipertrofia de ventrículo izquierdo.

Conclusiones: La ruta de señalización de Notch se encuentra activada en tejido vascular de ratones hipertensos con hipertrofia cardíaca, y su inhibición, mediante eliminación génica del complejo de γ -secretasas, protege frente ambas situaciones. En ratones salvajes, el tratamiento con GSI protege frente a la hipertrofia del ventrículo izquierdo sin afectar la presión arterial. Estudios preliminares sugieren el potencial uso de GSI en pacientes con hipertensión e hipertrofia cardíaca refractarios a los tratamientos convencionales.

23. PAPEL DE CD163 EN ANEURISMA AÓRTICO ABDOMINAL

A. Rubio¹, J.M. Amaro¹, I. Buendía¹, J. Egido¹, L.M. Blanco¹, J.B. Michel³, O. Meilhac³, J.L. Martín¹ y J.A. Moreno¹

¹Laboratorio de Patología Vascular y Renal, IIS-Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid. ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM). ³INSERM U698, Hôpital Bichat.

Objetivo: El aneurisma aórtico abdominal (AAA) es una enfermedad inflamatoria crónica, caracterizado por la presencia de macró-

fagos infiltrantes, los cuales juegan un papel muy importante en el desarrollo y evolución de la enfermedad. Se ha observado que en la capa adventicial del AAA existe una acumulación de hemoglobina (Hb) y hemosiderina. CD163 es un receptor de superficie presente en macrófagos encargado del aclaramiento tisular de Hb. Nuestro objetivo fue investigar el papel de la Hb en el reclutamiento de monocitos y en su posterior diferenciación a macrófagos que expresan CD163, *in vitro* y en AAA humanos. Además, se estudió el estado de activación de los monocitos circulantes de pacientes con AAA.

Métodos: La presencia de macrófagos en la pared arterial de pacientes con AAA fue determinada por inmunohistoquímica. Los experimentos se realizaron en monocitos purificados de sangre de voluntarios sanos estimulados con Hb y medio condicionado procedente de AAA humano. Mediante citometría de flujo se analizaron las subpoblaciones CD14⁺CD16⁻, CD14⁺CD16⁺ y CD14⁻CD16⁺ de monocitos de sangre periférica procedente de pacientes con AAA y voluntarios sanos. Además, se determinaron los niveles de expresión de CD163 en cada una de estas subpoblaciones.

Resultados: Se encontraron niveles de expresión de CD163 superiores en la pared del AAA en comparación con la pared de aorta de sujetos sanos. CD163 se encontró en la capa adventicial de AAA, coincidiendo con zonas de acumulación de Hb, hemosiderina, marcadores de estrés oxidativo y adyacentes a microvasos. Además se observó que el secretoma de AAA mostraba niveles superiores de CD163 soluble (sCD163) en comparación con los encontrados en el secretoma de aorta sana. La capa de AAA que mayor secreción presentó fue la adventicia. Tanto el medio condicionado, como la Hb promovieron la quimiotaxis de monocitos *in vitro*. Este efecto fue mayor en monocitos procedentes de pacientes con AAA. Tanto la Hb, como el medio condicionado de AAA promovieron la diferenciación hacia macrófagos CD163^{high} y HLA-DR^{low}, los cuales presentaron una gran capacidad de internalización de Hb y de secreción de IL-10. Los pacientes con AAA mostraron niveles elevados de CD14⁺CD16⁺, en comparación con los voluntarios sanos. La expresión de CD163 en el total de la población de monocitos no mostró cambios significativos. Sin embargo, los monocitos CD14⁺CD16⁺ mostraron niveles de expresión de CD163 superiores en pacientes con AAA.

Conclusiones: La presencia de Hb promueve la migración y diferenciación de monocitos, lo que podría explicar el aumento de la presencia de macrófagos CD163^{high} en la pared de la adventicia de AAA. Estos macrófagos podrían ayudar a la eliminación del exceso de Hb libre presente en el AAA, evitando sus efectos pro-inflamatorios y pro-oxidantes.

24. ALTERACIONES EN LA FUNCIÓN DE LA INERVACIÓN PERIVASCULAR EN ARTERIA MESENTÉRICA EN LA DESCENDENCIA ADULTA DE RATAS DIABÉTICAS

E. Sastre¹, D.B. de Queiroz², L. Caracuel¹, M. Vallejo¹, V. Lahera³, F.E. Xavier², J. Blanco-Rivero¹ y G. Balfagón¹

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. ²Departamento de Fisiología e Farmacología, Universidad Federal de Pernambuco, Brasil.

³Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

Introducción: La exposición intrauterina a una ambiente hiperglémico induce el desarrollo desórdenes metabólicos, incluyendo diabetes e hipertensión en la vida adulta. En hipertensión se incrementa la resistencia vascular periférica que está controlada por diversos factores: humorales, endoteliales y neuronales; es bien conocida la participación de los factores endoteliales en este incremento, mientras que poco se sabe de la participación de la inervación perivascular. El objetivo de este estudio ha sido analizar si la diabetes materna puede provocar alteraciones en la inervación

perivascular de la arteria mesentérica en la descendencia adulta de ratas diabéticas.

Métodos: Se utilizaron ratas macho Wistar descendientes de ratas control (O-DR) y diabéticas (O-DR). La diabetes se indujo en el 7º día de gestación mediante una única inyección de estreptozocina (50 mg/kg peso corporal) A los 6 meses de edad, se midió la presión arterial mediante pleismografía de la arteria caudal y se sacrificaron los animales, se extrajo la arteria mesentérica superior y se analizó la respuesta vasoconstrictora inducida por estimulación eléctrica (EE) en presencia del antagonista α -adrenérgico, fentolamina; del inhibidor inespecífico de la óxido nítrico sintasa (NOS), (L-NAME); del antagonista del receptor para el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), 8-37CGRP. Se analizó las respuestas vasomotoras a noradrenalina (NA) y al donante de óxido nítrico (NO), DEA-NO. Se valoró la liberación inducida por EE de NA, ATP y NO; y la expresión de la NOS neuronal (nNOS) y su forma fosforilada (P-nNOS).

Resultados: La presión arterial fue mayor en el grupo O-DR. La respuesta vasoconstrictora inducida por EE fue mayor en el grupo O-DR. La fentolamina redujo la respuesta constrictora inducida por EE en mayor medida en el grupo O-DR. El L-NAME incrementó la respuesta vasoconstrictora en mayor grado en el grupo O-DR. El 8-37CGRP no modificó la respuesta vasoconstrictora en ningún grupo experimental. Las respuestas vasomotoras a NA, y DEA-NO no se modificaron con respecto al control. La liberación inducida por EE de NA, ATP y NO se incrementó en el grupo O-DR. La expresión de nNOS fue similar en ambos grupos, mientras que la de P-nNOS aumentó en el grupo O-DR.

Conclusiones: El ambiente hiperglémico durante el embarazo, incrementa las funciones vasoconstrictora simpática y vasodilatadora nitrérgica en arteria mesentérica de rata. El efecto neto es un incremento en la respuesta vasoconstrictora inducida por EE. Estas alteraciones contribuyen al incremento en la presión sanguínea en las ratas O-DR.

Subvencionado por Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2012-38530), y Fundación MAPFRE.

25. INSULINA RESTAURA EL TRANSPORTE DE L-ARGININA REQUIRIENDO DE LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE ADENOSINA A_{2A} EN ENDOTELIO DE VENA UMBILICAL HUMANA EN PREECLAMPSIA TARDÍA

R. Salsoso¹, T. Sáez¹, C. Sanhueza¹, F. Pardo¹, A. Leiva¹, A. Mate², C.M. Vázquez² y L. Sobrevia^{1,2}

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

Objetivo: Preeclampsia es un síndrome hipertensivo específico del embarazo, clásicamente definido como hipertensión arterial y proteinuria diagnosticada por primera vez a partir de las 20 semanas de gestación. La preeclampsia está asociada a una disminución en la vasodilatación placentaria, así como en la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y el nivel plasmático de L-arginina en vena umbilical (Mate et al., Drug Discov Today. 2012;17:1307-15). Insulina y adenosina causan vasodilatación en la vena umbilical humana involucrando la activación del receptor de adenosina A_{2A} (A_{2A}AR) y aumento del transporte de L-arginina vía hCAT-1 en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) de embarazos normales (Guzmán-Gutiérrez et al., PLoS ONE. 2012;7:e41705); sin embargo, este fenómeno es desconocido en preeclampsia. La preeclampsia temprana (< 34 semanas de gestación), se asocia a alteraciones graves en la vasculatura placentaria conduciendo a alteraciones en el crecimiento y desarrollo fetal; no obstante, no se conoce si la preeclampsia tardía (\geq 34 semanas de

gestación) (LOPE) altera la vasculatura fetoplacentaria. El objetivo de este estudio fue determinar el papel de la activación de A_{2A}AR en la ruta L-arginina/NO en respuesta a insulina en HUVECs de LOPE.

Métodos: La reactividad vascular en respuesta a insulina (0,1-1.000 nmol/L, 5 min) en ausencia y presencia de adenosina (1 mmol/L, 5 min) y ZM-241385 (antagonista A_{2A}AR) (10 nmol/L) fue determinada en anillos de vena umbilical humana pre-contraídos con KCl (62,5 mmol/L) de embarazos normales oLOPE. Mediante western blot se determinó la abundancia de la proteína del transportador de aminoácidos catiónicos tipo 1 (hCAT-1), A_{2A}AR, eNOS total (t-eNOS) y fosforilada en Ser¹¹⁷⁷ (P_{XaSiSer}-eNOS) o Thr⁹⁵⁵ (P_{XaSiThr}-eNOS). El transporte de L-arginina (0-1.000 μmol/L, 3 μCi/ml L-[³H]arginine, 20 s, 37 °C) fue medido en ausencia o presencia (8 h) de insulina (1 nmol/L) y/o ZM-241385 en HUVECs de embarazos normales o LOPE.

Resultados: LOPE aumenta la capacidad máxima de transporte de L-arginina, y la expresión y actividad de hCAT-1 y eNOS comparado con embarazos normales. Sin embargo, el efecto de LOPE fue bloqueado por ZM-241385 (antagonista de A_{2A}AR). Insulina revierte el efecto de LOPE en la capacidad máxima de transporte requiriendo de la activación de A_{2A}AR. La relajación en respuesta a insulina de anillos de vena umbilical humana provenientes de embarazos LOPE fue menor que en embarazos normales, efecto que fue restaurado por ZM-241385.

Conclusiones: La reducción en la respuesta vascular fetoplacentaria a insulina podría resultar de la activación del receptor de adenosina A_{2A} en embarazos que cursan con LOPE.

Agradecimientos: Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT 11110977, 11110059, 3130583, 3140532). RS posee una Beca PUC-PhD de la Facultad de Medicina; TS posee una Beca CONICYT-PhD.

26. LA FIBULINA-5 ES INHIBIDA EN EL ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL: PARTICIPACIÓN DE MECANISMOS EPIGENÉTICOS

M. Orriols¹, I. Martí¹, A. Guadall¹, J.R. Escudero², J.B. Michel³, J.L. Martín⁴, M. Camacho², J. Martínez¹ y C. Rodríguez¹

¹Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC), IIB-Sant Pau.

²Laboratorio de Angiología, Biología Vascular e Inflamación y Servicio de Cirugía Vascular, Instituto de Investigación Biomédica (IIB-Sant Pau). ³INSERM U698. ⁴Fundación Jiménez Díaz.

Objetivo: El aneurisma de aorta abdominal (AAA) es una patología inflamatoria crónica caracterizada por un remodelado destructivo de la pared vascular. La fibulina-5 (FBLN5) es una proteína elastogénica que participa en el remodelado vascular y que modula la adhesión, motilidad, proliferación y supervivencia de las células vasculares. Nuestro objetivo ha sido analizar la regulación de la FBLN5 en el AAA y caracterizar los mecanismos implicados.

Métodos: Se analizaron muestras de aorta aneurismática y sana, secretomas vasculares y células musculares lisas de aorta humana (CMLV). Se analizó la expresión génica vascular por RT-PCR, Western-blot e inmunohistoquímica. También se realizaron ensayos de transfección transitoria e immunoprecipitación de cromatina (ChIP). Se analizó el efecto de la administración de lipopolisacárido (LPS) en ratones C57BL/6J (LPS, 0,5 mg/Kg, 24 horas).

Resultados: Muestras aneurismáticas humanas muestran una reducción de la expresión y secreción de la FBLN5 en comparación con aortas sanas. En CMLV de aorta humana, el tratamiento con estímulos inflamatorios redujo el nivel de expresión (ARNm y proteína) de la FBLN5 y, de modo similar, la expresión de FBLN5 fue inhibida en la aorta de ratones tratados con LPS. El pre-tratamiento con inhibidores de histonas deacetilas (HDAC) previno estos efectos. Los estímulos inflamatorios disminuyeron la actividad

transcripcional de la FBLN5. Estudios de delección seriada y mutagénesis dirigida identificaron dos elementos de respuesta al factor de transcripción SOX9 críticos para la actividad transcripcional basal del promotor de FBLN5. La expresión de SOX9 está disminuida en el AAA humano, y su sobre-expresión en CMLV previno la inhibición de la expresión de la FBLN5 provocada por estímulos inflamatorios. Ensayos de ChIP mostraron que el tratamiento con TNFα disminuyó tanto la asociación de la histona H3 acetilada al promotor de la FBLN5 como la unión de SOX9 a sus elementos de respuesta. Finalmente, la inhibición de HDAC previno estos efectos induciendo la expresión de SOX9, y aumentando la unión de SOX9 al promotor de la FBLN5, normalizado así la expresión vascular de la FBLN5.

Conclusiones: La disminución de la expresión FBLN5 podría contribuir al remodelado vascular en el AAA. La inhibición de la actividad HDAC puede normalizar la expresión FBLN5 vascular a través de un mecanismo dependiente de SOX9. Estos resultados sugieren un potencial uso terapéutico de los inhibidores de HDAC en el AAA.

27. LA GALECTINA-3, UNA NUEVA DIANA EN LA CALCIFICACIÓN VALVULAR EN LA ESTENOSIS AÓRTICA SEVERA

E. Martínez¹, R. Sadaba², V. Álvarez², V. Arrieta², A. Fernández¹, A. Melero¹, J. de Diego² y N. López¹

¹Navarrabiomed-Fundación Miguel Servet. ²Área del Corazón del Complejo Hospitalario de Navarra.

Introducción: La estenosis aórtica severa degenerativa (EA) es una enfermedad muy prevalente, cuya incidencia se incrementará en los próximos años debido al envejecimiento de la población. La EA se caracteriza por la inflamación, fibrosis y calcificación de la válvula aórtica. La galectina-3 (Gal-3) es un mediador de inflamación y fibrosis cardiovascular, y regula la osteogénesis en la aterosclerosis, siendo su inhibición beneficiosa.

Objetivo: Analizar si la Gal-3 puede ser una nueva diana terapéutica en la calcificación valvular asociada a la progresión de la EA.

Métodos: Se utilizaron válvulas control (n = 8) y válvulas de pacientes con EA (n = 68). Los niveles de Gal-3, así como de los marcadores de inflamación, fibrosis y calcificación fueron cuantificados en el suero y el tejido valvular mediante ELISA, RT-PCR, western blot, coloraciones histológicas e inmunohistoquímicas.

Resultados: Los niveles de Gal-3 en suero se correlacionaron con los niveles de Gal-3 en válvula. La expresión de Gal-3 estaba aumentada en las válvulas de pacientes con EA respecto a las válvulas control. Además, las válvulas de pacientes con EA presentaban mayores niveles de moléculas proinflamatorias (interleuquina-6, interleuquina-1 beta) y de moléculas profibroticas (colágeno tipo I, colágeno tipo III, TGF-β, CTGF). El grado de calcificación y las moléculas osteogénicas (BMP-2, BMP-4, osteopontina) también fueron mayores en las válvulas de pacientes con EA que en las válvulas control. La expresión de Gal-3 en suero y en válvula se correlacionó directamente con los marcadores de calcificación BMP-2 y BMP-4.

Conclusiones: Los niveles de Gal-3 en suero se asocian con los niveles de Gal-3 en válvula. La Gal-3 está aumentada en el tejido valvular de pacientes con EA, y se asocia a marcadores de calcificación valvular. La Gal-3 podría jugar un papel en la calcificación valvular y por tanto ser una nueva diana terapéutica en la EA.

28. LOS RECEPTORES NR4A INCREMENTAN LA EXPRESIÓN DE LA ANTIPIROTEINASA ALPHA-2-MACROGLOBULINA EN CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES Y MODULAN LA ACTIVIDAD DE LAS METALOPROTEINASAS DE MATRIZ

B. Ferrán, R. Rodríguez, O. Calvayrac, J. Alonso, I. Martí, C. Rodríguez y J. Martínez

Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC-ICCC, IIB-Sant Pau.

Objetivo: Las metaloproteinasas de matriz (MMP) están implicadas en el remodelado vascular. Recientemente, los receptores nucleares de la familia RN4A han sido involucrados en la represión transcripcional de las MMP en tejidos no vasculares. En este estudio se analizan otros mecanismos que relacionan dichos receptores con las MMP en células musculares lisas vasculares (CMLV).

Métodos: Los estudios se realizaron en CMLV humanas en cultivo y se utilizó un modelo animal transgénico que sobre-expresa NOR-1 en las CMLV (TgNOR-1). Los receptores NR4A (NOR-1, Nurr1 y Nur77) se sobre-expresaron en CMLV mediante transducción lentiviral. La actividad de MMP-2 y MMP-9 fue evaluada mediante zimografía y *DQ-gelatin assay*. Los niveles de expresión y de proteína fueron analizados mediante PCR a tiempo real, *Western blot*, inmunocitoquímica e inmunohistoquímica. La actividad transcripcional se analizó mediante transfección transitoria de vectores reporteros, y se realizaron ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) y de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). La actividad migratoria de las CMLV se evaluó mediante el método de reparación de herida.

Resultados: La sobre-expresión de los receptores NR4A redujo los niveles de ARNm de la MMP-2, pero no de la MMP-9 en las CMLV; sin embargo, en los sobrenadantes de dichos cultivos disminuyeron tanto los niveles de proteína como de actividad de ambas MMP. En aorta de animales TgNOR-1 se confirmó la reducción de los niveles de expresión de MMP-2 mediante PCR, *Western blot* e inmunohistoquímica. Los niveles de expresión de los inhibidores de MMP (TIMP-1 y TIMP-2) permanecieron invariables; en cambio, aumentó significativamente la expresión (ARNm y proteína) de la alpha-2-macroglobulina (A2M). Mediante *Western blot* e inmunohistoquímica se detectaron niveles significativos de A2M en arterias humanas no ateroscleróticas. El silenciamiento de los receptores NR4A redujo los niveles de expresión basal de A2M en las CMLV. Se identificó un elemento de respuesta a estos receptores (NBRE) en la región promotora de la A2M, cuya funcionalidad se demostró mediante mutagénesis dirigida, EMSA y ChIP. El bloqueo de la A2M con un anticuerpo específico o mediante siRNA redujo parcialmente la inhibición de la actividad MMP observada. La reducción de la actividad MMP en células que sobre-expresan los receptores NR4A se asoció con una menor capacidad migratoria de estas células.

Conclusiones: Los resultados obtenidos demuestran que la A2M se expresa en la pared vascular y que los receptores NR4A regulan su expresión en CMLV. Este nuevo mecanismo de modulación de la actividad MMP por medio de la A2M confirma la relevancia de los receptores NR4A en el remodelado vascular.

29. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y PROSTANOIDES PARTICIPAN EN LA PRODUCCIÓN DE ALDOSTERONA POR ADIPOCITOS EN HIPERTENSIÓN. PAPEL DE LA KINASA DE RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GRK2)

R. Aras¹, A. Nguyen², S. Martínez¹, R. Vila³, C. Murga³, R. Touyz², M. Salaices¹ y A. Briones¹

¹Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid.

²Institute of Cardiovascular and Medical Sciences, University of Glasgow. ³Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid.

Objetivo: Estudios preliminares indican que 1) los adipocitos son una fuente de aldosterona en respuesta a Angiotensina II (AngII);

2) las especies reactivas de oxígeno (ROS) median la producción de aldosterona en respuesta a AngII en células adrenales; 3) la hipertensión está asociada con una relación recíproca entre ROS derivadas de la NADPH oxidasa y/o de la mitocondria y con la cicloxygenasa(COX-2) y la sintasa microsomal de prostaglandina E tipo 1 (mPGES-1) los cuales participan en el daño vascular; 4) la kinasa de receptores acoplados a proteínas G GRK2 juega un papel importante en el daño vascular asociado a la hipertensión y regula la adiposidad. Evaluaremos el papel de ROS y de prostanoïdes derivados de COX-2/mPGES-1 en la liberación de aldosterona de los adipocitos en hipertensión y el papel de GRK2 en este proceso.

Métodos: Los estudios se realizaron en tejido adiposo visceral y/o adipocitos maduros aislados de los siguientes modelos animales: 1) ratones no tratados e infundidos con AngII en ausencia y presencia del inhibidor de la COX-2 celecoxib o los antioxidantes apocinina o mito-TEMPO; 2) ratones COX-2^{-/-}, mPGES-1^{-/-} y GRK2^{+/-} y sus correspondientes ratones *wild type* infundidos o no con AngII; 3) se usaron también adipocitos de las líneas 3T3-L1 y SW872 estimulados con AngII.

Resultados: 1) La infusión de AngII incrementó la expresión génica de GRK2, COX-2, Nox1, Nox4 y aldosterona sintasa (*Cyp11b2*) así como la actividad NADPH oxidasa y la producción de H₂O₂, PGE₂ y aldosterona en el tejido adiposo visceral y/o en los adipocitos maduros. La mayor parte de estos efectos se previnieron por el tratamiento con celecoxib, apocinina o mito-TEMPO y por la deleción de COX-2, mPGES-1 o GRK2. 2) En las líneas celulares de adipocitos 3T3-L1 y/o SW872, AngII incrementó la expresión génica de *Cyp11b2* y la producción de aldosterona que se abolieron por celecoxib, apocinina y mito-TEMPO.

Conclusiones: La relación entre estrés oxidativo y prostanoïdes es responsable de la producción de aldosterona de los adipocitos en animales hipertensos, al menos en parte, a través de GRK2. El exceso de estos mediadores derivados del tejido adiposo podría contribuir al daño vascular observado en hipertensión.

30. PAPEL DE LAS METALOPROTEINASAS 2 Y 9 EN EL DESARROLLO DE ALBUMINURIA BAJO LA INHIBICIÓN CRÓNICA DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA

H. Pulido¹, L. Agudo², C. Fernández³, B. Somoza³, I. Aránguez⁴, J. Segura⁵, R. Kreutz⁶, M. Fernández⁴, L.M. Ruilope⁵ y G. Ruiz¹

¹Instituto de Investigación i+12, Hospital 12 de Octubre, Instituto Pluridisciplinar y Facultad de Farmacia, UCM. ²Consejo Superior de Investigaciones Científicas. ³Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Alimentación, Facultad de Farmacia, Universidad CEU-San Pablo. ⁴Instituto Pluridisciplinar y Facultad de Farmacia, UCM. ⁵Instituto de Investigación i+12, Hospital 12 de Octubre. ⁶Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, Charité-Universitätsmedizin.

Objetivo: Se ha descrito que tanto la metaloproteinasa (MMP)2 como la MMP9 tienen un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad cardiovascular y renal. El objetivo del estudio fue analizar la actividad de estas enzimas en el plasma de pacientes hipertensos que, a pesar de estar controlados con inhibidores del sistema renina angiotensina, desarrollan albuminuria como indicador de daño renal.

Métodos: La concentración plasmática de las MMPs se determinó por ELISA y su actividad por zimografía. Para estudiar la interacción entre MMP2 y su inhibidor endógeno (TIMP)2 y entre MMP9 y TIMP1 se desarrolló un novedoso ensayo con la tecnología AlphaLISA™. Se utilizó el plasma de 17 pacientes hipertensos controlados normoalbuminúricos (albúmina/creatinina ≤ 20 mg/g) y 22 pacientes albuminúricos, que se separaron en dos grupos: i) 14 con albuminuria moderada (albúmina/creatinina ≤ 200 mg/g) ii) 8 con albuminuria severa (albúmina/creatinina > 200 mg/g). El estudio de la activi-

dad de las MMPs en riñón se realizó en el modelo de rata normotensa y espontáneamente albuminúrica MWF, y se comparó con ratas normoalbuminúricas y espontáneamente hipertensas (SHR) y ratas controles Wistar Kyoto (WKY) de 12 semanas ($n = 6$ por grupo). Dado que la albuminuria es atribuible a un *locus* localizado en el cromosoma 8, se utilizaron además, ratas MWF en las que se sustituyó este cromosoma por el respectivo de SHR, dando lugar a las ratas consómicas MWF-8^{SHR}.

Resultados: Los pacientes con albuminuria tanto moderada como severa, no presentan diferencias significativas en la concentración plasmática de las MMPs en comparación con los normoalbuminúricos. Sin embargo, muestran un incremento significativo en su actividad. Este incremento fue del 75% para MMP2 en pacientes con albuminuria moderada y del 84% en pacientes con albuminuria grave. El incremento de actividad de MMP9, fue del 55% en pacientes con albuminuria moderada y del 49.3% en pacientes con albuminuria grave. Además se observa una correlación positiva entre el grado de albuminuria de los pacientes y la actividad tanto de MMP2 ($r = 0.47$; $p = 0.0031$), como de MMP9 ($r = 0.53$; $p = 0.0008$). La interacción entre MMP2/TIMP2 y MMP9/TIMP1 fue significativamente inferior en los pacientes albuminúricos. Los resultados en el modelo experimental muestran que la actividad enzimática en plasma y riñón de MMP2 y MMP9 fue significativamente mayor en las ratas MWF en comparación con las WKY. Además, para las ratas MWF existe una correlación directa entre la actividad de la MMP9 renal y sistémica. Este aumento en la actividad de las MMPs se ve reducido hasta niveles basales en las ratas consómicas MWF-8^{SHR}.

Conclusiones: El aumento de la actividad de las MMPs es específico del desarrollo de albuminuria en pacientes hipertensos, incluso cuando existe un buen control de la presión arterial con inhibidores del SRA. El incremento de la actividad de las MMPs a nivel sistémico podría reflejar un incremento la actividad de estas enzimas a nivel tisular. En la práctica clínica, la exclusiva determinación de la concentración sistémica de las MMPs, podría no estar reflejando su actividad real.

Agradecimientos: Ministerio de Economía y Competitividad (BFU2011-25303), Grupos UCM (GR921641), Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG KR1152-3-1) y la Fundación Mutua Madrileña.

31. EL PROTEOMA DE LAS MICROVESÍCULAS CIRCULANTES CONSTITUYE UNA NUEVA FUENTE DE BIOMARCADORES PARA LA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA TERAPÉUTICA EN PACIENTES MICROALBUMINÚRICOS CON BLOQUEO DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

F. de la Cuesta¹, M. Baldan-Martín¹, L. Mourino-Álvarez¹, G. Álvarez-Llamas², L. González-Calero², G. Ruiz-Hurtado³, J. Segura⁴, F. Vivanco², L.M. Ruilope³ y M.G. Barderas¹

¹Laboratorio de Fisiopatología Vascular, Hospital Nacional de Parapléjicos, SESCAM. ²Departamento de Inmunología, IIS-Fundación Jiménez Díaz. ³Departamento de Riesgo Cardiovascular e Hipertensión, IIS-Hospital 12 de Octubre. ⁴Unidad de Hipertensión, Hospital 12 de Octubre.

Objetivo: La albuminuria es un potente predictor de eventos cardiovasculares y renales. La ineficiencia de la supresión del sistema renina-angiotensina (SRA) está asociada con la aparición de albuminuria. Las microvesículas son liberadas al torrente circulatorio por determinados tipos celulares a consecuencia de procesos de transporte, activación o muerte celular. El recuento de microvesículas circulantes de origen plaquetario y endotelial ha demostrado tener un importante papel como biomarcador cardiovascular. Por lo tanto, el proteoma de estas microvesículas podría reflejar los procesos subyacentes en pacientes con hipertensión arterial (HTA) y albuminuria. El objetivo principal del presente estudio fue el análisis

del proteoma de las microvesículas circulantes en sangre de pacientes con albuminuria prolongada o desarrollada *de novo*, en comparación con un grupo normoalbuminúrico de pacientes hipertensos con bloqueo del SRA, con el fin de aportar nuevos biomarcadores de riesgo cardio-renal y de eficiencia terapéutica.

Métodos: En este estudio, se ha analizado el contenido proteico de las microvesículas circulantes mediante marcaje isobárico iTRAQ por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), en pacientes con albuminuria, prolongada o desarrollada *de novo*, frente a pacientes normoalbuminúricos con HTA, con el fin de identificar biomarcadores con valor pronóstico. Las microvesículas han sido aisladas mediante un protocolo de ultracentrifugación optimizado para evitar la contaminación de proteínas del plasma. La pureza de la fracción aislada ha sido verificada mediante microscopía electrónica y confocal, western blot y citometría de flujo.

Resultados: El análisis proteómico de microvesículas circulantes ha permitido definir un grupo de 23 proteínas cuya expresión aparece alterada en un contexto de ineficacia del tratamiento terapéutico antihipertensivo. Algunas de estas proteínas reflejan fenómenos de disfunción endotelial, inflamación y un entorno pro-trombótico en los pacientes albuminúricos.

Conclusiones: El estudio realizado ha mostrado el valor del proteoma de microvesículas circulantes como fuente no-invasiva de biomarcadores alternativa al plasma. Además, presenta la ventaja de evitar el elevado rango dinámico de concentración de este último. Las proteínas diferencialmente expresadas por las microvesículas evidencian una mayor disfunción endotelial, inflamación y riesgo trombótico asociados con el desarrollo de albuminuria, lo que muestra su potencial valor en el seguimiento de pacientes con HTA.

32. UNA ISOFORMA ALTERNATIVA DEL GEN P22PHOX DISMINUYE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA Y SU EXPRESIÓN SE ASOCIA CON LAS CIFRAS DE PRESIÓN ARTERIAL SISTÓLICA

A. Pejenaute¹, G. San José², P. Saldanha³, M. Fortún Landecho³, O. Beloqui³, A. Fortuño² y G. Zalba¹

¹Departamento de Bioquímica y Genética, Universidad de Navarra. ²Área de Ciencias Cardiovasculares, CIMA, Universidad de Navarra. ³Departamento de Medicina Interna, Clínica Universidad de Navarra.

Objetivo: La activación de la familia de las NADPH oxidadas (NOXes) se asocia con la hipertensión arterial (HTA) y la enfermedad vascular. Una mayor expresión de p22phox, una subunidad común del citocromo de NOX1, NOX2 y NOX4, así como la presencia de ciertas variantes alélicas, se asocian con una mayor actividad de las NOXes, con la HTA y con el riesgo cardiovascular. El presente estudio pretende identificar nuevas isoformas de p22phox, y estudiar su relevancia en la activación de las NOXes, y en la fisiopatología de la HTA y de la enfermedad vascular.

Métodos: Las potenciales isoformas de p22phox se identificaron mediante un screening en genotecas de cDNA-Marathon. Las isoformas identificadas fueron clonadas en un vector de expresión adenoviral. La expresión proteica de p22phox, la actividad NADPH oxidasa y la actividad caspasa, se analizaron en células endoteliales de aorta bovina, por Western blot, luminiscencia y colorimetría, respectivamente. La expresión del mRNA de las isoformas de p22phox se determinó mediante PCR, en células blancas mononucleadas obtenidas de una población de individuos asintomáticos ($n = 220$).

Resultados: El screening por PCR de una genoteca cDNA-Marathon identificó, además de la isoforma salvaje, una isoforma alternativa de p22phox que carecía del exón 4. La delección del domi-

nio codificado por este exón no alteraba el marco de lectura de esta isoforma alternativa, que generaba una proteína de menor tamaño de 19 kDa. En comparación con los efectos obtenidos al expresar la isoforma salvaje de p22phox, la expresión de la isoforma alternativa se asoció con una menor actividad NADPH oxidasa y con una menor activación de caspasas. En el estudio en humanos encontramos que los niveles de mRNA de la isoforma salvaje eran sustancialmente mucho más altos que los de la isoforma alternativa. Es interesante resaltar que la expresión de la p22phox alternativa correlacionaba positivamente con las cifras de presión arterial sistólica; sus niveles también correlacionaban con los niveles de expresión de la isoforma salvaje y con los valores de actividad NADPH oxidasa.

Conclusiones: Nuestros resultados nos permiten especular con la posibilidad de que la isoforma alternativa sea un reflejo de situaciones de estrés oxidativo crónico, que pudiera actuar como un modulador de la activación de las NOXes y de sus efectos deletéreos. La caracterización de los mecanismos que favorecen la expresión de esta isoforma permitiría en un futuro diseñar nuevas acciones terapéuticas encaminadas a prevenir la activación de las NOXes y sus efectos oxidantes en la HTA.