

ÁREA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

OB-001. EN RATONES DOBLES TRANSGÉNICOS PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER LA INGESTIÓN DE UNA DIETA ENRIQUECIDA CON ANTIOXIDANTES TIÓLICOS MEJORA LA FUNCIONALIDAD DE SUS CÉLULAS INMUNITARIAS

L. Marín López de Carvajal¹, O. Hernández¹, I. Mate¹, J. Viña² y M. de la Fuente¹

¹Universidad Complutense de Madrid. ²Universidad de Valencia.

En la enfermedad del Alzheimer (EA) existe un deterioro en la función inmunitaria, hecho que hemos observado a nivel periférico en ratones triples transgénicos para la enfermedad (3xTgAD), en los que aparece una prematura inmunosenescencia. Sin embargo, en un modelo de dobles transgénicos (2xTgAD) no se tienen estudios al respecto. Por otra parte, una serie de investigaciones acreditan la utilización de dietas enriquecidas con antioxidantes tiólicos (como la n-acetil cisteína (NAC) y la tioprolina, TP) para mejorar la función inmunitaria, y consecuentemente la salud y la longevidad. El objetivo del presente estudio fue estudiar una serie de funciones inmunitarias que se deterioran al envejecer en ratones 2xTgAD, así como el efecto en las mismas de la ingestión de una dieta con los antioxidantes indicados. Se emplearon ratones (B6C3HF2/J) hembras dobles transgénicos (para beta mieloides y presenilina: APP^{swe}, PSEN1^{de9}), así como sus controles no transgénicos (NTg) de 6 (adultos) y 12 meses de edad (maduros). Los ratones 2xTgAD se dividieron en 2 grupos uno control (alimentado con una dieta estándar), igual que la que recibieron los NTg, (2TgADC) y otro que recibió una dieta con NAC y TP (0,1% p/p) (2TgADA). Tras 2 meses y 8 meses de ingestión de dicha dieta (con 6 y 12 meses de edad, respectivamente) se extrajeron leucocitos peritoneales (macrófagos y linfocitos) y se valoraron las siguientes funciones: movilidad hacia un foco infeccioso (quimiotaxis) de macrófagos y linfocitos, así como la respuesta linfoproliferativa (LP) en presencia de los mitógenos (concanavalina A: ConA y lipopolisacárido: LPS). Todas ellas son funciones que disminuyen al envejecer. Los resultados muestran, en las funciones estudiadas, diferencias significativas entre los 2TgADC y los NTg, especialmente a los 12 meses de edad, mientras que los que ingieren antioxidantes (2TgADA) presentan valores similares a los correspondientes controles NTg. Este hecho también es más evidente tras 8 meses de ingestión de dieta. Se puede concluir que en ratones 2xTgAD existe un deterioro prematuro de la función inmunitaria y que la ingestión de una dieta con cantidades apropiadas de antioxidantes tiólicos impide la aparición de esa prematura inmunosenescencia.

Financiación: MICINN (BFU2011-30336); Grupo UCM (910379ENE-ROINN); RETICEF (RD12/0043/0018; RD12/0043/0029), ISCIII-FEDER (Unión Europea).

OB-002. EL EJERCICIO ESPONTÁNEO NO AFECTA A LA LONGEVIDAD PERO DISMINUYE LA FRAGILIDAD EN RATONES C57BL/6J

R. García Vallés, A. Díaz, A. Salvador Pascual, H. Cabo, B. Ferrando y J. Viña Ribes

Universidad de Valencia.

Objetivos: Determinar el efecto del ejercicio físico espontáneo durante toda la vida en la esperanza de vida máxima y cómo afecta a la fragilidad en ratones.

Métodos: 144 ratones C57BL/6J machos (3 meses de edad) se dividieron aleatoriamente en dos grupos: sedentarios (n = 72) y ejercitados (n = 72). Los roedores se encontraban estabulados en jaulas individuales con o sin acceso a la rueda de correr en función al grupo al que pertenecían. Se compararon ambos estilos de vida en términos de

longevidad. Del mismo modo, desarrollamos el "Valencia test". Éste consiste en la cuantificación de la fragilidad en ratones mediante la evaluación de los siguientes parámetros: pérdida de peso, agotamiento y velocidad de la marcha, debilidad y coordinación motora.

Resultados: No se evidenció efecto del ejercicio físico espontáneo sobre la longevidad (media o máxima) de los ratones. El índice de fragilidad incrementó en función de la edad de los ratones. No obstante, se evidenció que el grupo activo sí obtenía mejores resultados que el grupo sedentario en los parámetros relacionados con la fragilidad.

Conclusiones: Los resultados muestran que el ejercicio físico espontáneo durante toda la vida podría ser una herramienta muy prometedora en la intervención para la modulación de la calidad de vida. Dicho ejercicio no aumenta la longevidad pero previene la fragilidad en ratones. Por otra parte, hemos demostrado que la inactividad física es un factor que contribuye a la fragilidad y que un animal sedentario puede ser considerado un modelo de animal frágil.

Agradecimientos: Este trabajo se ha financiado con las siguientes ayudas: SAF2010-19498; ISCIII2006-RED13-027, ISCIII2012-RED-43-029 (RETICEF), PROMETEO2010/074, 35NEURO, EU Funded CM100, FRAILOMIC-HEALTH.2012.2.1.1-2 y fondos FEDER de la Unión Europea.

OB-003. EL EJERCICIO FÍSICO NEUROPROTEGE VÍA BDNF EN UN MODELO MURINO DE POSMENOPAUSIA CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

H. Pareja-Galeano¹, Y. García-Mesa², S. Revilla², L. Giménez-Llort³, J. Viña¹ y C. Sanfeliu²

¹Fundación Investigación Hospital Clínico Universitario/INCLIVA. Universidad de Valencia. ²CSIC. IDIBAPS. ³Universitat Autònoma de Barcelona.

Objetivos: Las mujeres posmenopáusicas son más vulnerables frente al declive cognitivo y la enfermedad de Alzheimer (EA) a causa de su deficiencia estrogénica. Por otro lado, el ejercicio físico ha sido considerado como una eficaz aproximación terapéutica para mantener la salud y el correcto estado psicológico tras la menopausia, así como para mejorar la plasticidad cerebral en la población con riesgo de padecer Alzheimer. Por ello nos planteamos estudiar los mecanismos por los que el ejercicio físico puede contribuir a mejorar la clínica de modelos de posmenopausia y/o EA.

Métodos: Sometimos a ratones de seis meses de edad, triple transgénicos para la EA (3xTg-EA) y previamente ovariectomizados, así como a sus respectivos controles, a tres meses de ejercicio voluntario en rueda. Estudiamos, mediante distintos test cognitivos, su evolución psicológica y, tras sacrificarlos, analizamos distintos parámetros moleculares relacionados con vías neurotróficas, estatus antioxidante y metabolismo cerebral.

Resultados: A los nueve meses de edad encontramos un significativo empeoramiento de los síntomas conductuales y psicológicos así como un declive cognitivo, propios de la demencia, en los ratones 3xTg-EA ovariectomizados en comparación con los 3xTg controles. Además, los ratones no transgénicos ovariectomizados también mostraron signos de alteraciones cognitivas. El ejercicio físico protegió contra el deterioro comportamental y normalizó la capacidad de aprendizaje y memoria. El estudio de los biomarcadores hipocámpales clave del estatus antioxidante y de la plasticidad neuronal sugirió un rol central del BDNF en la neuroprotección contra la ansiedad, apatía y declive cognitivo inducido por la ovariectomía en el genotipo de EA.

Conclusiones: Las mejoras cognitivas y psicológicas encontradas en los ratones 3xTg-EA confirman resultados encontrados por nuestro grupo en otros modelos. Por otro lado, las alteraciones cognitivas inducidas por la ovariectomía y/o aquellas provocadas por el genotipo de EA son considerablemente revertidas a través del ejercicio físico.

OB-004. EL RESVERATROL AUMENTA LA EXPRESIÓN DE GENES ANTIOXIDANTES VÍA PTEN

M. Inglés de la Torre, V. Bonet Costa, M. Dromant Jarque, M. El Alami, C. Borrás Blasco y J. Viña Ribes
Universidad de Valencia.

El resveratrol es un polifenol natural, cuya actividad antioxidante ha sido ampliamente estudiada en los últimos años, tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, existe controversia sobre sus efectos *in vivo*, por su baja biodisponibilidad y por la falta de consenso en cuanto al mecanismo implicado. En el presente estudio, usando concentraciones nutricionales de resveratrol, se pretende confirmar su capacidad de reducir los niveles de peróxido de hidrógeno, mediante la inducción de genes antioxidantes, así como el posible mecanismo implicado. Para ello, se cultivaron células humanas tumorales de glándula mamaria (MCF-7) en medio Iscove's modified Dulbecco's (IMDM) sin rojo fenol, suplementado con un 10% de suero bovino fetal, en frascos de 25 o 75 mL. Cuando las células alcanzaron el 80-90% de confluencia, se incubaron con resveratrol durante 48h. Los niveles de peróxido de hidrógeno fueron determinados por fluorimetría, usando una modificación del método de Barja. La expresión de genes antioxidantes, tales como catalasa (Cat) y manganeso- superóxido dismutasa (MnSOD) se determinó a través de la retrotranscripción- amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). La cantidad de proteína se determinó mediante western blotting, empleando anticuerpos específicos (PTEN, pAkt, Akt total, tubulina). Como inhibidor de PTEN se empleó bisperoxo (-bipiridina) oxovanadato (V) de potasio. El resveratrol disminuye los niveles de peróxido de hidrógeno en células MCF-7, incluso a concentraciones del orden de nanomolar (1nM), aumentando los niveles de PTEN y disminuyendo la fosforilación de Akt. Las células incubadas con resveratrol 1nM también mostraron un incremento en los niveles de mRNA de catalasa y MnSOD. Estos efectos fueron abolidos al coincubar las células con un inhibidor de PTEN. Concentraciones nutricionales de resveratrol disminuyen los niveles de peróxido de hidrógeno mediante la inducción de genes antioxidantes, a través de la vía de señalización de PTEN.

Este trabajo fue financiado a través de las becas SAF2010-19498, ISCIII2006-RED13-027, PROMETEO2010/074, 35NEURO GentxGent, EU COSTB35 y CM1001. Este estudio ha sido cofinanciado por los fondos FEDER de la Unión Europea.

OB-005. EL TRATAMIENTO CON ALOPURINOL E INDOMETACINA PREVIENE LA ATROFIA MUSCULAR. PAPEL DE LAS E3 UBIQUITINA LIGASAS

B. Ferrando¹, C. Puchades¹, H. Cabo¹, A. Salvador-Pascual¹, V. Sebastián² y J. Viña¹

¹Universidad de Valencia. ²Hospital Universitario La Fe. Valencia.

Objetivos: El principal objetivo de nuestro estudio fue determinar el mecanismo por el que las ERO causan atrofia muscular y su posible prevención con el alopurinol, un inhibidor conocido de la XO utilizado en la práctica clínica, y la indometacina, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo. Se estudió la activación de la MAP quinasa p38 y la vía inflamatoria de NF- κ B, así como la expresión de dos E3 ubiquitina-ligasas implicadas en la proteólisis, MAFbx/Atrogin-1 y MuRF-1.

Métodos: Ratos Wistar macho (3 meses de edad) fueron sometidos a un protocolo de suspensión de miembros inferiores durante 14 días (n = 16), con o sin el tratamiento. Estos animales se compararon con un grupo control (n = 16), con o sin tratamiento. Después de la intervención experimental se extrajeron los músculos sóleos, se pesaron y se procesaron para determinar el estrés oxidativo y parámetros inflamatorios.

Resultados: La suspensión de miembros inferiores indujo un aumento significativo en la actividad de la XO en el plasma (39%, p = 0,001) y en los niveles de CuZnSOD y catalasa en el músculo esquelético. La inhi-

bición de la XO previno la carbonilación de proteínas, tanto en el plasma como en el músculo sóleo de los animales suspendidos. El dato más relevante aportado por este estudio es que el alopurinol previene aproximadamente un 20% la atrofia del músculo sóleo después de un protocolo de suspensión de miembros posteriores. Así mismo, encontramos una prevención adicional, en el proceso de atrofia, con la combinación del alopurinol y la indometacina, estando involucradas las vías p38 MAPK-MAFbx y NF- κ B -Murf-1 en todo este proceso.

Conclusiones: Nuestros datos indican que la administración de alopurinol e indometacina puede tener beneficios clínicos en sujetos encamados, astronautas, pacientes con sarcopenia y/o caquexia.

Agradecimientos: Este trabajo se ha financiado con las siguientes ayudas: SAF2010-19498; ISCIII2006-RED13-027, ISCIII2012-RED-43-029 (RETICEF), PROMETEO2010/074, 35NEURO, EU Funded CM100, FRAI-LOMIC-HEALTH.2012.2.1.1-2 y fondos FEDER de la Unión Europea.

OB-006. IMPLICACIÓN DEL TRANSPORTADOR DE β -AMILOIDE LRP-1 EN RATONES TRANSGÉNICOS PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER APPSWE/PS1DE9

V. Bonet Costa, K. Mohamed Abdelaziz, M. Inglés de la Torre, C. Mas Bagues, C. Borrás Blasco y J. Viña
Universitat de València.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo que causa la pérdida gradual de las funciones cognitivas, y que está relacionado con el envejecimiento y el estrés oxidativo. LRP1 es un receptor implicado en el transporte del β -amiloide (β A). La eliminación del péptido β A a través de la barrera hematoencefálica desde el cerebro hacia la sangre está mediada por este transportador. Esta circulación sistémica acaba en el hígado, donde también media la entrada del β A. El RAGE es un transportador multiligando, entre los que encontramos el β A. Uno de los hechos importantes para la EA es que este transportador es capaz de introducirlo desde la sangre al cerebro. Ya que en este modelo el β A propio de la EA se forma en el sistema nervioso central, pretendemos describir el mecanismo por el que se produce una interacción entre cerebro e hígado. El modelo animal elegido para la realización de este estudio es el ratón doble transgénico para la enfermedad de Alzheimer APPSWE/PS1DE9, que desarrolla placas de β A con la edad. Trabajamos con machos *wild type* y transgénicos de diferentes edades, 3-5 meses, 10-13 meses y más de 20 meses, para ver la evolución de la patología asociada. Para determinar este camino medimos por *western blotting* los transportadores LRP1, tanto en hígado como en cerebro, y RAGE solo en cerebro. Los resultados muestran que el transportador RAGE no cambia entre los diferentes grupos. Respecto al LRP1, disminuye con la edad en cerebro en ratones *wild type* y APP/PS1. En hígado disminuye con la edad solo en APP/PS1, y vemos que hay más en el ratón APP/PS1 que en el *wild type* en las edades de 3-5 meses y 10-13 meses. Los resultados sugieren que el transportador LRP1 es el principal responsable de la circulación sistémica del β A.

Este trabajo fue apoyado por las becas SAF2010-19498, ISCIII2006-RED13-027, PROMETEO2010/074, 35NEURO GentxGent and EU Funded COSTB35 and CM1001, y cofinanciado por fondos FEDER de la Unión Europea.

OB-007. MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS EN MODELOS CELULARES DE DISQUERATOSIS CONGÉNITA LIGADA AL CROMOSOMA X

J.L. García-Giménez¹, C. Pérez-Quilis², A.M. Velázquez-Ledesma², S. Bañuls², I. Esmoris³ y F.V. Pallardó²

¹CIBERER. ²Facultat de Medicina. *Universitat de València.* ³INCLIVA. *Fundación Hospital Clínico de Valencia.*

Las modificaciones post-traduccionales (PTMs) en histonas constituyen uno de los mecanismos de codificación de la información

epigenética. Estas modificaciones regulan la estructura de la cromatina y en consecuencia regulan procesos celulares como la replicación, la transcripción de los genes y la diferenciación celular. El envejecimiento y algunos síndromes con inestabilidad genética se han asociado a cambios en la estructura de la cromatina. Entre los cambios más característicos están la pérdida de organización de regiones cromatínicas por alteraciones en las PTMs de las histonas. Las modificaciones más estudiadas son la acetilación y la metilación de las histonas. Sin embargo, existen otras PTMs relacionadas con mecanismos redox (carbonilación, nitrosilación y poly-ADPribosilación) muy poco caracterizadas. La disqueratosis congénita ligada al cromosoma X (DKC-X) (ORPHA1775) es una enfermedad rara producida por mutaciones en el gen DKC1, que codifica para la disquerina, una proteína que interviene en la biosíntesis del rRNA y que contribuye a la estabilización del complejo telomerasa. Los pacientes de DKC-X presentan características similares a un envejecimiento prematuro que evoluciona finalmente con aplasia medular. En esta comunicación se presentan diferencias en distintas modificaciones post-traduccionales en histonas (H3K9ac, H4K8ac, H2BK5ac y H3K9me3) de un modelo celular de DKC-X comparada con una línea celular en la que se ha restablecido la actividad telomerasa. Además, en esta comunicación se presenta el perfil redox y las enzimas antioxidantes en 3 líneas de fibroblastos provenientes de pacientes con DKC-X, con el objetivo de caracterizar el estrés oxidativo en células DKC.

OB-008. CENTENARIOS, EJEMPLO DE ENVEJECIMIENTO SALUDABLE

K. Mohamed Abdelaziz¹, P. Sanchis², A. Belenguer², J.A. Avellana², J. Gambini¹ y J. Viña¹

¹*Universitat de València.* ²*Hospital de la Ribera. Valencia.*

Introducción: Un estudio reciente de nuestro grupo, en colaboración con la Unidad de Geriátría del Hospital de la Ribera, revela que la expresión de miRNAs de los centenarios es muy similar a la de los jóvenes y muy diferente de ancianos. Además, uno de los seis microRNAs característicos del grupo de centenarios, el miR-21 (Serna et al, 2012), este microRNA está implicado en múltiples procesos celulares, entre otros la respuesta al estrés oxidativo (Cheng et al, 2009).

Objetivos: Estudiar si la expresión diferencial de los microRNAs tiene algún efecto protector contra el daño oxidativo.

Métodos: Seleccionamos tres grupos de individuos: jóvenes (de 20 a 40 años, n = 31), septuagenarios (de 70 a 80 años, n = 31) y centenarios (\geq 98 años, n = 27). Determinamos en plasma la peroxidación lipídica, midiendo los niveles de malondialdehído por HPLC y la oxidación proteica, detectando los grupos carbonilos mediante Western Blotting.

Resultados: En cuanto a los niveles de MDA en plasma, los jóvenes y centenarios tienen niveles similares y significativamente más bajos que los septuagenarios. La carbonilación proteica en plasma de los centenarios es significativamente más baja que los jóvenes y septuagenarios, siendo igual entre estos dos últimos grupos.

Conclusiones: Los centenarios, el mejor ejemplo de un buen envejecimiento, tienen un menor estrés oxidativo que los sujetos de edad avanzada (septuagenarios); y en algunos casos, incluso menos que los jóvenes.

Agradecimientos: Este trabajo se ha financiado con las siguientes ayudas: SAF2010-19498; ISCIII2006-RED13-027, ISCIII2012-RED-43-029 (RETICEF), PROMETEO2010/074, 35NEURO, EU Funded CM100, FRAILOMIC-HEALTH.2012.2.1.1-2 y fondos FEDER de la Unión Europea.

OB-009. ESTUDIO DEL EFECTO DEL SILENCIAMIENTO DE GENES IMPLICADOS EN LA DISQUERATOSIS CONGÉNITA SOBRE LOS SISTEMAS ANTIOXIDANTES CELULARES

J.S. Ibáñez-Cabellos¹, M. Seco-Cervera², G. Pérez-Machado³, J.L. García-Giménez² y F.V. Pallardó⁴

¹Sistemas Genómicos. ²CIBERER. ³Universidad Central de Las Villas. Cuba. ⁴Universitat de València.

El complejo telomerasa y el telosoma actúan regulando, manteniendo y reparando los telómeros. El complejo telomerasa está formado por una estructura de proteínas (TERT, disquerina, GAR, NHP2, NOP10) y ácido nucleico (TERC) que juntos funcionan como una transcriptasa inversa. El telosoma está compuesto por un entramado de proteínas (TRF2, TRF1, TIN2, RAP1, TPP1 y POT1). Por otro lado la disqueratosis congénita (DC)(ORPHA1775) es una enfermedad rara con características similares a un envejecimiento prematuro. La DC es una enfermedad genéticamente heterogénea producida por mutaciones en los genes que codifican para distintas subunidades del complejo telome-

rasa y telosoma. Se sabe que el ADN telomérico es susceptible al estrés oxidativo y que la actividad telomerasa depende del entorno redox celular. Recientemente se estableció una correlación entre la actividad telomerasa y la actividad catalasa, y se ha sugerido un papel antioxidante extranuclear de la telomerasa. Sin embargo, todavía no está esclarecido si existe alguna relación o conexión molecular entre la actividad telomerasa y la defensa antioxidante celular. En este trabajo, mediante el uso de la tecnología del ARN de interferencia (siRNA) se presentará el efecto del silenciamiento en células HeLa de los genes DKC1 y NOP10 del complejo telomerasa y TINF2 del telosoma sobre la capacidad antioxidante celular. Con este silenciamiento se pretendió observar si existe un efecto celular relacionado con la producción de estrés oxidativo o alteración de los sistemas antioxidantes tras el silenciamiento de estos componentes implicados en el mantenimiento de los telómeros. En esta comunicación se han evaluado los niveles de DKC1, NOP10 y TINF2 así como los niveles de enzimas antioxidantes (CuZnSOD, MnSOD, Catalasa, Gpx1, Grx1 y Trx1) mediante RT-qPCR y Western Blot.