

**Objetivos:** 1º Determinar AGE, oxidación de proteínas y estatus antioxidante en pacientes con DA. 2º Establecer correlaciones entre varones y mujeres en los parámetros analizados. 3º Comparar los resultados con los obtenidos en una población control.

**Métodos:** Se analizaron 25 pacientes con DA (17 mujeres, 8 varones) con edades comprendidas entre 66 y 93 años, y 25 individuos sanos, (7 mujeres y 18 varones) con edades comprendidas entre 58 y 88 años (grupo control). El contenido de AGEs se valoró por espectrofluorimetría, según el método de Yanagisawa et al. Daño oxidativo a proteínas se determinó valorando: a) contenido de proteínas carboniladas y b) contenido de di-tirosina. La concentración de proteínas carboniladas se determinó por el método colorimétrico de Levine et al, y la determinación de di-tirosina se realizó mediante fluorescencia según el método de Witko-Sarsat et al. Para determinar el estatus antioxidante se valoraron grupos tiol y capacidad antioxidante total (CAT). Los grupos tiol se valoraron con el método de HU y col., modificado por Himmelfarb et al. La CAT se determinó mediante el método FRAP descrito por Benzoe y Strain.

**Resultados:** El grupo con DA tenía niveles significativamente más elevados de AGE que el grupo control y no se obtuvieron diferencias significativas entre varones y mujeres ni en pacientes con DA ni en controles. La concentración de proteínas carbonizadas fue significativamente mayor en pacientes con DA que en controles, no se obtuvieron diferencias significativas entre sexos, pero sí entre poblaciones para cada sexo. Los valores de di-tirosina fueron significativamente más elevados en pacientes con DA, no se observaron diferencias significativas entre sexos, pero si se obtuvieron entre varones de ambas poblaciones. Tanto grupos tiol como CAT eran significativamente menores en pacientes con DA que en controles, se observaron diferencias significativas entre sexos en DA, pero no en controles.

**Conclusiones:** El descenso del estatus antioxidante en DA conlleva un aumento tanto en el contenido de AGE, como en proteínas carboniladas y di-tirosina.

#### **PB-002. CAMBIOS EN EL RITMO CIRCADIANO DE LAS FUNCIONES DE LINFOCITOS EN EL ENVEJECIMIENTO HUMANO**

I. Mate Otaño, C. Carpintero y M. de la Fuente del Rey  
*Universidad Complutense de Madrid.*

La implicación del sistema circadiano en la comunicación neuroinmunoendocrina, y consecuentemente en la respuesta inmunitaria, posibilita una adecuada homeostasis del organismo. Está bien establecido que con el envejecimiento existe un deterioro de los ritmos circadianos. Dado que los estudios sobre los cambios con la edad en los ritmos circadianos de las funciones inmunitarias son prácticamente inexistentes, el objetivo del presente trabajo ha sido conocer las variaciones circadianas de una serie de funciones de los linfocitos en el envejecimiento humano. Se obtuvieron muestras sanguíneas de un total de 17 hombres y mujeres sanos, 7 jóvenes (20-29 años) y 10 maduros (70-79 años) a las 10:00h y 15:00h. Tras la separación de linfocitos, se valoró su capacidad de adherencia al endotelio, función que aumenta con la edad. Además, se analizó la movilidad dirigida hacia un foco infeccioso (quimiotaxis) por un quimioatrayente (péptido formilado), la respuesta linfoproliferativa (LP) en presencia del mitógeno fitohemaglutinina, y la respuesta citotóxica antitumoral de las células Natural Killer (NK), todas ellas funciones que disminuyen con el envejecimiento. Los resultados muestran cambios en el ritmo circadiano de las funciones estudiadas al envejecer, ya que, en relación a los jóvenes, algunos ritmos desaparecen, como ocurre en la LP, otros aparecen (adherencia y actividad NK) o se acentúan (quimiotaxis). En todas las funciones, los valores obtenidos a las 15:00h son menores que a las 10:00h (es el caso de la quimiotaxis, la LP y la actividad NK), o mayores (adherencia). Como ejemplo, en maduros la actividad NK (porcentaje de lisis tumoral) a las 10:00 h fue de  $21 \pm 1$  y de  $17 \pm 1$  a las 15:00h ( $p < 0,05$ ), disminución que no aparece en

## **ÁREA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

#### **PB-001. PRODUCTOS FINALES DE GLICACIÓN AVANZADA (AGE), OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS Y ESTATUS ANTIOXIDANTE EN PACIENTES CON DEMENCIA ALZHEIMER**

R. Guzmán Martínez<sup>1</sup>, C. Campos Vaquero<sup>1</sup>, M.E. López-Fernández<sup>1</sup>, R. Yubero Pancorbo<sup>2</sup>, C. Massegú Serrà<sup>2</sup> y A. Casado Moragón<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). <sup>2</sup>Hospital Clínico San Carlos.

**Introducción:** La presencia de estrés oxidativo está estrechamente ligada a la demencia Alzheimer (DA), de hecho algunos autores la consideran como causa temprana de la enfermedad.

jóvenes. En conclusión, al avanzar la edad existe una modificación de los ritmos circadianos de los linfocitos, células inmunitarias muy afectadas en el proceso del envejecimiento. Además, a las 15:00 horas en las funciones estudiadas, se muestran, en general, valores más "envejecidos" que a las 10:00. Los cambios en el ritmo circadiano al envejecer podrían contribuir a aumentar la inmunosenescencia y consecuentemente la pérdida de salud.

Financiación: MICINN (BFU2011-30336); Grupo de investigación UCM (910379ENEROINN); RETICEF (RD12/0043/0018) del ISCIII-FEDER (Unión Europea).

### **PB-003. CAMBIOS CON LA EDAD EN EL ESTRÉS OXIDATIVO DE BAZO Y TIMO EN UN MODELO DE ENVEJECIMIENTO PREMATURO EN RATÓN**

C. Vida Rueda, O. Hernández, E. González, I. Corpas y M. de la Fuente

*Universidad Complutense de Madrid.*

El envejecimiento está asociado con una situación de estrés oxidativo crónico (desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros). Estudios previos han demostrado que ratones prematuramente envejecidos (PAM) presentan en la edad adulta una inmunosenescencia y altos niveles de estrés oxidativo en sus células inmunitarias peritoneales. Además, tienen una menor longevidad en comparación con ratones no prematuramente envejecidos (NPAM) de la misma edad cronológica. Sin embargo, en estos animales no se ha estudiado el estrés oxidativo en órganos inmunitarios como el timo y el bazo, ni los cambios, a lo largo de la edad, en el estado redox de dichos órganos. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue estudiar algunos parámetros de estrés oxidativo, tanto oxidantes como antioxidantes. Se utilizaron ratones ICR-CD1 adultos, maduros y viejos ( $28 \pm 2$ ,  $48 \pm 2$ ,  $74 \pm 2$  semanas de edad, respectivamente), previamente clasificados a las  $24 \pm 2$  semanas de edad como PAM y NPAM de acuerdo a su respuesta conductual en el laberinto en T. En homogenizados de timo y bazo de esos animales se analizaron las actividades de varias enzimas, una oxidante, como la xantina oxidasa (XO), y otras antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT). Los resultados muestran que en PAM y NPAM, la actividad XO aumenta con la edad en timo (maduros) y bazo (viejos), mientras que las actividades CAT y SOD disminuyeron significativamente en timo (maduros y viejos). En relación al modelo de envejecimiento, los PAM adultos mostraron una mayor actividad XO en ambos órganos que los NPAM, y una menor actividad SOD y CAT en bazo. Sin embargo, las diferencias entre PAM y NPAM desaparecen en la edad madura y vieja. En conclusión, al envejecer tiene lugar un aumento del estrés oxidativo (balance XO/SOD-CAT) en bazo y timo de PAM y NPAM. Sin embargo, los PAM presentan un mayor estrés oxidativo en sus órganos inmunitarios que los NPAM, siendo muy acentuados en la edad adulta, lo que puede contribuir a la menor longevidad que presentan estos animales en comparación con los NPAM.

Financiación: MICINN (BFU2011-30336), Grupo de investigación UCM (910379ENEROINN), RETICEF (RD12/0043/0018) ISCIII-FEDER (UE).

### **PB-004. DETERIORO FUNCIONAL Y DEL ESTADO REDOX EN LEUCOCITOS DE RATONES VIEJOS CON UN SHOCK ENDOTÓXICO LETAL**

O. Hernández Bolívar y M. de la Fuente

*Universidad Complutense de Madrid.*

El deterioro de la función inmunitaria al envejecer podría explicar la mayor susceptibilidad a las infecciones que aparece en la vejez. Dicho deterioro parece tener como base un estrés oxidativo. En el shock séptico letal los individuos adultos mueren como consecuencia del estrés oxidativo que generan las células inmunitarias, las

cuales experimentan tras la infección cambios funcionales muy parecidos a los mostrados con el envejecimiento. Dado que no se han estudiado los cambios en la funcionalidad y estado redox de los leucocitos de sujetos de edad avanzada con shock endotóxico letal, el objetivo del presente trabajo fue comprobar tales cambios en ratones viejos tras la administración de endotoxina bacteriana, en una cantidad que, aunque no fuese letal en adultos sí lo fuera en los viejos. Se emplearon ratones ICR-CD1 hembras viejas (72 semanas de edad) a las que se le inyectó, intraperitonealmente, 25 mg/kg de endotoxina bacteriana (lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*). A las 0, 2 y 24 horas tras la inyección de LPS, se obtuvieron células peritoneales (macrófagos y linfocitos) y se valoraron diferentes parámetros de función inmunitaria (fagocitosis de macrófagos, niveles de anión superóxido intracelular como indicador de capacidad digestiva, respuesta proliferativa de linfocitos a mitógenos (concanavalina A y LPS) y actividad antitumoral NK) y de estado redox (actividad de la enzima antioxidante catalasa (CAT) y niveles de glutatión: GSH). Los resultados muestran que 25 mg/kg de LPS, dosis que causó un 0% de mortalidad en los ratones adultos de esa cepa, origina en los viejos un 100% de letalidad (supervivencia:  $56 \pm 5$  horas tras la administración de LPS). Todas las funciones estudiadas y la actividad CAT disminuyeron significativamente a las 24 h de la inyección de endotoxina. A las 2h sólo la fagocitosis y la actividad de CAT estaban significativamente disminuidas respecto al tiempo 0. Se puede concluir que en la vejez se tiene una mayor susceptibilidad a la infección y que las células inmunitarias muestran un claro deterioro funcional y de estado redox en las horas previas a la muerte del individuo.

Financiación: F.I. Mutua Madrileña, MICINN (BFU2011-30336); Grupo de investigación UCM (910379ENEROINN); RETICEF (RD06/0013/0003).

### **PB-005. EL EJERCICIO ESPONTÁNEO DURANTE 14 MESES MEJORA LA FUNCIONALIDAD PERO NO AFECTA AL ESTRÉS OXIDATIVO EN RATONES C57BL/6J**

R. García Vallés<sup>1</sup>, I. Noguera<sup>1</sup>, H. Pareja Galeano<sup>1</sup>, T. Brioché<sup>2</sup>, M.C. Gómez Cabrera<sup>1</sup> y J. Viña Ribes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Valencia. <sup>2</sup>Universidad Rennes. Francia

**Objetivos:** Determinar el efecto del ejercicio físico espontáneo durante 14 meses en la potencia aeróbica, la fuerza de agarre y el estrés oxidativo en ratones C57BL/6J.

**Métodos:** 144 ratones fueron distribuidos de manera aleatoria en dos grupos: Controles (n = 72) y Ejercicio espontáneo (n = 72). Los roedores se estabularon en jaulas individuales con o sin acceso a la rueda de correr en función al grupo al que pertenecían. Se obtuvieron muestras a los 3 y 17 meses de edad para su análisis posterior y a ambas edades se llevaron a cabo las pruebas funcionales (potencia aeróbica máxima y fuerza de agarre). Se midieron parámetros de estrés oxidativo y enzimas antioxidantes mediante RT-PCR y Western Blotting.

**Resultados:** Los resultados muestran una mejora significativa en la potencia aeróbica máxima y la fuerza de agarre en el grupo ejercicio. Por otro lado, los datos relacionados con el estrés oxidativo y la defensa antioxidante, no muestran diferencias significativas entre ambos grupos ni entre los mismos grupos a lo largo del tiempo.

**Conclusiones:** El ejercicio espontáneo mejora los resultados en las pruebas de rendimiento, mientras que no presenta alteraciones significativas en las pruebas relacionadas con el estrés oxidativo.

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.

#### **PB-006. ESTUDIO DE LA EXUDACIÓN DE AGUA DE 5 PRODUCTOS DESTINADOS A LA HIDRATACIÓN DE PERSONAS CON DISFAGIA**

J. Mestres Lagarriga<sup>1</sup>, G. Navarro Cano<sup>2</sup>, A. Torrent Casellas<sup>1</sup>, N. Barcons Vilardell<sup>3</sup> y G. Camps Padilla<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Silliker Ibérica. Barcelona. <sup>2</sup>Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. <sup>3</sup>Nestlé Health Science. Esplugues de Llobregat.

**Objetivos:** En pacientes con disfagia, la ingesta de líquidos supone un riesgo elevado de aspiración. Las bebidas de textura modificada listas para su consumo juegan un papel primordial en el mantenimiento del estado de hidratación de dichos pacientes y reducen el riesgo de complicaciones graves (neumonía aspirativa). Por ello es importante que conserven la homogeneidad y la textura durante la vida comercial secundaria del producto. El objetivo del presente estudio es evaluar la presencia de agua exudada (sinéresis) de 5 bebidas de textura modificada listas para su consumo, reproduciendo las posibles condiciones ambientales de la práctica clínica.

**Métodos:** Se estudiaron 5 marcas: gelatina Royal®, Reina, Yelli Frut, Resource® Agua Gelificada con y sin azúcar (NestléHealthScience). Se estudió su evolución, desde su emplatado y distribución a las camas hasta su consumo, considerando que el tiempo máximo que transcurre es de 90 minutos y las temperaturas a las que pueden estar expuestas se encuentran entre 5 °C y 35 °C. De cada producto se analizaron 51 unidades, 3 para el control inicial y 12 para cada evaluación (0, 30, 60 y 90 minutos) y por cada temperatura (5,25 y 35 °C). La evaluación consistió en emplatar, sobre una rejilla doble, el producto recubierto con film plástico (para evitar la desecación) y medir la cantidad de agua exudada. Los productos se testaron dentro del periodo indicado para su vida comercial y se verificó que no presentaran defecto alguno.

**Resultados:** En el momento de la extracción del envase, la gelatina Reina presentó 1,1g de agua exudada, mientras que el resto de productos, en este estadio, no presentaron. Tras emplatar, según los tiempos y temperaturas del estudio, Resource® Agua Gelificada con y sin azúcar no presentó agua exudada a lo largo de todo el estudio, mientras que el resto de productos mostraron un incremento significativo ( $p < 0,001$ ) de agua exudada. El producto Reina presentó entre 0,8 g y 2,6 g, Yelli Frut entre 0 g y 97,6 g y la gelatina Royal® entre 0 g y 96,9 g de agua exudada según el momento y la temperatura.

**Conclusiones:** A diferencia del resto de productos estudiados, Resource® Agua Gelificada no presentó líquido exudado, lo que los hace idóneos para su administración en pacientes con disfagia.

#### **PB-007. EL ESTRÉS OXIDATIVO COMO FACTOR PREDICTOR DE LONGEVIDAD. ESTUDIO DE CASOS Y CONTROLES**

A. Belenguer Varea<sup>1</sup>, K. Mohamed<sup>2</sup>, J.A. Avellana Zaragoza<sup>1</sup>, C. Borrás Blasco<sup>2</sup>, P. Sanchis Aguilar<sup>1</sup> y J. Viña Ribes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hospital de la Ribera. Alzira. <sup>2</sup>Universidad de Valencia.

**Objetivos:** Conocer la influencia de los niveles de proteínas oxidadas y malondialdehído (MDA) en la longevidad de sujetos nacidos y residentes en el Departamento de Salud 11 de La Comunidad Valenciana.

**Métodos:** Estudio de casos y controles de base poblacional. Casos: Todos los sujetos identificados en la base de datos poblacional SIP con edad mayor de 97 años nacidos y residentes en el Departamento de Salud 11 de La Comunidad Valenciana. Controles: Sujetos de la misma base poblacional que los casos y edades comprendidas entre los 70 y 80 años, seleccionados al azar. De todos se obtuvieron muestras para determinaciones de proteínas oxidadas, MDA, genéticas y analíticas, se les realizó la historia clínica, valoración geriátrica exhaustiva así como diversas pruebas funcionales. Los datos se introdujeron en una base de datos de Access v.2007 y fueron analizados con SPSS v19.

**Resultados:** La muestra se compone de 59 pacientes, 28 con edades entre 98 y 107 años (media 100,7 DE 2,4) y 31 entre 70 y 80 (media

75,8 DE 2,1). La media de proteínas oxidadas (u.a.) es de 76,5 en los controles y de 64,3 en los casos ( $p = 0,002$ ), la media de MDA ( $\mu\text{M}$ ) es de 1,8 en los controles y de 1,4 en los casos ( $p = 0,005$ ). Los casos tienen una tendencia significativa a situarse en percentiles más bajos tanto de proteínas oxidadas como de MDA, de manera que la OR de ser caso con valores en el primer cuartil se multiplica por 3,8 ( $p 0,04$ ) y por 5,7 ( $p 0,03$ ) respectivamente.

**Conclusiones:** En nuestro estudio tener niveles bajos de proteínas oxidadas y MDA es un factor favorecedor de longevidad extrema, vivir 98 o más años.

#### **PB-008. PREVENCIÓN DE LA SARCOPENIA MEDIANTE TERAPIA DE REPOSICIÓN CON HORMONA DE CRECIMIENTO EN RATAS VIEJAS**

M.C. Gómez-Cabrera<sup>1</sup>, T. Brioché<sup>2</sup>, H. Cabo<sup>1</sup>, A. Salvador-Pascual<sup>1</sup>, J.A. Tresguerres<sup>3</sup> y J. Viña<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fundación Investigación Hospital Clínico Universitario/INCLIVA.

<sup>2</sup>Departamento de fisiología. Universidad de Valencia. <sup>3</sup>Laboratory "Movement Sport and Health Sciences". University Rennes. Francia.

<sup>3</sup>Universidad Complutense de Madrid.

**Objetivos:** El objetivo de nuestro estudio fue determinar si un tratamiento con hormona de crecimiento (GH), a dosis fisiológicas, puede prevenir las alteraciones inducidas por el envejecimiento en el músculo esquelético de ratas viejas. Los mecanismos que regulan la pérdida de masa muscular debida al envejecimiento no están bien definidos pero implican una alteración del eje GH/IGF-1, de la biogénesis mitocondrial y la miogénesis. Estas dos últimas están influidas por el estrés oxidativo.

**Métodos:** Ratas jóvenes y viejas fueron divididas en tres grupos experimentales: joven control (JC, sin tratar), viejo control (VC, tratadas con vehículo), y viejo tratado con GH (VGH). Los animales tratados fueron suplementados con GH con el objetivo de obtener valores hormonales similares a los jóvenes. Después del tratamiento se analizaron, en el músculo gastrocnemio, la mitocondriogénesis, la miogénesis y parámetros de estrés oxidativo (defensas y daño).

**Resultados:** El envejecimiento supuso una disminución en la vía mitocondriogénica (PGC-1 $\alpha$ , citocromo C y citrato sintasa) y en factores implicados en la síntesis de proteínas (Myf5 y P70SK6) en el músculo esquelético. Estas modificaciones fueron acompañadas de un aumento en la expresión de enzimas proteolíticas (Murf-1 y Mafbx) y de inhibidores de la proliferación de las células satélite (miostatina y p21). Las defensas antioxidantes disminuyeron y el daño oxidativo aumentó como consecuencia del envejecimiento. El tratamiento con GH revirtió el efecto del envejecimiento en los parámetros descritos.

**Conclusiones:** Nuestros resultados muestran que la GH actúa de dos maneras: como un antioxidante (promueve la expresión de enzimas antioxidantes) y activando la miogénesis. El tratamiento con dosis bajas de GH previene la sarcopenia en animales de experimentación.

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.

#### **PB-009. DETERMINACIÓN DE BIOMARCADORES EN EL DETERIORO COGNITIVO LIGERO Y EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

E. Giraldo Reboloso, A. Lloret, M.C. Badia, T. Fuchsberger, D. Alonso y J. Viña

Universidad de Valencia.

**Objetivos:** La enfermedad de Alzheimer (EA), es la demencia más común dentro de las demencias primarias, y conlleva gastos socio-



sanitarios muy elevados. La incidencia de esta enfermedad es enormemente alta debido principalmente al envejecimiento de la población y encontrar marcadores precoces de la enfermedad se ha convertido en un problema de vital importancia para la comunidad científica. El objetivo de nuestro estudio es identificar marcadores periféricos de deterioro cognitivo ligero (DCL) y EA en sangre y líquido cefalorraquídeo (LCR).

**Métodos:** Recientemente, se ha incluido dentro de los nuevos criterios de diagnóstico de la EA la determinación de los niveles de A $\beta$ -42, total tau y p-tau en LCR. Se reclutaron 10 personas sanas (controles), 10 pacientes diagnosticados de DCL y 10 pacientes diagnosticados con EA. Se extrajo LCR mediante punción lumbar y sangre venosa para la obtención de suero y plasma. Se determinaron los niveles de A $\beta$ -42, tau total y p-tau en líquido cefalorraquídeo y en plasma. Con el fin de identificar posibles marcadores, se realizó un análisis proteómico de las muestras de LCR y suero.

**Resultados:** Los pacientes diagnosticados con DCL o AD presentaron menores niveles en LCR de A $\beta$ -42, y mayores niveles de tau total y p-tau. Además el análisis proteómico identificó diferencias significativas entre los 3 grupos en 6 proteínas de LCR y en más de 10 en suero.

**Conclusiones:** La determinación de los niveles de A $\beta$ -42, total tau y p-tau en LCR correlaciona con el diagnóstico clínico de los pacientes. Correlacionar las proteínas identificadas con los niveles de A $\beta$ -42, tau total y p-tau, así como con otros parámetros como el genotipo para la ApoE podría ser útil para proponerlos como marcadores.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido apoyado por las becas SAF2010-19498, Juan de la Cierva 2010, ISCIII2006-RED13-027, PROMETEO2010/074, 35NEURO GentxGent y financiado por UE COSTB35 y CM1001. Este trabajo ha sido cofinanciado por fondos FEDER de la Unión Europea.

#### **PB-010. ESTRÉS REDUCTIVO EN SUJETOS JÓVENES CON RIESGO DE SUFRIR ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

M.C. Badia, A. Lloret, E. Giraldo, T. Fuchsberger, D. Alonso y J. Viña  
*Universidad de Valencia.*

**Objetivos:** El estrés oxidativo se ha involucrado en la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer (EA), aunque no ha sido estudiado en sujetos jóvenes y sanos con riesgo de sufrir EA. Ser portador del alelo 4 de la apolipoproteína E (ApoE) es el mayor factor de riesgo genético conocido para esta enfermedad. Nuestro objetivo es estudiar el estatus oxidativo en sujetos jóvenes en riesgo de sufrir EA (ApoE 4) y contrastarlo con lo que ocurre en sujetos con demencia tipo Alzheimer.

**Métodos:** Seleccionamos 54 sujetos jóvenes y sanos, 33 ApoE 3/4 o 4/4 y 21 3/3. Seleccionamos 58 pacientes con EA y 25 controles de similar edad sin demencia. Determinamos el genotipo ApoE y expresión de enzimas antioxidantes por PCR, p38 fosforilada por Western blotting, niveles de glutatión mediante HPLC.

**Resultados:** Encontramos menor cantidad de glutatión oxidado en sujetos jóvenes con al menos un alelo 4 de la ApoE (6,02 vs 12,3 nmol/ml,  $p < 0,05$ ), mayor expresión de enzimas de síntesis de glutatión (GCLC 2,2 expresión relativa respecto a control; GCLM 2,1 expresión relativa respecto a control,  $p < 0,05$ ) y glutatión peroxidasa (1,4 expresión relativa respecto a control,  $p < 0,05$ ) y menor cantidad de p38 fosforilada (0,38 vs 0,77 P-p38/p38,  $p < 0,05$ ). Los sujetos con EA presentan mayor cantidad de glutatión oxidado (51,1 vs 28,02 nmol/ml,  $p < 0,05$ ) y menor expresión de enzimas de síntesis de glutatión (GCLC 0,4 expresión relativa respecto a control; GCLM 0,6 expresión relativa respecto a control,  $p < 0,05$ ), así como mayor cantidad de p38 fosforilada (2,4 vs 1,5 P-p38/p38,  $p < 0,05$ ).

**Conclusiones:** Las personas jóvenes y sanas, portadoras de al menos un alelo 4 de la ApoE presentan estrés reductivo, es decir, menor glutatión oxidado y p38 fosforilada, mayor expresión de enzimas

antioxidantes como glutamil cistienil ligasa y glutatión peroxidasa. Por el contrario, sujetos con EA la situación se revierte y se produce estrés oxidativo, probablemente debido a la extenuación de mecanismos antioxidantes compensatorios. Existen eventos precoces en la progresión de la EA que pueden servirnos como biomarcadores en estadios muy precoces.

#### **PB-011. PAPEL DE LA CALCINEURINA EN INMUNIDAD Y APOPTOSIS EN RATONES KO DE RCAN**

E. Cuenca, E. Giraldo, T. Fuchsberger, M.C. Badía, A. Lloret y J. Viña  
*Universidad de Valencia.*

**Objetivos:** RCAN es una proteína reguladora de la actividad calcineurina (CaN), fosfatasa importante en procesos inmunológicos, de apoptosis y de respuesta a estrés oxidativo, entre otros. Sin embargo, la relación entre RCAN y CaN no está clara. Nos planteamos estudiar en ratones KO de RCAN las consecuencias de la pérdida de su regulación y así dilucidar la interacción entre ambas proteínas ante un estrés oxidativo agudo.

**Métodos:** Se estudió la respuesta a estrés inducido por inyección de Paraquat, incubación con Ab y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en ratones KO de RCAN y wild type (WT). Se realizaron análisis de los niveles de GSSG en sangre, MDA en plasma, expresión de enzimas antioxidantes. En mitocondrias aisladas medimos salida de citocromo C y niveles de proteína BAD. Así mismo, estudiamos el sistema inmune en ambos ratones en condiciones basales por medio de fagocitosis inducida por látex y medición de la capacidad microbicida por NBT.

**Resultados:** Los resultados obtenidos indican que los ratones KO de RCAN presentan una mayor resistencia a estrés oxidativo, ya que los niveles de GSSG y MDA son más bajos que en los WT. Sin embargo, tienen un mayor grado de apoptosis sistémica, mayor concentración de citocromo citosólico y más niveles de BAD. Su sistema inmune es más activo, ya que la fagocitosis es más activa y más capacidad microbicida.

**Conclusiones:** La inhibición crónica de RCAN da lugar a ratones más resistentes a estrés oxidativo, con más apoptosis sistémica y mejor respuesta inmune.

**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.

#### **PB-012 EL PÉPTIDO A $\beta$ CAUSA PÉRDIDA DE LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR APC/C-CDH1 Y LA ACUMULACIÓN DE GLUTAMINASA EN NEURONAS. POSIBLE EXPLICACIÓN DE LA EXCITOTOXICIDAD**

T. Fuchsberger, E. Giraldo, E. Cuenca, M.C. Badía, A. Lloret y J. Viña  
*Universidad de Valencia.*

**Objetivos:** El llamado complejo promotor de la anaphase APC/C, es una E3 ubiquitina ligasa que se activa gracias a su unión con cdh1. Sabemos que este complejo está implicado en la regulación de mecanismos esenciales en las neuronas. En algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, se ha demostrado que se acumulan proteínas diana de este complejo APC/C-Cdh1 presumiblemente por encontrarse inactivado. Los objetivos de nuestro trabajo son investigar el efecto de A $\beta$  y glutamato sobre la actividad ubiquitina ligasa de APC/C-Cdh1 y la degradación de algunas de sus proteínas diana.

**Métodos:** Usamos cultivos primarios de neuronas fetales de rata Wistar tratados con A $\beta$ , glutamato, siRNA de cdh1. Analizamos la expresión proteica por western blotting y microscopía de fluorescencia de varias proteínas involucradas en la vía de señalización de APC/

C-Cdh1. Así mismo, medimos la concentración de glutamato por un método espectrofotométrico.

**Resultados:** Hemos identificado a la glutaminasa (gls) como una diana importante de degradación de APC/C-Cdh1 en neuronas en cultivo. Cuando cdh1 disminuye tras el tratamiento con A $\beta$ , la gls se acumula al igual que la ciclina B1, proteína importante en la vía de toxicidad implicada en la enfermedad de Alzheimer (AD). Así mismo, hemos comprobado un aumento en los niveles de glutamato extracelulares que se corresponden con un aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular, debido al tratamiento con A $\beta$ . Este aumento se previene con un inhibidor de la gls. Además, el aumento de glutamato coincide con la disminución en los niveles de cdh1.

**Conclusiones:** Nuestros resultados nos han llevado a proponer un nuevo mecanismo de toxicidad del Ab en neuronas en cultivo. Las neuronas entran en un lazo de retroalimentación de producción de glutamato debido a la pérdida de señalización de APC/C-Cdh1. Por tanto, nos encontramos ante un Nuevo mecanismo de citotoxicidad neuronal que puede ser muy relevante para el desarrollo de AD.

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, FRAIOMIC-HEALTH.2012.2.1.1-2 y fondos FEDER de la Unión Europea.

#### **PB-013. LA REPOSICIÓN CON ESTRÓGENOS INDUCE LA EXPRESIÓN DE GENES ANTIOXIDANTES Y DE LONGEVIDAD EN MUJERES CON MENOPAUSIA INDUCIDA**

M. Inglés de la Torre<sup>1</sup>, K. Mohamed Abdelaziz<sup>1</sup>, A. Pellicer<sup>2</sup>, M. Ferrando<sup>2</sup>, C. Borrás Blasco<sup>1</sup> y J. Viña Ribes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Valencia. <sup>2</sup>Instituto Valenciano de Infertilidad. Valencia.

Estudios previos de nuestro laboratorio demuestran el papel de los estrógenos como inductores de genes de longevidad en roedores. En el presente estudio se pretende estudiar si la terapia de reposición con estrógenos también induce la expresión de genes antioxidantes y de longevidad en mujeres. Para ello contamos con 16 mujeres en edad reproductiva (18-42 años), a las cuales se les indujo una menopausia artificial y posteriormente se les repuso con estrógenos y progesterona. En cada fase (basal, menopausia inducida, estrógenos y progesterona), se realizó una extracción sanguínea, aislándose los linfocitos por centrifugación. Se extrajo el RNA mediante el reactivo TRIZOL® Reagent (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. La determinación de genes, tales como P53, P21, sestrinas (SENS2), manganeso- superóxido dismutasa (MnSOD), glutatión peroxidasa (GPx) y 16s rRNA se llevó a cabo a través de retrotranscripción-amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los niveles en sangre de glutatión reducido (GSH) se determinaron por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), previa derivatización de la muestra. El análisis estadístico de los resultados fue llevado a cabo empleando el paquete estadístico SPSS, en su versión 19.0. Con la menopausia, se produjo una disminución significativa con respecto al estado basal de P21, GPx, 16s rRNA, así como de los niveles en sangre de GSH. Al reponer con estrógenos, se produjo un aumento significativo de P53, P21, GPx, MnSOD, 16s rRNA y GSH. La reposición con progesterona produjo un incremento significativo de SENS2 y P53 con respecto al estado basal. La reposición con estrógenos induce la expresión de genes antioxidantes y de longevidad en mujeres con una menopausia inducida. En este caso, los resultados encontrados previamente en roedores, pueden trasladarse a la especie humana.

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.

#### **PB-014. PAPEL DE IKK- $\alpha$ EN LA ATROFIA DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO CAUSADA POR SUSPENSIÓN DE MIEMBROS POSTERIORES EN RATONES**

B. Ferrando<sup>1</sup>, C. Puchades<sup>1</sup>, H. Cabo<sup>1</sup>, A. Salvador-Pascual<sup>1</sup>, V. Sebastià<sup>2</sup> y J. Viña<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Valencia. <sup>2</sup>Hospital Universitario La Fe. Valencia.

**Objetivos:** El objetivo principal de nuestro estudio fue determinar el papel de la quinasa de I $\kappa$ B $\alpha$  (IKK $\alpha$ ), coordinadora central de las respuestas inflamatorias a través de la activación de NF- $\kappa$ B, en la pérdida de masa muscular por suspensión de miembros posteriores en ratones. NF- $\kappa$ B es un mediador muy importante en las vías de señalización celular sensibles a estrés oxidativo e implicadas en la activación de MuRF-1, una ubiquitín-ligasa responsable de la degradación de proteínas musculares, como MyoD, troponina-I, titina y la cadena pesada de la miosina, a través de la ubiquitinación.

**Métodos:** Se utilizaron ratones hembras y machos (3 meses de edad): 18 *wild-type* (WT) y 26 ratones que carecen de IKK $\alpha$  en el músculo esquelético (mIKK $\alpha$  KO). La mitad de cada grupo, seleccionados aleatoriamente, fueron sometidos a un protocolo de suspensión de miembros posteriores durante 14 días y se compararon el resto de los animales pertenecientes al grupo control. Después de la intervención experimental se extrajeron los músculos sóleos, se pesaron, se fijaron en formaldehído y se incluyeron en bloques de parafina para realizar análisis de histología clásica (tinción de hematoxilina-eosina) y análisis inmuno-histoquímicos, utilizando anticuerpos de la cadena pesada de la miosina.

**Resultados:** La suspensión de miembros inferiores indujo una disminución significativa en el tamaño del área de la sección transversal del músculo sóleo, así como del tamaño de las fibras tipo I, en los ratones WT. Esta disminución fue atenuada en los ratones mIKK $\alpha$  KO. En relación con el grupo control, la suspensión disminuyó el peso de los sóleos, pero la inhibición de la vía de NF- $\kappa$ B no limitó de manera significativa esta disminución.

**Conclusiones:** Nuestros resultados sugieren que la inhibición de IKK $\alpha$ , en el músculo esquelético, evita la disminución del área transversal y de las fibras musculares tipo I, del sóleo, después de un protocolo de suspensión de miembros posteriores. El estudio refuerza la importancia de la vía de señalización celular NF- $\kappa$ B en la atrofia del músculo esquelético.

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, FRAIOMIC-HEALTH.2012.2.1.1-2 y fondos FEDER de la Unión Europea.

#### **PB-015. ESTRÉS OXIDATIVO HEPÁTICO EN RATONES TRANSGÉNICOS PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER APPSWE/PS1DE9**

V. Bonet Costa, C. Mas Bargues, M. Dromant, M. El Alami, J. Gambini Buchón 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. No se puede perder de vista el comportamiento somático en cualquier tipo de enfermedad. Una perturbación del sistema nervioso puede repercutir al resto del cuerpo, a órganos como el hígado. El hígado tiene, entre otras, la función de servir como un agente detoxificante de la sangre, por lo que será muy importante para eliminar restos nocivos que se encuentren en el sistema sanguíneo, como el péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) característico de esta patología neurológica. Por esto, a la hora de un hipotético tratamiento para la EA, es de vital importancia conocer el estado del hígado. Por evidentes razones éticas, un primer paso sería la comprobación en un modelo animal. El modelo elegido es el ratón

doble transgénico para la enfermedad de Alzheimer APPswe/PS1dE9, que desarrolla placas de  $\beta$ 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. Hemos analizado parámetros de estrés oxidativo, como la tasa de producción de peróxido de hidrógeno mitocondrial, oxidación proteica (medida como carbonilación), y lipoperoxidación (medida como malondialdehído). También hemos determinado la concentración de  $\beta$ A40 en sangre. Los resultados muestran cómo en los ratones APP/PS1 con la edad disminuyen los diferentes parámetros de estrés oxidativo en hígado, mientras que la concentración de  $\beta$ A40 en sangre aumenta. Este paradójico resultado puede deberse a que el hígado está detoxificando el  $\beta$ A40 y en este proceso está generando radicales libres. Esta capacidad de degradación disminuiría progresivamente con la edad, lo que explicaría por qué hay menos estrés oxidativo y más  $\beta$ A40. En conclusión podemos decir que el estrés oxidativo hepático disminuye con la edad en ratones que simulan la EA. La explicación de este inesperado resultado debe ser estudiada con mayor profundidad.

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.

#### **PB-016. EL CONSUMO DE SOJA AUMENTA LA EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE GENES ANTIOXIDANTES PERO NO LA LONGEVIDAD EN RATONES OF1**

K. Mohamed Abdelaziz, M. Dromant, M. El Alami, V. Bonet Costa, C. Borrás Blasco y J. Viña Ribes  
*Universitat de València.*

**Objetivos:** Estudiar el efecto del consumo de soja sobre parámetros de estrés oxidativo, genes asociados a la longevidad y su efecto sobre la longevidad media y máxima en ratones OF1 macho.

**Métodos:** Realizamos una curva de longevidad ratones OF1 machos. Los dividimos en dos grupos experimentales, 76 alimentados con dieta rica en soja y 81 pobre en soja. Los animales se controlaron diariamente, y se registró su consumo diario de alimento y su peso semanal. Se sacrificaron 5 de cada grupo experimental al 100, 80, 50 y 10% de supervivencia. Determinamos la producción de  $H_2O_2$  por mitocondrias hepáticas mediante fluorimetría y la oxidación proteica mediante el análisis de proteínas carboniladas por western blotting. Respecto a los genes de longevidad la expresión se determinó mediante RT-PCR, los niveles proteicos se determinaron mediante western blotting y la actividad por espectrofotometría.

**Resultados:** El consumo de soja no alarga ni la vida media ni la máxima de los ratones OF1 machos. No encontramos diferencias en la producción de  $H_2O_2$  entre ambos grupos, sin embargo, el grupo sin soja aumentó su producción con la edad. Las proteínas carboniladas aumentaron en ambos grupos con la edad; al 80% fue mayor en grupo control y al 10% fue mayor en grupo soja. En cuanto a los genes de longevidad, la soja aumentó la expresión de ARNm y los niveles de proteínas MnSOD, al 10% de supervivencia. Su actividad enzimática, al 80% fue mayor en los alimentados con soja. La GPx aumentó su expresión de ARNm y niveles de proteínas al 80, 50 y 10% de supervivencia con la soja. Al 10% encontramos mayor actividad enzimática en el grupo soja.

**Conclusiones:** La soja no alarga la vida, sin embargo, induce la sobreexpresión de genes asociados a la longevidad e incrementa su actividad.

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.

#### **PB-017. RESTRICCIÓN DIETÉTICA INDUCIDA POR CONSUMO DE VINO TINTO**

C. Mas Bargues, A. Viña Almunia, M. Inglés de la Torre, V. Bonet Costa, J. Gambini y J. Viña  
*Universidad de Valencia.*

Diversos estudios han demostrado que la restricción calórica alarga la vida en una amplia variedad de animales, incluida la mosca *Drosophila melanogaster*. El objetivo es determinar si las propiedades organolépticas del vino tinto influyen en la ingesta de alimentos en la mosca *Drosophila melanogaster*. Las moscas se dividieron en 5 grupos alimentados con papilla estándar para los controles y: papilla con vino al 10% (v/v), papilla con etOH correspondiente al vino 10%, papilla con vino al 5% (v/v), papilla con etOH correspondiente al vino 5%. Para determinar la cantidad de alimento ingerido se le añadió a la papilla azul de erio-glucina, un compuesto que se acumula en el abdomen de la mosca y que tiene un pico de absorción a 625 nm de longitud de onda. Los grupos estaban compuestos por 4 viales con 25 moscas cada uno y mantenidas durante 24, 36 y 48 horas. Tras este tiempo, las moscas se homogenaron en grupos de 25 individuos, se centrifugaron a 15.000 g durante 15 minutos y se analizó la absorbancia del sobrenadante en el espectrofotómetro a  $\lambda = 625$  nm. Los resultados mostraron: 1. Cuando la papilla contiene vino al 10%, las moscas consumen 2,8 veces menos que los controles. 2. Cuando se le añade al grupo control la misma cantidad de etOH correspondiente al vino (10%), las moscas consumen la misma cantidad de alimento. 3. Si disminuimos la cantidad de vino añadido a la papilla a la mitad (5%), éstas ingieren la misma cantidad de alimento que los controles. La mosca *Drosophila melanogaster* ingiere menos cantidad de alimento cuando éste contiene un aditivo como el vino tinto, a dosis moderadas en un humano (10% de calorías en forma de vino tinto). Este menor consumo se debe al etOH. Por lo tanto en las curvas de longevidad realizadas en moscas se debe tener muy en cuenta la ingesta de papilla.

Este trabajo ha sido apoyado por las becas SAF2010-19498, ISCIII2006-RED13-027, ISCIII2012-RED-43-029, PROMETEO2010/074, 35NEURO GentxGent y financiado por UE COSTB35 y CM1001. Este trabajo ha sido cofinanciado por fondos FEDER de la Unión Europea.

#### **PB-018. EFECTO DE LA $PO_2$ SOBRE EL CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN DE CMPD**

C. Mas Bargues, M. El Alami, J. Viña Almunia, K. Mohamed Abdelaziz, C. Borrás y J. Viña  
*Universidad de Valencia.*

**Introducción y objetivos:** Aunque la presión parcial de oxígeno ambiental (21% de  $O_2$ ) es ampliamente utilizada in vitro, la tensión de oxígeno fisiológica es menor (3-6% de  $O_2$ ). Tales condiciones hipoxicas han demostrado favorecer la producción de ERO (especies reactivas del oxígeno), causantes del daño oxidativo. Los objetivos de este estudio tratan de definir los parámetros de proliferación celular a través de la determinación de la adhesión y tasa de proliferación celulares, al igual que medir parámetros de estrés oxidativo mediante peroxidación lipídica.

**Métodos:** Se cultivaron células madre de pulpa dental (CMPD) al 3%  $O_2$ , al 21%  $O_2$  y al 21%  $O_2$  + Trolox 50  $\mu$ M. Se contaron las CMPD adheridas a las 6 horas con cámara Neubauer para determinar la adhesión celular. La proliferación celular fue evaluada tras 6 horas, 1, 2, 3, 5, 7 y 8 días. Medimos los niveles de malondialdehído (MDA) por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) como marcador de peroxidación lipídica. La adhesión y proliferación celulares se evaluaron en 4 experimentos, y la peroxidación lipídica en 3. Cada experimento consta de 3 frascos.

**Resultados:** La adhesión de CMPD cultivadas al 21% ( $1,3 \pm 0,3$  células  $\times 10^5$ ) con respecto del 3%  $O_2$  ( $1,9 \pm 0,3$  células  $\times 10^5$ ) es un 30% menor. A partir del día 2, la proliferación de CMPD al 3%  $O_2$  ( $0,4 \pm 0,1$  células  $\times 10^6$ ) es mayor que al 21%  $O_2$  ( $0,2 \pm 0,1$  células  $\times 10^6$ ). A partir del día 5, el Trolox 50  $\mu$ M reduce esta diferencia: CMPD al 3%  $O_2$  ( $1,8 \pm 0,3$  células



$\times 10^6$ ) y al 21%  $O_2$  + Trolox 50  $\mu M$  ( $1,6 \pm 0,3$  células  $\times 10^6$ ). Los niveles de MDA demuestran que hay diferencias significativas ( $p < 0,01$ ) entre la peroxidación lipídica de las CMPD al 3%  $O_2$  ( $1,6 \pm 0,3$  nmol MDA/mg prot.), al 21%  $O_2$  ( $4,1 \pm 2,0$  nmol MDA/mg prot.) y al 21%  $O_2$  + Trolox 50  $\mu M$  ( $1,4 \pm 0,3$  nmol MDA/mg prot.) a los 7 días de cultivo.

**Conclusiones:** El estrés oxidativo juega un papel importante en la proliferación de la cmpd en la condición ambiental de oxígeno frente a la fisiológica.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido apoyado por las becas SAF2010-19498, ISCIII2006-RED13-027, PROMETEO2010/074, 35NEURO GentxGent y financiado por UE COSTB35 y CM1001. Este trabajo ha sido cofinanciado por fondos FEDER de la Unión Europea.

#### **PB-019. DETERMINACIÓN DEL COCIENTE GSSG/GSH CON UN MÉTODO DE ALTO RENDIMIENTO**

M. Dromant, H. Cabo, K. Mohamed Abdelaziz, M. Inglés de la Torre, C. Borrás y J. Viña  
*Universidad de Valencia.*

**Introducción:** El glutatión reducido es el principal antioxidante de la célula. En tejidos sanos más del 90% del glutatión total está en forma reducida (GSH) y menos del 10% en forma de glutatión oxidado (GSSG), así que un aumento del ratio GSSG/GSH puede correlacionarse con múltiples parámetros de salud y envejecimiento.

**Objetivos:** Puesta a punto de un método enzimático de alto rendimiento para la determinación de GSSG/GSH.

**Métodos:** Se determinó GSSG/GSH en sangre e hígado de ratas Wistar. La sangre para la medición de GSH se recogió en tubos con EDTA e inmediatamente fue trasvasada a una solución con PCA 12% BPDS 2 mM. Para el GSSG la solución contenía además N-etilmaleimida 40 mM (NEM) para evitar la autooxidación del GSH. Los homogenados de hígado se recogieron en PCA 6% BPDS 1 mM para medir GSH y en PCA 6% BPDS 1 mM NEM 20 mM para medir GSSG. Tras centrifugar a 15.000 g durante 15 minutos a 4 °C, se recogió el sobrenadante. El GSH se determinó mediante la reacción de la glutatión transferasa, usando tampón Kpi 0,2M, EDTA 2 mM pH7 y clorodinitrobenzenceno, que en presencia de la enzima, reacciona con el grupo tiol del GSH y produce un cromóforo que absorbe a 340 nm. El GSSG se determinó previa neutralización con KOH 3 M CHES 0,3 M mediante la reacción de la glutatión reductasa, usando Kpi 0,2 M EDTA 2 mM y NADPH 3,6 mM que en presencia de la enzima reacciona con el GSSG disminuyendo los niveles de NADPH (lo que medimos a 340 nm).

**Resultados:** En homogenados de hígado obtuvimos un ratio de 2,4 mientras que en sangre ( $n = 4$ ) el valor medio fue  $1,4 \pm 0,7$ .

**Conclusiones:** El empleo de NEM impide la autooxidación del GSH sin interferir en la actividad de la glutatión transferasa ni de la reductasa. Se pueden emplear estos métodos enzimáticos sencillos para determinar de modo fiable y con alto rendimiento el ratio GSSG/GSH en muestras biológicas.

**Agradecimientos:** 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.

#### **PB-020. EL CONSUMO DE VINO TINTO INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE GENES DE LONGEVIDAD EN HUMANOS PERO NO EN DROSOPHILA MELANOGASTER**

J. Gambini Buchón, V. Bonet Costa, M. Inglés de la Torre, C. Mas Bague, M. Dromant Jarque y J. Viña Ribes  
*Universidad de Valencia.*

**Introducción:** El consumo moderado de vino tinto ha demostrado tener beneficios sobre la salud en humanos.

**Objetivos:** Determinar si el consumo moderado de vino tinto afecta a la expresión de genes relacionados con la longevidad en humanos y en *Drosophila melanogaster*.

**Métodos:** Para llevar a cabo el estudio se contó con 9 mujeres de diferentes edades (entre 35 y 65 años) pertenecientes a 2 comunidades religiosas de monjas de clausura que no consumen vino tinto de forma regular y que llevan una vida relativamente homogénea. A los 9 sujetos de estudio se les extrajo sangre y se aisló las células mononucleares sanguíneas para obtener ARN. El cual se usó para determinar la expresión de genes de longevidad. Las muestras sanguíneas se obtuvieron al inicio del estudio y 15 días después del consumo de 2 copas (200 mL aprox.) de vino tinto. Respecto a las moscas, consumieron el vino tinto añadido en la papilla (comida estándar) a un porcentaje del 10% que corresponde en calorías a un consumo aproximado 200 mL en humanos. Las moscas consumieron la papilla control y la de vino tinto durante 10 y 40 días. Después se sacrificaron y se aisló el ARNm para estudiar la expresión mediante RT-PCR. Tanto en moscas como en humanos se determinó la expresión de catalasa, p53 y Mn-SOD.

**Resultados:** El chip en humanos mostró un incremento significativo, después del consumo moderado de vino tinto, en la expresión de 3 genes relacionados con la longevidad catalasa, Mn-SOD, sirtuinas y p53. Sin embargo, estos mismos genes disminuyeron en moscas.

**Conclusiones:** El consumo moderado de vino tinto puede afectar de forma diferente en humanos y en moscas.

This work was supported by grants SAF2010-19498, from the Spanish Ministry of Education and Science (MEC); ISCIII2006-RED13-027 and ISCIII2012-RED-43-029 from the "Red Temática de investigación cooperativa en envejecimiento y fragilidad" (RETICEF), PROMETEO2010/074 from "Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana", 35NEURO GentxGent from "Fundació Gent Per Gent de la Comunitat Valenciana" and EU Funded CM1001 and FRAIOMIC-HEALTH.2012.2.1.1-2. This study has been co-financed by FEDER funds from the European Union.

#### **PB-021. FRAGILIDAD EN EL ANCIANO: UNA NUEVA APROXIMACIÓN BIOQUÍMICA**

M. Dromant, M. Inglés de la Torre, V. Bonet Costa, K. Mohamed Abdelaziz, C. Mas Bagues y J. Viña  
*Universidad de Valencia.*

Desde una aproximación bioquímica, la búsqueda de biomarcadores de fragilidad, que permitan la detección precoz del paciente frágil y su posible tratamiento se ha convertido en uno de los objetivos primordiales de la comunidad científica geriátrica. En el presente estudio, se pretende encontrar posibles biomarcadores de fragilidad en plasma relacionados con daño oxidativo (malondialdehído o MDA y carbonilación proteica) y con deterioro cognitivo (factor neurotrófico derivado del cerebro o BDNF), así como su posible relación con la edad o el sexo del sujeto. En 150 pacientes (de 65 a 95 años de edad), clasificados como frágiles (50), prefrágiles (50) y no frágiles (50), según los criterios de Fried, medimos los niveles de malondialdehído (MDA), carbonilación de proteínas y BDNF en plasma. El MDA fue medido por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), la carbonilación de proteínas mediante western blotting con el kit "OxyBlot™ Protein Oxidation Detection kit", y el BDNF mediante el "BDNF Sandwich ELISA Kit", de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El análisis estadístico de los resultados fue llevado a cabo empleando el paquete estadístico SPSS, en su versión 19.0. Los sujetos frágiles mostraron niveles de MDA y proteínas oxidadas significativamente superiores a los no frágiles. Con respecto a los niveles de BDNF en plasma, éstos fueron significativamente inferiores en los individuos frágiles, en comparación con los no frágiles. No se encontró correlación alguna entre ningún parámetro de los mencionados anteriormente y la edad o el sexo del sujeto. Los marcadores de daño oxidativo en plasma MDA y carbonilación proteica, así como el marcador de deterioro cognitivo BDNF, están relacionados con la fragilidad, y no con el sexo ni la edad del sujeto. Tales parámetros pueden ser considerados como

biomarcadores que pueden predecir la condición de fragilidad, en el contexto del análisis multidimensional del paciente geriátrico.

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.

#### **PB-022. LA MOSCA *DROSOPHILA MELANOGASTER* COMO MODELO DE LONGEVIDAD**

J. Gambini Buchón, M. Ahmed El Alami, M. Dromant Jarque, C. Mas Bagues, C. Borrás Blasco y J. Dromant Jarque  
Universidad de Valencia.

**Introducción:** La mosca *Drosophila melanogaster* constituye un modelo de longevidad muy útil en la investigación básica. El manejo, la facilidad de cultivo y la relativa corta supervivencia de sus individuos hacen que este modelo sea ampliamente utilizado, sobre todo en modificaciones genéticas.

**Objetivos:** Estudiar el efecto de manipulaciones nutricionales y farmacológicas en la supervivencia de la *Drosophila melanogaster*.

**Métodos:** Para realizar las curvas de supervivencia utilizamos papilla estándar compuesta por levadura, azúcar, harina, agar, agua, etanol, metilparabén, ácido fosfórico y ácido propiónico; a la cual se le añadió los diferentes compuestos de estudio: Soja, isoflavonas de la soja, etOH y acarbosa. Las moscas fueron cultivadas de modo que se obtuvieran aproximadamente 500 machos por grupo de estudio nacidos en dos días para comenzar las curvas de supervivencia. Una vez iniciada las curvas con las distintas condiciones las moscas se mantuvieron en una cámara de cultivo con un periodo de luz/oscuridad de 12/12 horas y una temperatura estable de 25 °C. Los individuos se agruparon en viales con papilla y 25 machos en cada uno, los viales con el alimento se cambiaron cada 2 días y se contaron los individuos muertos.

**Resultados:** Los resultados obtenidos fueron: 1- las moscas que consumieron soja o las isoflavonas de la soja vivieron significativamente menos que los controles. 2- las moscas que consumieron etOH al 2% (v) experimentaron un incremento en la vida media. 3- las moscas que consumieron acarbosa (inhibidor de la alfa amilasa) vivieron significativamente menos que los grupos controles.

**Conclusiones:** El modelo de curvas de supervivencia, en *Drosophila melanogaster*, constituye una herramienta muy útil para la investigación básica en longevidad. Aunque se debe ser prudente a la hora de extrapolar los resultados en humanos.

This work was supported by grants SAF2010-19498, from the Spanish Ministry of Education and Science (MEC); ISCIII2006-RED13-027 and ISCIII2012-RED-43-029 from the "Red Temática de investigación cooperativa en envejecimiento y fragilidad" (RETICEF), PROMETEO2010/074 from "Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana", 35NEURO GentxGent from "Fundació Gent Per Gent de la Comunitat Valenciana" and EU Funded CM1001 and FRAILOMIC-HEALTH.2012.2.1.1-2. This study has been co-financed by FEDER funds from the European Union.

#### **PB-023. PAPEL DE LA UNIVERSIDAD DE VALENCIA EN LA INICIATIVA EUROPEA FRAILOMIC**

G. Olaso González<sup>1</sup>, D. Monleón Salvador<sup>2</sup>, J. Gambini Buchón<sup>1</sup>, A. Pellín<sup>2</sup>, L. Rodríguez Mañas<sup>3</sup> y J. Viña Ribes<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Universidad de Valencia. <sup>2</sup>INCLIVA. <sup>3</sup>Hospital de Getafe.

Las predicciones demográficas para la Europa del siglo XXI apuntan hacia un modesto incremento de la esperanza de vida pero un aumento considerable de la dependencia en las personas de mayor edad. Las demandas en cuidados específicos derivadas de esta situación tendrán un importante impacto en la sostenibilidad de los costes en el área de la salud. La fragilidad es un síndrome biológico asociado a la edad caracterizado por la disminución de reservas biológicas y de resis-

cia al estrés debida al deterioro de varios sistemas fisiológicos, situando al individuo en una especial situación de riesgo de convertirse en dependiente. La fragilidad es el paso previo a la dependencia. FRAILOMIC es una iniciativa financiada dentro del programa de trabajo HEALTH.2012.2.1.1-2 de la Comisión Europea, que pretende validar la utilidad de los biomarcadores basados en las técnicas "ómicas" para caracterizar el riesgo de fragilidad, su progresión hacia la dependencia y las consecuencias generales para la salud y el bienestar de ciudadanos europeos de edad avanzada. En este proyecto trabajan 20 participantes de distintos países europeos, algunos aportan cohortes establecidas que proporcionan muestras de un total de 51860 participantes mayores de 65 años. El nodo de la Universidad de Valencia, dirigido por el Dr. José Viña, realiza una doble labor dentro de FRAILOMIC: 1. El grupo del Dr. Monleón realiza todas las determinaciones metabolómicas de las muestras de FRAILOMIC. Los productos finales de todos los procesos reguladores del organismo, incluyendo la regulación de la transcripción, de la traducción y de las modificaciones post-traduccionales son moléculas bioquímicas de pequeño tamaño que son, por tanto, los mejores marcadores de los cambios metabólicos en el organismo como consecuencia de los procesos fisiológicos. Estos metabolitos se determinan en las muestras aportadas por las cohortes midiendo su espectro con RMN de alta resolución. 2. Además, el laboratorio del Dr. Viña realiza el análisis de varios parámetros de estrés oxidativo, cuya relación con la fragilidad ha sido previamente establecida, con la finalidad de validar los resultados obtenidos con las técnicas "ómicas". Concretamente el nodo de Valencia analiza la peroxidación lipídica a través de la medida de isoprostanos y MDA.

#### **PB-024. ESTRÉS OXIDATIVO Y DISMINUCIÓN DE LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN FIBROBLASTOS HUMANOS DE PACIENTES CON SÍNDROME DE WERNER Y SÍNDROME ATÍPICO DE WERNER**

M. Seco-Cervera<sup>1</sup>, J.S. Ibáñez-Cabellos<sup>2</sup>, M. Spis<sup>3</sup>, I. Esmoris<sup>4</sup>, A. Velázquez-Ledesma<sup>3</sup> y F.V. Pallardó<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (Ciberer). <sup>2</sup>Sistemas Genómicos. <sup>3</sup>Facultad de Medicina. Universidad de Valencia. <sup>4</sup>Fundación Incliva-Hospital Clínico de Valencia.

El síndrome de Werner (SW) (ORPHA902, OMIM277700) y el síndrome atípico de Werner (SAW) (ORPHA79474) son enfermedades raras hereditarias generalmente conocidas como progerias del adulto. SW es causado por mutaciones en el gen WRN (familia de las ReQ helicases), sin embargo en el caso de SAW las mutaciones se encuentran en el gen LMNA/C que codifica para proteínas estructurales del núcleo. El estrés oxidativo es una marca de envejecimiento, por ello nosotros hemos analizado el perfil de estrés oxidativo y de los sistemas antioxidantes en fibroblastos de 2 pacientes de SW y de 1 paciente de SAW respecto a sus respectivos controles, estudiando si el estrés oxidativo es un evento molecular característico de SW y SAW. El perfil de estrés oxidativo se determinó por el ratio GSSG/GSH (SAW 20,983 ± 2,188 y Control SAW 16,072 ± 0,308; SW 23,782 ± 3,733 y Control SW 12,472 ± 3,484), mientras que la defensa antioxidante se analizó evaluando los niveles de CuZnSOD, MnSOD, Catalasa, Gpx1 y Gpx4 mediante RTqPCR y Western-blot. Nuestros resultados muestran un aumento del ratio GSSG/GSH en fibroblastos de pacientes de SW y SAW, además de bajos niveles de MnSOD. Por último también observamos unos niveles menores de proteína Gpx4 en los fibroblastos procedentes de estos pacientes. A día de hoy no hay un tratamiento específico para estos pacientes, y solo las características clínicas observadas pueden ser tratadas farmacológicamente o mediante hábitos de vida saludable. Por ello, un mapa claro de los mecanismos moleculares y fisiopatológicos que subyacentes en estas enfermedades pueden clarificar la relación entre el envejecimiento prematuro y las mutaciones descritas en estos síndromes. Nuestros resultados indican que el estrés oxidativo es una característica común en los síndromes progeroides SW y SAW y por lo tanto independiente de la mutación original que produce el fenotipo de envejecimiento acelerado.