

tura de la placa aterosclerótica. Nuestro grupo ha demostrado que la MMP-10 (estromelisin-2) se asocia con diferentes marcadores inflamatorios, espesor íntima-media carotídeo y la presencia de placas carotídeas en pacientes con factores de riesgo cardiovascular. En placas ateroscleróticas humanas, la expresión de MMP-10 se detecta en células endoteliales y macrófagos, en asociación con la proteína C reactiva (CRP), indicando que podría ser un factor clave en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, aunque se desconoce su implicación en la EAP.

Objetivo: Analizar los niveles circulantes de MMP-10 en una serie de pacientes con EAP ($n = 107$, edad media 71 ± 11 años) en relación a controles sanos de edad y sexo similares ($n = 109$, edad media 66 ± 7 años).

Metodología: Se determinó MMP-10 circulante con ELISA (R&D Systems), fibrinógeno coagulante (Siemens), y CRP inmunoensayo y se estableció el grado clínico de EAP.

Resultados: La frecuencia de diabetes e hipertensión fue superior en pacientes con EAP en comparación con los sujetos control ($p < 0,01$) y MMP-10 (1.027 ± 800 pg/mL vs 758 ± 321 pg/mL; $p < 0,01$). En un análisis posterior se dividió la población de sujetos con EAP en aquellos que presentaban claudicación intermitente ($n = 61$) o isquemia crítica ($n = 46$) y se observó un aumento gradual y significativo de MMP-10 en relación al estadio de la enfermedad (885 ± 597 pg/ vs. 1.220 ± 989 pg/mL; $p < 0,01$). La MMP-10 se asoció de forma inversa con el índice tobillo brazo como predictor de progresión de enfermedad ($r = -0,28$; $p = 0,020$) y de forma directa con la CRP ($r = 0,20$; $p = 0,045$).

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que la MMP-10 representa un nuevo biomarcador en EAP y que podría estar implicada en su fisiopatología. Además, la MMP-10 puede constituir una nueva diana terapéutica, susceptible de modulación farmacológica, en pacientes con enfermedad arterial periférica.

Palabras clave: Metaloproteasas. Enfermedad arterial periférica. Inflamación. Arteriosclerosis.

2B-06. EL PAPEL DE LA ISOFORMA A DEL RECEPTOR DE LA INSULINA EN LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR

A. Gómez-Hernández, L. Perdomo, O. Escribano, Y.F. Otero, G. García-Gómez, S. Fernández y M. Benito

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Facultad de Farmacia. CIBERDEM. Universidad Complutense de Madrid.

Introducción: El papel de ambas isoformas del receptor de la insulina (IR) ha sido estudiado en otros tejidos dianas de la insulina, como el hígado y el páncreas. Sin embargo, poco es conocido sobre el papel diferencial de las isoformas del IR en la arteria aorta y su participación en el daño macrovascular.

Objetivo: Estudiar el papel de las isoformas del receptor de la insulina (IRA e IRB) en la proliferación de las células de músculo liso vascular (VSMCs) implicado en el crecimiento de la placa aterosclerótica.

Metodología: En primer lugar, se generaron cinco nuevas líneas celulares de VSMCs: con IR (WT VSMCs y IRLoxP+/+ VSMCs), sin IR (IR-/VSMC) o que expresen la isoforma A del IR (IRA VSMC) o la isoforma B del IR (IRB VSMC). Además, se estudió el perfil de expresión de las dos isoformas del IR en dos modelos experimentales con alteraciones vasculares. El primero de ellos, fue un modelo de aterosclerosis como es el ratón ApoE-/- sometido a la dieta western durante 18 semanas. El segundo modelo experimental empleado fue el ratón carente del IR en el tejido adiposo marrón (BATIRKO), que a las 52 semanas, presenta resistencia y disfunción vascular.

Resultados: La insulina y estímulos proaterogénicos como TNF- α , Ang II, ET-1 y el análogo del TXA2, U44619 indujeron un aumento significativo del ratio IRA/IRB en IRLoxP+/+ VSMCs. Además, la insulina, principalmente a través de la vía ERK, y los distintos estímulos proa-

Fisiopatología, biología celular y molecular

1B-08. MMP-10: UN NUEVO BIOMARCADOR EN ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA

J.A. Iriarte Ezkurdia¹, M. Vacas Rius¹, Y. Sáez Meabe¹, M. Santos Gutiérrez¹, J.P. Sáez de Lafuente Chivite², J.D. Sagastagoitia Gorostiza³ y E. Molinero de Miguel³

¹FIDEC. ²Escuela de Enfermería UPV/EHU. ³Hospital de Basurto. Bilbao.

Introducción: La enfermedad arterial periférica (EAP) es una causa importante de morbilidad y mortalidad cardiovascular de naturaleza aterosclerótica. Las metaloproteasas (MMPs) degradan proteínas de la matriz extracelular y participan activamente en el desarrollo y rup-

terogénicos estudiados, a través de ERK y p38, indujeron una mayor proliferación en IRA VSMCs que en IRB VSMCs. Aunque la expresión de los receptores de Ang II (AT-1), ET-1 (ET-A) y U46619 (TP) fue ligeramente superior en IRA que IRB VSMCs, se observó una significativa asociación basal entre la IRA y todos los receptores estudiados. Además, TNF- α indujo una mayor asociación entre la IRA, pero no la IRB, y el TNF-R1. Además, se comprobó que había un aumento significativo de la expresión de la IRA en la arteria aorta tanto del ratón ApoE-/- como del ratón BATIRKO. Este incremento se correlacionaba significativamente con la expresión de distintos marcadores proaterogénicos. Finalmente, el tratamiento con anti-TNF- α durante 6 semanas en BATIRKO a las 52 semanas redujo la expresión de la IRA y de dichos marcadores proaterogénicos.

Conclusiones: Nuestros datos sugieren que la IRA a diferencia de la IRB, confiere una ventaja proliferativa a las VSMCs, pudiendo contribuir al crecimiento de la placa en el proceso aterogénico.

Palabras clave: Isoformas del receptor de insulina. Proliferación. Células de músculo liso vascular.

2B-07. LA INTERACCION TWEAK-FN14 INCREMENTA LA EXPRESIÓN Y SECRECIÓN DE HMGB1 EN PLACAS ATROSCLERÓTICAS HUMANAS Y MONOCITOS EN CULTIVO

J.A. Moreno¹, C. Sastre¹, J. Madrigal-Matute¹, B. Muñoz-García¹, L.C. Burkly², J. Egido¹, J.L. Martín-Ventura¹ y L.M. Blanco-Colio¹

¹Laboratorio de Patología Vascular. IIS-Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

²Biogen IDEC. Cambridge. Massachusetts. EE.UU.

Introducción: High-mobility group box 1 (HMGB1) es una citoquina de unión a ADN que se expresa en macrófagos y contribuye a la progresión de la lesión aterosclerótica, incrementando la respuesta inflamatoria. Recientemente, se ha sugerido que diversas citoquinas pro-inflamatorias podrían regular la expresión de HMGB1 en monocitos.

Objetivo: Analizar el efecto de TWEAK (tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis) sobre la expresión de HMGB1 tanto in vivo como in vitro.

Metodología: Utilizamos la línea de monocitos THP-1 para los experimentos in vitro. Para estudiar el papel de la interacción TWEAK-HMGB1 in vivo, analizamos el efecto de la inyección sistémica de TWEAK (10 mg/kg/día), anticuerpo neutralizante anti-TWEAK (1.000 mg/kg/día), inmunoglobulina G no específica (1.000 mg/kg/día) o salino (controles), a ratones ApoE-/- alimentados con una dieta hiperlipidémica durante 10 semanas, a los que inyectamos diariamente los anteriores compuestos durante 9 días.

Resultados: La expresión de TWEAK, así como la de su receptor Fn14, se correlacionaban positivamente con la expresión de HMGB1 en 25 placas ateroscleróticas de carótidas humanas ($r = 0,526$, $p = 0,034$; $r = 0,616$, $p < 0,001$; respectivamente). En monocitos cultivados, TWEAK aumentaba, de manera dependiente del tiempo y de la dosis, la expresión de HMGB1, así como la secreción de la proteína al medio extracelular. Todos estos efectos fueron inhibidos al añadir anticuerpos bloqueantes para Fn14 o con inhibidores para NF- κ B y PI3K. TWEAK también aumentó la secreción de MCP-1, efecto inhibido mediante el uso de un siRNA para HMGB1. In vivo, TWEAK aumentó la expresión de HMGB1 en el seno aórtico de los ratones ApoE-/- . El bloqueo de TWEAK mediante el uso de un anticuerpo bloqueante disminuyó la expresión de HMGB1 con respecto a los ratones tratados con inmunoglobulina G.

Conclusiones: Nuestros resultados indican que el eje TWEAK-Fn14 puede regular la expresión y secreción de HMGB1 en monocitos/macrófagos. Por tanto, TWEAK-Fn14 podría ser una diana terapéutica para disminuir la respuesta inflamatoria crónica asociada a la progresión de la aterosclerosis.

Palabras clave: Inflamación. Monocitos. TWEAK.

P-077. BIOMARKERS OF FOOD INTAKE AND METABOLITE DIFFERENCES BETWEEN PLASMA AND RED BLOOD CELL MATRICES; A HUMAN METABOLOMIC PROFILE APPROACH

U. Catalán Santos¹, M.A. Rodríguez², M.R. Ras³, A. Macià⁴, R. Mallol², X. Correig², M.J. Motilva⁴ y R. Solà¹

¹Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Departament de Medicina i Cirurgia; ²Servei de Recursos Científics i Tècnics. Metabolomic Platform;

³Servei de Recursos Científics i Tècnics. Unitat Anàlisi Orgànica.

Universitat Rovira i Virgili. Reus. Tarragona. ⁴Departament de Tecnologia dels Aliments. Universitat de Lleida.

Introducción: Biomarker measurements in red blood cells (RBC) could widen the data obtainable from human studies, and are valuable in the metabolomic approach to the analyses of food biomarkers.

Objetivo: We hypothesized that a metabolomic approach to analyses in plasma and RBC can provide complementary information on biomarkers relating food consumption; the overall objective being to improve human nutritional studies for health maintenance and disease prevention in humans. Hence, the aims of the present study are to identify and standardize molecular and nutritional biomarkers in healthy human subjects using plasma and RBC samples obtained from blood collection into different anticoagulant tubes (sodium citrate vs lithium heparin).

Metodología: Fasting blood was drawn from 10 ostensibly healthy individuals, using sodium citrate and lithium heparin as anticoagulants. Both plasma and RBCs were separated into aqueous and lipid fractions to be analyzed using 1D and 2D 1H NMR spectroscopy. Fatty acids were analyzed using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). Polyphenols were extracted from plasma and RBC by micro-elution solid-phase extraction and analyzed by ultra performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS).

Resultados: 1H NMR demonstrated higher aqueous metabolites such as glucose in plasma compared to RBC, while RBC contained higher levels of ADP-ATP, creatine and acetone than plasma. Lipoproteins and their subclasses were higher in plasma than in RBC. The percentages of saturated fatty acids (SFA) 16:0, 17:0, 20:0, 24:0 and polyunsaturated fatty acids (PUFA) 22:6 n-3 (docosahexaenoic acid) and 20:4 n-6 (arachidonic acid) were higher in RBC than in plasma ($p < 0.05$) while SFA 14:0, monounsaturated fatty acids (MUFA) 14:1 n-5, 16:1 n-7, 17:1 n-7 and 18:1 n-9 and PUFA 18:3 n-3, 18:2 n-6, 18:3 n-6 and 20:3 n-6 were higher in plasma than in RBC ($p < 0.05$). Polyphenols differed in plasma from those of RBC. Biomarker concentrations were lower in sodium citrate compared to lithium heparin plasma.

Conclusiones: In conclusion, we have applied a combination of NMR spectroscopy, GC-MS and UPLC-MS/MS to generate metabolomic profiles of several specific molecular and nutritional biomarkers associated with RBC in human subjects. These measurements extend the data obtainable from plasma alone in human studies.

Palabras clave: Erythrocyte. Plasma. 1h NMR spectroscopy. GC-MS. Fatty acid. Metabolomic profile. Polyphenols.

P-080. LA FOSFOLIPASA A2 SEGREGADA ESTÁ ELEVADA EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIH

E. Bernal Morell, I. Marín Marín, M.P. Egea Campoy y J. Fernández Pardo

Hospital Universitario Reina Sofía. Murcia.

Introducción: Los pacientes con infección por VIH tienen un riesgo cardiovascular elevado en comparación con la población general. Las fosfolipasas A2 segregadas (PLA2s, del inglés Secretory phospholipase A2) son un grupo de enzimas que contribuyen a la aterogénesis al hidrolizar los fosfolípidos de lipoproteínas circulantes estimulando su

atrapamiento y la respuesta inflamatoria que sucede en la pared arterial y que están adquiriendo una gran importancia para explicar el desarrollo de la arteriosclerosis y sus complicaciones cardiovasculares. En la actualidad, se desconoce si PLA2s está elevado en los pacientes con infección por VIH o si es un marcador de riesgo cardiovascular. Su elevación podría explicar en parte el exceso de riesgo que tienen estos pacientes y ayudar a dirigir tratamientos futuros.

Objetivo: Determinar si los pacientes con infección por VIH tienen concentraciones de PLA2s más elevadas que un grupo de pacientes control, sin infección por VIH, con similar edad, sexo y riesgo cardiovascular según Framingham.

Metodología: Se incluyeron 71 pacientes con infección por VIH que acudieron de forma consecutiva a la consulta externa de enfermedades infecciosas y fueron comparados con otros 71 pacientes (controles no VIH) que acudieron a las consultas de Medicina interna o Cardiología durante el mismo periodo de seis meses, con similar edad, sexo y riesgo cardiovascular. Se obtuvieron datos clínicos y de laboratorio. El riesgo cardiovascular fue definido de acuerdo con NCEP-ATP III. Se determinaron concentraciones de PLA2s mediante ELISA.

Resultados: Las concentraciones de PLA2s fueron superiores en los pacientes infectados por VIH [mediana y (rango intercuartílico)], 8,35 (5,36, 9,6) vs 1,22 (0,59, 2,62) pg/ml; $p < 0,001$. No encontramos diferencias en las concentraciones de PLA2s entre los pacientes VIH que reciben o no terapia antirretroviral (8,46 [5,55, 9,6] pg/ml vs 6,96 [4,1, 9,5] pg/ml, respectivamente; $p = 0,223$) o entre los que presentaban carga viral ARN-VIH indetectable o no (8,5 [5,25, 9,6] pg/ml vs 7,2 [5,39, 9,59] pg/ml, respectivamente; $p = 0,461$). Aquellos pacientes con concentraciones de PLA2s por encima del percentil 75 (9,6 pg/ml) también tuvieron niveles más bajos de colesterol HDL ($p = 0,02$), y al realizar un análisis multivariante para ver qué factores se asociaban con el cuartil más elevado de PLA2s, el único factor que se asoció de forma independiente fue la concentración de colesterol HDL [odds ratio 0,980 (95% intervalo de confianza, 0,965-0,995; $p = 0,004$).

Conclusiones: Los pacientes infectados por el VIH tienen niveles más altos de PLA2s, y esta elevación puede explicar en parte el exceso de riesgo cardiovascular que tienen estos pacientes y que no es completamente explicado por las alteraciones lipídicas.

Palabras clave: Fosfolipasa a2 segregada. Infección por VIH.

P-092. EL PAPEL PROTECTOR DEL ÁCIDO OLEICO FRENTE A LA ACCIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS EN CÉLULAS AÓRTICAS ENDOTELIALES

L. Perdomo, A. Gómez-Hernández, B. Gozalbo-López, O. Escribano y M. Benito

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Introducción: La resistencia a la insulina o la hiperinsulinemia sostenida son factores de riesgo para la aparición de enfermedad vascular, a los cuales se asocian estados proinflamatorios que aceleran los procesos arterioscleróticos. Por lo que es de vital importancia, estudiar los mecanismos implicados en la activación e inflamación del endotelio vascular, posibles efectos de las citoquinas proinflamatorias y la expresión génica de marcadores de disfunción endotelial, así como los mecanismos que reviertan este proceso inflamatorio.

Objetivo: Estudiar la expresión de marcadores de daño vascular en las células endoteliales en respuesta a citoquinas proinflamatorias y el papel que juega el ácido oleico en la reducción de estas.

Metodología: Para este estudio se utilizaron células de la línea celular SVEC4-10EE-2167 de la ATCC, las cuales fueron estimuladas por IL-6, IL-1 β e TNF- α (10ng/ml) durante 2, 4 y 8 horas. Las células también

fueron incubadas con ácido oleico 1mM durante 18 horas. Se analizó la expresión de ARNm para MCP-1, iNOS, ICAM-1 y UCP-2 por PCR cuantitativa a tiempo real.

Resultados: En primer lugar, se observó que las citoquinas proinflamatorias empleadas indujeron un aumento significativo de marcadores inflamatorios y de activación endotelial, como iNOS, MCP-1 e ICAM-1 en las células endoteliales. Este aumento se redujo significativamente después del tratamiento con ácido oleico. Además, el pretratamiento con estas citoquinas proinflamatorias redujo la expresión génica de la proteína desacoplante 2, UCP-2, que se ha descrito que tiene un papel protector frente a la aterosclerosis.

Conclusiones: Nuestros datos sugieren que el ácido oleico reduce la expresión de algunos de los marcadores de daño endotelial. Esta acción del ácido oleico podría estar mediada por la inducción de UCP-2, quien ejerce un papel protector en situaciones inflamatorias como la disfunción endotelial y el proceso aterosclerótico. El incremento de la expresión de UCP-2 aumentaría la β -oxidación, previniendo la acumulación de lípidos en las células endoteliales y una subsecuente disminución de citoquinas proinflamatorias y finalmente un menor riesgo de disfunción endotelial.

Palabras clave: Ácido oleico. Células endoteliales. Inflamación.

PO-50. INTERACCIÓN DE FABP4 CON PROTEÍNAS DE MEMBRANA EN CÉLULAS ENDOTELIALES

P. Saavedra García, G. Aragonès Bargalló, A. Cabré Llobet, S. Guaita Esteruelas, M. Heras Ibáñez, J. Girona Tell y L. Masana Marín

Unitat de Recerca en Lípids i Arteriosclerosis. Universitat Rovira I Virgili. IISPV. CIBERDEM. Tarragona.

Introducción: La Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4) es una proteína cuya función es el transporte de ácidos grasos en citoplasma de adipocitos y macrófagos. Es secretada a plasma y sus concentraciones circulantes se han asociado a la regulación del metabolismo energético y la inflamación. Niveles altos de FABP4 circulante han sido descritos en personas con obesidad, dislipidemia aterogénica y síndrome metabólico. Estudios recientes muestran una asociación entre FABP4 circulante y disfunción endotelial, aunque se desconoce cómo se produce la interacción entre FABP4 y las células endoteliales.

Objetivo: El objetivo de este trabajo es estudiar la interacción entre FABP4 y las proteínas de la membrana citoplasmática en células endoteliales.

Metodología: Las células HUVEC se incubaron con y sin FABP4 (100 ng/ml) durante 5 minutos. La inmunolocalización de FABP4 se estudió mediante microscopía confocal. Para estudiar las interacciones de FABP4 con las proteínas de membrana de las células HUVECs, se diseñó una estrategia que combina 6XHistidine-tag FABP4 (FABP4-His), incubaciones con o sin FABP4-His (100 ng/ml), cross-linking con formaldehído, extracción de proteínas de membrana y western blot.

Resultados: Los resultados muestran que FABP4 colocaliza con CD31, una proteína utilizada como marcador de membrana citoplasmática. Además se observan diferentes patrones de western blot en función de la incubación con o sin FABP4-His. El inmunoblot revela la existencia de tres complejos proteicos de aproximadamente 108, 77 y 33 KDa formados por FABP4 exógena y su posible receptor/es.

Conclusiones: Los resultados obtenidos apoyan la existencia de un complejo proteico capaz de unir FABP4 a las células endoteliales mediante una unión específica. Además, nos permiten avanzar en el conocimiento de los efectos moleculares de FABP4 y en caso de confirmarse pudieran utilizarse como diana terapéutica para prevenir enfermedades cardiovasculares asociadas con la obesidad y la diabetes.

Palabras clave: FABP4. Membrana celular. Receptor.

PO-51. RELACIÓN ENTRE LA INHIBICIÓN POR PARTE DE LA HDL DE LA GENERACIÓN DE CERAMIDA EN LA LDL ELECTRONEGATIVA Y LA DISMINUCIÓN DE SU EFECTO INFLAMATORIO

M. Estruch Alrich¹, L. Beloki², J.L. Sánchez-Quesada¹, J. Ordóñez-Llanos³ y S. Benítez González¹

¹IIB Sant Pau. Barcelona. ²Universidad Autónoma de Barcelona. ³Hospital Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

Introducción: La LDL electronegativa (LDL(-)) es una fracción minoritaria modificada de la LDL presente en circulación, que difiere de la forma nativa en la inducción de la liberación de citoquinas inflamatorias en monocitos y en una mayor actividad fosfolipasa C (PLC). Ambas acciones son inhibidas por coincubación con la HDL, y pueden estar relacionadas al haberse descrito como los productos de la actividad PLC pueden tener efectos inflamatorios.

Objetivo: Determinar el mecanismo por el que la HDL contrarresta los efectos inflamatorios de la LDL(-), evaluando si la inhibición de la actividad PLC por parte de la HDL disminuye la formación de sus productos y si está relacionado con la liberación de citoquinas.

Metodología: Se incubaron tanto la LDL nativa como la LDL(-), obtenida por cromatografía de intercambio aniónico, en presencia o ausencia de HDL a 4°C o 37°C durante 20 horas. Con parte de la muestra se realizó extracción de lípidos para el estudio de la composición lipídica por cromatografía en capa fina; de la parte restante se determinó la actividad PLC por el método de Amplex Red y la susceptibilidad a la agregación por absorbancia a 450 nm. Por otro lado, se modificó la LDL tanto con PLC como mediante la incubación con liposomas cargados con ceramida, esfingomielinina o diacilglicerol. En estas muestras se determinó la susceptibilidad a agregación y la inducción de citoquinas en monocitos humanos aislados por gradiente de densidad. La incubación con los monocitos tuvo lugar a 37 °C durante 20 horas y se cuantificó la liberación de citoquinas IL6, IL10 y MCP1 en el sobrenadante celular mediante ELISA.

Resultados: La actividad PLC y la formación de sus productos de degradación (ceramida, mono y diacilglicerol) fue mucho mayor cuando la LDL(-) era incubada a 37 °C, reproduciendo la condición de incubación en monocitos, respecto a 4 °C. La incubación de HDL con LDL(-) ejerció, en ésta, inhibición de la actividad PLC y de la formación de productos de degradación, los cuales se transfirieron a la HDL. Para comprobar el papel de cada uno de estos productos en los efectos inflamatorios de la LDL(-), se enriqueció la LDL nativa en ellos. Sólo la LDL enriquecida con ceramida y la tratada in vitro con PLC aumentaron la liberación de citoquinas en el sobrenadante de monocitos en cultivo. También las fracciones de LDL con ceramida, y en menor grado con diacilglicerol, fueron las más susceptibles a agregarse.

Conclusiones: La HDL inhibe la generación de ceramida de la LDL(-) a través de la inhibición de la actividad fosfolipasa C, disminuyendo la agregación de la LDL(-) y su poder inflamatorio.

Palabras clave: LDL electronegativa. HDL. Ceramida. Fosfolipasa C. Monocitos. Liposomas. Agregación.

PO-52. LOS INHIBIDORES DE HISTONAS DEACETILASAS NORMALIZAN LA EXPRESIÓN DE LA FIBULINA-5 EN CÉLULAS VASCULARES

M. Orriols, I. Martí Pàmies, A. Guadall, R. Rodríguez Calvo, O. Calvayrac, J. Martínez-González y C. Rodríguez

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

Introducción: Los inhibidores de histonas deacetilasas (HDACi) podrían ser de interés en el tratamiento de enfermedades vasculares como la aterosclerosis y la reestenosis en base a sus propiedades anti-proliferativas, antitrombóticas y antiinflamatorias. La fibulina-5 (FBLN5) es una proteína elastogénica que participa activamente en el

remodelado vascular y que modula la adhesión, motilidad, proliferación y supervivencia de las células vasculares

Objetivo: Analizar la regulación de la FBLN5 por mediadores inflamatorios en la pared vascular y si esta respuesta puede verse modulada por HDACi.

Metodología: Los estudios se desarrollaron en células musculares lisas de aorta humana (CMLV). El nivel de expresión de FBLN5 se analizó mediante PCR a tiempo real. Los niveles de proteína mediante Western blot e inmunocitoquímica, y la actividad transcripcional mediante estudios de transfección transitoria utilizando construcciones del promotor de la FBLN5 en pGL3. En ratones C57BL/6J se determinó el efecto del lipopolisacárido (LPS, 0,5 mg/Kg, 24 horas) sobre la expresión vascular de la FBLN5.

Resultados: La administración de LPS disminuyó significativamente la expresión de la FBLN5 (hasta un 35%) en la aorta de los ratones. Análogamente, el tratamiento de CMLV humanas con distintos mediadores inflamatorios (TNFalfa, LPS e IL1beta) disminuyó el nivel de ARNm de la FBLN5 de forma dependiente del tiempo de incubación. La máxima inhibición (2 veces) se detectó al cabo de 24 h de tratamiento con dichos estímulos. Paralelamente, se observó una disminución de los niveles de proteína FBLN5 intracelular y una reducción de su secreción al espacio extracelular. Este efecto, se bloqueó en presencia de actinomicina D lo que sugiere la implicación de un mecanismo transcripcional. En efecto, el tratamiento con estímulos inflamatorios disminuyó la actividad transcripcional de la FBLN5. Sin embargo, la reducción en la expresión de FBLN5 no se bloqueó en presencia de inhibidores de vías de transducción de señales habitualmente implicadas en la respuesta inflamatoria, como el partenolide y BAY11-7082 (inhibidores de la vía NF-kappaB) o el NDGA (inhibidor de AP-1). Por el contrario, el pretratamiento con inhibidores de distintas HDACs como la tricostatina A y el MS-275, previno la disminución de la expresión de FBLN5 causada por dichos mediadores inflamatorios.

Conclusiones: La alteración de la expresión de la FBLN5 podría contribuir al desarrollo de patologías vasculares de componente inflamatorio. La normalización de la expresión vascular de la FBLN5 causada por la inhibición de la actividad HDAC podría explicar al menos en parte el efecto beneficioso de estos fármacos observado a nivel vascular.

Palabras clave: Células vasculares. Fibulina-5. Inflamación.

PO-53. CARACTERIZACIÓN DE PLACA ATEROSCLERÓTICA DE ALTO RIESGO: REGULACIÓN POR LDL/UPA-UPAR DEL CITOESQUELETO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS

R. Lugano, E. Peña, L. Badimon y T. Padró

Centro Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC). Ciberobn. IIB-Santpau. Barcelona.

Introducción: El avance de las placas arterioscleróticas comporta cambios en la plasticidad de las células musculares lisas (CML) y su capacidad de modificar la estructura de la placa. Las LDL retenidas en la íntima arterial (agLDL), debido a su unión a la matriz extracelular, son internalizadas por las CML induciendo cambios a nivel de proteínas citoesqueléticas y funciones celulares como adhesión y migración. El sistema uroquinasa (UPA)/UPA-receptor (UPAR) regula la matriz extracelular arteriosclerótica.

Objetivo: Nuestro objetivo ha sido investigar si el UPA con función ligando participa en el efecto de las LDL en la evolución de la placa aterosclerótica.

Metodología: En CML humanas tratadas con/sin agLDL (100 µg/ml) se realizaron ensayos de adhesión celular, en presencia/ausencia de UPA-exógeno (exUPA, 2 µg/ml) o angiotensina-II (1 µM) a fin de estimular la expresión endógena de UPA (endUPA). Se han realizado estudios de expresión por western blot, de sublocalización celular por microscopía confocal y análisis de co-immunoprecipitación con UPA

y UPAR mediante 1D- y 2D- electroforesis y espectrometría de masas MALDI-TOF.

Resultados: Las agLDL inducen una destructuración del citoesqueleto de actina y pérdida de polaridad del UPA. Además, inducen una menor colocalización del UPA con la F-actina en filopodios formados durante el proceso de adhesión celular. Tanto la sobreexpresión de endUPA como la presencia de exUPA revierten los efectos de las agLDL sobre el citoesqueleto de actina, además de aumentar en > 2 veces ($p < 0,01$) la capacidad de adhesión de la CML expuestas a agLDL. El efecto del UPA sobre las fibras de actina y el proceso de adhesión celular dependen de su función como ligando del UPAR. Ensayos de co-immunoprecipitación ponen en evidencia la interacción del UPAR con proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina. Análisis por 2D-electroforesis y western blot demuestran que el UPAR co-immunoprecipita preferentemente con formas no fosforiladas de la cadena reguladora de la miosina (MRLC) en las agLDL-CML y que niveles elevados de UPA aumentan 2-3 veces la presencia de MRLC-fosforilada ($p < 0,01$) en estas células. Por microscopía confocal y western blot se demuestra que el exUPA y la angiotensina-II aumentan significativamente los niveles de la quinasa de adhesión focal fosforilada (pFAK) inhibidos por las agLDL durante la adhesión de las CML.

Conclusiones: El UPA con función ligando regula la dinámica de formación del citoesqueleto y favorece la adhesión de CML cargadas de colesterol. El complejo LDL/UPA-UPAR regula la evolución de las placas ateroscleróticas.

Palabras clave: UPA. LDL. CML vascular. Citoesqueleto.

PO-57. HSP90 INHIBITION BY 17-DMAG ATTENUATES OXIDATIVE STRESS IN EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS

J. Madrigal-Matute, C E. Fernández-García, C. Gómez-Guerrero, O. López-Franco, B. Muñoz-García, J. Egidio, L.M. Blanco-Colio y J L. Martín-Ventura

IIS-Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma. Madrid.

Introducción: Reactive oxygen species (ROS) participate in atherogenesis through different mechanisms including oxidative stress and inflammation. Proteins implicated in both processes, such as Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) and some NADPH oxidase (NOX) subunits are Heat shock protein-90 (HSP90) client proteins.

Objetivo: In this work we investigated the antioxidant properties of the HSP90 inhibitor, 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG) in experimental atherosclerosis.

Metodología: Twelve-week old male ApoE^{-/-} mice were fed on a Western diet [21.2% fat (0.5% cholesterol) + 16.7% proteins] during 11 weeks. After 1 week of feeding, mice were randomized into two groups: 17-DMAG treatment ($n = 11$) and control ($n = 9$). The treated group was i.p. injected with 2 mg/kg of 17-DMAG every 2 days during 10 weeks. Control group consisted on ApoE^{-/-} mice injected with vehicle (saline). Dihydroethidium (DHE) was used to evaluate in situ levels of superoxide. Immunohistochemistry with anti-pERK antibody (mice) and anti-NOX1 and anti-NOX1 (human) was performed in atherosclerotic plaques. Lucigenin-enhanced chemiluminescence assay was used to determine the NADPH-dependent ROS production in monocytes-macrophages and vascular smooth muscle cells. Expression of HSP90, HSP70, NOX-1, NOX1 and CD36 was analyzed by Real time PCR. Protein expression of NOX-1 and NOX1 was assessed by Western blot.

Resultados: Treatment of ApoE^{-/-} mice with 17-DMAG (2 mg/kg every 2 days for 10 weeks) decreased ROS levels and extracellular-signal-regulated kinase (ERK) activation in aortic plaques compared to control animals. Accordingly, treatment of rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) with 17-DMAG increased HSP27 and HSP70 and inhibited ERK activation. Interestingly, 17-DMAG diminished NADPH oxidase-ROS production in VSMCs and monocytes. Besides, a marked

reduction in NADPH oxidase-ROS production was observed by HSP-90siRNA and the opposite pattern by HSP70siRNA. 17-DMAG also diminished the expression of Nox1 and Nox organizer-1 (Noxo1) in VSMCs and monocytes. Interestingly, 17-DMAG was able to modulate ROS-induced monocyte to macrophage differentiation. Finally, higher expression of Nox1 and Noxo1 was found in the inflammatory region of human atherosclerotic plaques, colocalizing with VSMCs, macrophages and ROS producing cells.

Conclusiones: Our results suggest that HSP90 inhibitors interfere with oxidative stress and modulate experimental atherosclerosis development through reduction of pro-oxidative factors.

Palabras clave: Aterosclerosis. Estrés oxidativo.

PO-58. MODULACIÓN TERAPÉUTICA DE LA VÍA JAK/STAT EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ATEROSCLEROSIS ACELERADA POR DIABETES

C. Recio, A. Oguiza, B. Mallavia, I. Lázaro, J. Egidio y C. Gómez-Guerrero

IIS-Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma. Madrid.

Introducción: La vía JAK/STAT está implicada en las acciones proaterogénicas y proinflamatorias de citoquinas, lípidos, angiotensina e hiperglucemia en el vaso y su activación está implicada en diversas patologías, como aterosclerosis, hipertensión y diabetes. Existen diversos mecanismos reguladores de esta vía, entre los que destacan las proteínas supresoras de la señalización por citoquinas (SOCS). Estudios previos del grupo han demostrado que la expresión de proteínas SOCS en las células que componen la lesión aterosclerótica inhibe las respuestas dependientes de JAK/STAT inducidas por estímulos inflamatorios, lo que sugiere su posible aplicación como tratamiento en la aterosclerosis.

Objetivo: Inhibir la activación de la vía JAK/STAT en la aterosclerosis experimental empleando un péptido mimético de la proteína reguladora SOCS1 (miS1).

Metodología: Los efectos in vitro del péptido se analizaron en cultivos murinos de células de músculo liso vascular (CMLV) y monocitos estimulados con citoquinas inflamatorias (IFN γ e IL-6). Para los estudios in vivo empleamos un modelo experimental de aterosclerosis acelerada por diabetes, mediante inducción de diabetes tipo 1 (estrep-tozotocina 125 mg/kg peso i.p. 2 días) en ratones deficientes en apolipoproteína E (apoE^{-/-}). Los animales diabéticos se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos: tratados con péptido mimético miS1 (65 μ g/día, i.p. cada dos días, 8 semanas) y controles (vehículo). Las lesiones aórticas se analizaron mediante histología (tinción oil red/hematoxilina e inmunohistoquímica de macrófagos) y posterior cuantificación. La activación de JAK/STAT se determinó mediante Western blot e inmunofluorescencia. La expresión de genes inflamatorios se analizó por PCR a tiempo real.

Resultados: En CMLV y monocitos estimulados con citoquinas, la preincubación con dosis no citotóxicas del péptido mimético miS1 previno significativamente la activación de STAT1 y STAT3 (% reducción: 40 ± 5 y 34 ± 5 respectivamente), así como su translocación al núcleo. Observamos además una reducción significativa en la expresión de mRNA de las quimiocinas MCP-1 y RANTES, la molécula de adhesión ICAM-1 y la citoquina TNF- α . En el modelo experimental, el tratamiento con miS1 redujo significativamente el tamaño de las lesiones aórticas de los ratones apoE^{-/-} diabéticos (% inhibición vs grupo control: 51 ± 17), así como el contenido de macrófagos en las lesiones (% inhibición: 38 ± 13). Además, observamos una menor expresión génica de MCP-1, RANTES y TNF- α (% inhibición: 90 ± 6 , 80 ± 5 y 77 ± 11 , respectivamente) en el tejido aórtico de los animales tratados.

Conclusiones: Estos resultados sugieren que la supresión de las señales celulares dependientes de JAK/STAT mediante tratamiento con los

péptidos miméticos de SOCS1 podría representar un interesante abordaje terapéutico en el daño vascular.

Palabras clave: Inflamación. Aterosclerosis. Diabetes. JAK/STAT. SOCS.

PO-59. EL CD14 ES EL PRINCIPAL RECEPTOR RESPONSABLE DE LA UNIÓN DE LA LDL ELECTRONEGATIVA EN MONOCITOS HUMANOS

M. Estruch Alrich¹, C. Bancells Bau¹, L. Beloki¹, J.L. Sánchez-Quesada¹, J. Ordóñez-Llanos² y S. Benítez González¹

¹Institut Recerca; ²Servicio de Bioquímica. Hospital de Sant Pau. Barcelona.

Introducción: La LDL electronegativa (LDL(-)) es una fracción minoritaria de la LDL presente en circulación que promueve efectos inflamatorios. La LDL(-) induce la liberación de citoquinas en monocitos a través del complejo del receptor cluster de diferenciación 14 (CD14) y el receptor tipo toll-like 4 (TLR4), y en mucho menor grado de TLR2.

Objetivo: Evaluar si la mediación del efecto inflamatorio de la LDL(-) por parte de TLR4 y CD14 es a través de su implicación en la unión de la partícula a monocitos. Comparar esta unión celular de la LDL(-) con la del lipopolisacárido (LPS), que es un conocido ligando de estos receptores.

Metodología: Se incubaron durante 3 horas, a 4 °C y 37 °C, monocitos humanos con las fracciones de LDL(+) y LDL(-), aisladas por cromatografía de intercambio aniónico, marcadas fluorescentemente. Se comparó la unión de la LDL cuando los monocitos habían sido preincubados con anticuerpos neutralizantes de TLR4, CD14 o TLR2 respecto a cuando no se habían neutralizado los receptores (100% unión). También se evaluó la competición por la unión a monocitos entre una concentración fija de LDL marcada fluorescentemente con concentraciones crecientes de LPS sin marcar. Se estudió la unión de LDL(-) específicamente a CD14, en placas de 96 pocillos recubiertas con CD14, mediante experimentos de desplazamiento con concentraciones crecientes de LPS y de CD14 soluble.

Resultados: La unión de LDL(+) no se inhibió significativamente cuando se bloquearon los receptores de estudio. Sin embargo, en el caso de la LDL(-), tanto en la condición de incubación de 37 °C como en la de 4 °C, antiCD14 fue el anticuerpo que más inhibió la unión de la partícula a monocitos (más del 50-70% inhibición), seguido de antiTLR4 (25-35%) y, de forma mucho más minoritaria, de antiTLR2 (20%). Se evaluó la competencia entre la unión de LDL(-) y LPS mediante estudios de desplazamiento, obteniendo que, en efecto, LPS compite con LDL(-), tanto en su unión a monocitos como a las placas recubiertas con CD14. La adición de CD14 soluble en estos experimentos también desplazó la unión de la LDL(-).

Conclusiones: CD14 es el principal receptor implicado en la unión de LDL(-) en monocitos, en colaboración con TLR4. Existe competencia entre la unión de LDL(-) y LPS pudiendo esto representar un mecanismo anti-inflamatorio de la LDL(-) en casos de infección.

Palabras clave: LDL electronegativa. Monocitos. CD14. TLR4. Unión celular.

PO-60. MECANISMOS MOLECULARES DEL EFECTO DE APOA-IV EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA GENERADA POR LPS EN MACRÓFAGOS HUMANOS

P. Martín-Fuentes, L. Baila-Rueda, A. Aramburu, F. Civeira y A. Cenarro

Laboratorio de Investigación Molecular. Hospital Universitario Miguel Servet. I+D. Zaragoza.

Introducción: La apolipoproteína A-IV (ApoA-IV) es una glicoproteína de 46 kDa descrita hace 25 años como un componente de lipoproteínas ricas en triglicéridos, sintetizada por los enterocitos presentes en

el intestino delgado. Se ha sugerido que ApoA-IV puede poseer propiedades antiinflamatorias ya que inhibe de manera significativa la activación de monocitos por LPS en ratones apoE KO (Recalde et al, 2004), reduce de manera significativa la inflamación producida por sulfato de dextrano en un modelo murino de colitis y ratones apoA-IV KO presentan significativamente mayor respuesta inflamatoria frente al sulfato de dextrano (Vowinkel, 2004). Pese a todas las evidencias que demuestran un papel importante de ApoA-IV en la respuesta inmune, el mecanismo molecular que explique las propiedades antiinflamatorias de ApoA-IV no se conoce. La hipótesis de este trabajo es que el mecanismo molecular responsable de la actividad antiinflamatoria de ApoA-IV frente a LPS en macrófagos humanos tiene lugar a través de una interacción con el receptor Toll-like 4 (TLR4).

Objetivo: Estudiar el efecto de ApoA-IV en la inflamación generada por LPS en macrófagos humanos y la implicación de TLR4 en este proceso.

Metodología: Células THP-1 se diferenciaron a macrófagos y se incubaron con 10 ug/ml de ApoA-IV durante 1 hora. A continuación, se añadió 1 ug/ml de LPS y se mantuvo el cultivo durante 6 horas. Se analizó la expresión génica de IL-8, IL-1b, IL-6, TNF-a, p65 y TLR4 mediante PCR en tiempo real. Además, se realizó co-inmunoprecipitación de ApoA-IV y TLR4 incubando 1 mg de proteína del extracto celular con 50 ul de microesferas de agarosa Trueblot y 4 ug de anticuerpo anti-TLR4. Las muestras se analizaron en un gel de poliacrilamida al 10%, posterior Western blot, e incubación con el anticuerpo anti-ApoA-IV. También se analizó mediante Western blot e incubación con los anticuerpos correspondientes, el efecto de ApoA-IV sobre la activación de las quinasas p38, Erk y Jnk.

Resultados: La incubación con LPS generó un aumento de expresión en todos los genes inflamatorios analizados, situación que fue revertida de manera significativa por la adición al medio de cultivo de ApoA-IV. Los estudios de co-inmunoprecipitación indicaron que ApoA-IV no parece interaccionar con TLR4 para inhibir la reacción inflamatoria desencadenada por LPS. Además, ApoA-IV disminuyó la activación de las quinasas p38 y Erk, mientras que no se observó ningún efecto en la activación de Jnk.

Conclusiones: ApoA-IV inhibe de manera significativa la expresión de genes inflamatorios en macrófagos humanos activados por LPS y dicha inhibición no parece llevarse a cabo a través de una interacción directa con el receptor TLR4. ApoA-IV podría ejercer su acción antiinflamatoria mediante la inhibición de las rutas de señalización que implican a las quinasas p38 y Erk.

Palabras clave: Macrófagos. Inflamación. LDL oxidada. ApoA-IV.

PO-61. FABP4 AUMENTA LA PROLIFERACIÓN Y LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA HUMANA

J. Girona Tell, R. Rosales Ribas, N. Plana Gil, R. Ferré Vallés, P. Saavedra García, L. Masana Marín y J.C. Vallvé Torrente

Recerca en Lípids i Arteriosclerosi. Universitat Rovira i Virgili. IISPV. CIBERDEM. Tarragona.

Introducción: Cambios en el comportamiento y en la función de las células musculares lisas vasculares contribuyen a un remodelado vascular patológico que responde activamente a factores de crecimiento y a diferentes agentes que inducen proliferación y migración. FABP4 es una adipocina que se encuentra circulante en plasma, se asocia con disfunción endotelial y mayor riesgo cardiovascular, si bien su efecto directo sobre células periféricas y tejidos no se conoce.

Objetivo: En este estudio hemos analizado el efecto de la FABP4 sobre la migración y la proliferación de células musculares lisas de arteria coronaria (HAECs).

Metodología: El efecto de FABP4 sobre la proliferación de las HAECs se ha evaluado analizando la síntesis de DNA con BrdU mediante ELISA. La migración de las células HAECs en respuesta a FABP4 se ha

analizado mediante el ensayo in vitro scratch. Se analizó el progreso de migración celular cada 2h hasta un máximo de 24h.

Resultados: El tratamiento de HAECS con concentraciones crecientes de FABP4 y durante 24h mostró un aumento significativo de la proliferación celular comparado con células control no incubadas. Este aumento fue máximo (29%) a concentraciones de 60 ng/ml. Este efecto sobre la proliferación parece ser específico, ya que la adición de anticuerpo contra FABP4 revierte el efecto proliferativo sobre las células musculares. Estudios de dosis respuesta mostraron que FABP4 aumenta de forma significativa la migración celular a partir de las 5h de incubación respecto células no incubadas (20%, 15 ng/ml de FABP4 respecto control, $p < 0,05$).

Conclusiones: Estos resultados demuestran que FABP4 directamente induce proliferación y migración de células musculares in vitro, sugiriendo un papel potencial de esta adipocina en el remodelado vascular.

Palabras clave: FABP4. Diabetes. Remodelado vascular. Migración. Proliferación.

PO-63. LA DEFICIENCIA EN LA LIPASA SENSIBLE A LAS HORMONAS ALTERA LA COMPOSICIÓN DE ESTEROLES EN LOS TESTÍCULOS DE LOS RATONES

M.E. Casado Cerdeño¹, O. Pastor², L. Huerta¹, A. Canfrán-Duque¹, K. Lang Chang-Martín², M.A. Lasunción Ripa^{2,3}, R. Busto Durán¹ y A. Martín Hidalgo¹

¹Servicios de Bioquímica-Investigación IRYCIS. Madrid. ²Bioquímica Clínica. Hospital Universitario Ramón y Cajal. IRYCIS. Madrid.

³Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Alcalá. Madrid.

Introducción: Hay una relación estrecha entre la fertilidad y cambios en el metabolismo de lípidos durante la espermatogénesis; de hecho, la dislipemia de la obesidad o síndrome metabólico está asociada a infertilidad. El colesterol y esteroides intermediarios son necesarios para la espermatogénesis y la esteroidogénesis, y son esenciales para el desarrollo de las células germinales. La lipasa sensible a las hormonas (HSL) es una enzima clave en la hidrólisis de diacilglicéridos (DAG), ésteres de colesterol y retinol. Los ratones macho knockout (KO) de HSL son estériles y tienen alteraciones en la espermatogénesis asociadas a un descenso en la cantidad de espermatozoides y la motilidad, así como un acúmulo de DAG y ésteres de colesterol en los testículos. La composición lipídica del testículo es de gran importancia para su histología y su fisiología.

Objetivo: Investigar la implicación de los lípidos en la fertilidad en los ratones, estudiando el efecto de la ausencia de HSL en los testículos de los ratones en la composición en esteroides y su correlación con la expresión génica de las enzimas implicadas en la síntesis de colesterol.

Metodología: En los testículos de los ratones controles (WT) y KO de HSL se determinaron la composición de esteroides mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas, la expresión génica mediante RT-PCR a tiempo real y la distribución celular de colesterol libre en cortes histológicos en congelación mediante la tinción con filipina y colesterol esterificado mediante tinción con Oil Red.

Resultados: En los testículos de los ratones KO para HSL observamos un aumento de la concentración plasmática de colesterol sin observarse cambios significativos en la concentración de triglicéridos ni en la concentración de testosterona en plasma. Al analizar la composición en esteroides en los testículos encontramos los siguientes esteroides, colesterol > desmosterol > latosterol > T-MAS > lanosterol presentando esta relación entre sus cantidades, también detectamos la presencia de 4 α -metilcolesta-8(9)-en-3 β -ol, esterol anterior al zimostenol. En cuanto a las diferencias entre los ratones HSL-KO y WT vemos un aumento en colesterol total, desmosterol, latosterol; así

como en 4 α -metilcolesta-8(9)-en-3 β -ol. Posteriormente analizamos genes del metabolismo de colesterol, observando cambios en la expresión de SREBP2 y de algunas enzimas de la biosíntesis de colesterol como son 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMGCR), lanosterol-14 α -desmetilasa, esterol-C4-metil oxidasa (SC4MOL) y δ 24-reductasa (DHCR24) y δ 8,7-isomerasa. En cuanto a la distribución de los lípidos neutros vemos un incremento principalmente en las células de Leydig en los cortes histológicos de los testículos e los ratones KO para HSL.

Conclusiones: La ausencia de HSL causa una alteración en el metabolismo de los lípidos, que conlleva tanto un cambio en la composición en esteroides como en la expresión de genes implicados en su metabolismo. Estos cambios podrían ser responsables de la esterilidad de los ratones deficientes de HSL.

Palabras clave: Lipasa sensible a hormonas (HSL). Lípidos. Diacilglicéridos (DAG). Colesterol. Gametogénesis. Fertilidad.

W-01. LA PRESENCIA DE ARTERIOSCLEROSIS SUBCLÍNICA EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO ESTÁ ASOCIADA A LA ACTIVACIÓN DEL SISTEMA DE COMPLEMENTO POR LAS PARTÍCULAS HDL PEQUEÑAS Y DENSAS

S. Parra¹, G. Vives¹, R. Ferré¹, M. González², M. Guardiola², J. Ribalta² y A. Castro¹

¹Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitari Sant Joan. Reus.

²Unitat de Recerca de Lípids i Arteriosclerosis. Universitat Rovira i Virgili. Reus. Tarragona.

Introducción: El sistema de complemento se encuentra estrechamente relacionado con la patogenia y el curso clínico de los pacientes con LES. Estos pacientes muestran alteraciones metabólicas caracterizadas por un estado pro-inflamatorio que afecta al metabolismo lipídico y promueve una arteriosclerosis acelerada. Por otro lado el sistema de complemento también parece tener un papel en las enfermedades cardiovasculares. Se ha demostrado in vitro y en modelos animales la activación de complemento en placas ateroscleróticas. También se ha investigado el papel del complemento en el aclaramiento de ácidos grasos libres debido a su homología con la proteína estimuladora de la acilación (ASP) y recientemente se ha demostrado su presencia en las partículas de colesterol HDL gracias a técnicas de proteómica.

Objetivo: Investigar la relación entre los niveles de factores de complemento con la presencia de arteriosclerosis subclínica y la presencia de factores de riesgo cardiovascular y partículas lipoproteicas.

Metodología: Se incluyeron 69 pacientes con LES sin actividad clínica (SLEDAI < 4) y sin lesión orgánica. Se les realizó el mismo día del estudio una exploración física, extracción analítica y las exploraciones complementarias. El estudio de arteriosclerosis subclínica se realizó mediante la determinación del grosor íntima-media en carótidas (GIMc). Se obtuvo el valor del GIMc a partir de la media de GIM en los tres territorios vasculares explorados (Carótida Común, Carótida Interna y Bulbo). Se calculó el riesgo cardiovascular utilizando las tablas de estimación de riesgo cardiovascular a los diez años según Framingham (FRS), REGICOR y SCORE. Se analizó el perfil lipídico de forma detallada mediante resonancia magnética nuclear caracterizando las subpoblaciones lipoproteicas mediante la determinación de la concentración de número de partículas y su tamaño.

Resultados: En primer lugar encontramos una correlación directa y positiva entre el valor GIMc en los tres territorios y los niveles de C3, C4 y CH50. En el análisis multivariante la media del GIMc de los tres territorios estaba determinada por la edad ($\beta = 0,005$, IC95%: 0,002-0,007, $p < 0,001$) y el nivel de CH50 ($\beta = 0,003$, IC95%: 0,001-0,006, $p < 0,0013$). Los factores de complemento se correlacionaron positivamente con el IMC, TAS y los niveles de glucosa. Las partículas HDL pequeñas y densas también se correlacionaron con los tres factores

del complemento C3, C4 y CH50. En el análisis multivariante las partículas pequeñas y densas determinan los niveles de C3: $\beta = 0,024$, (IC95%: 0,013-0,035), $p < 0,001$; y de C4: $\beta = 0,005$, (IC95%: 0,002-0,008), $p = 0,006$).

Conclusiones: Los factores de complemento C3-, C4 y CH50 se asocian con la presencia de arteriosclerosis subclínica en pacientes con LES. Las partículas HDL pequeñas y densas determinan los niveles de complemento (C3 y C4) y también se correlacionan con el GIMc en esta población.

Palabras clave: Complemento. Grosor íntima media. Partículas HDL. Lupus eritematoso sistémico.

W-02. GENETIC INACTIVATION OF TWEAK LIMITS ATHEROSCLEROTIC LESION PROGRESSION AND INSTABILITY IN APOLIPOPROTEIN E-KNOCKOUT MICE

C. Sastre¹, V. Fernández-Laso¹, J.A. Moreno¹, J. Madrigal-Matute¹, L.C. Burkly², J. Egido¹, J.L. Martín-Ventura¹ y L.M. Blanco-Colio¹

¹Laboratorio de Patología Vascular. IIS-Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

²Biogen IDEC. Cambridge. Massachusetts. EE.UU.

Introducción: Clinical complications related with the presence of atherosclerotic plaques arise as a result of luminal obstruction due to atherosclerotic plaque growth and destabilization leading to rupture. TWEAK, a member of TNF superfamily, is a proinflammatory cytokine that can contribute to atherosclerotic plaque progression but their role in plaque stability is unknown.

Objetivo: To study the effect of TWEAK deletion or anti-TWEAK mAb treatment on early and advanced atherosclerotic plaque progression as well as on inflammatory response subjacent to atherosclerotic plaque development. We also studied the effect of TWEAK deletion or anti-TWEAK therapy on atherosclerotic plaque stability.

Metodología: To study the effect of TWEAK deletion on early atherosclerotic lesions, TWEAK^{+/+}ApoE^{-/-} (N = 9), TWEAK^{-/-}ApoE^{-/-} (N = 8) and TWEAK^{-/-}ApoE^{-/-} (N = 9) were sacrificed at 24 weeks of age. In addition, 27 TWEAK^{+/+}ApoE^{-/-} mice (24 weeks of age) were randomized in 3 groups; mice injected i.p. with saline (N = 9), anti-TWEAK mAb (10 mg/kg twice a week; N = 10) or non-specific IgG (10 mg/kg twice a week; N = 8) during 16 weeks. TWEAK^{-/-}ApoE^{-/-} (N = 8) and TWEAK^{-/-}ApoE^{-/-} (N = 9) were included to analyze the effect of TWEAK deletion on advanced atherosclerotic plaques. All mice were sacrificed at 40 weeks of age.

Resultados: In this study, we shown that early and advanced atherosclerotic plaques in mice lacking both TWEAK and apolipoprotein E (TWEAK^{-/-}ApoE^{-/-}) exhibited a diminished lesion size and inflammatory response in the aortic root (characterized as a diminution in the presence of macrophages/foam cells, MCP-1 and RANTES expression and NF- κ B activation) compared with TWEAK^{+/+}ApoE^{-/-} controls mice. In addition, treatment of TWEAK^{+/+}ApoE^{-/-} with an anti-TWEAK mAb also reduced atherosclerotic lesion size and inflammation compared with both TWEAK^{+/+}ApoE^{-/-} or IgG treated mice. Moreover, TWEAK^{-/-}ApoE^{-/-} or anti-TWEAK treated mice showed less features of plaque instability in advanced atherosclerotic plaques presented in their brachiocephalic arteries compared with controls mice. These features included augmented collagen/lipid ratio, reduced macrophage content, and less presence of lateral xanthomas, buried caps, medial erosion and intraplaque hemorrhage. Furthermore, both TWEAK^{-/-}ApoE^{-/-} and anti-TWEAK treated mice presented reduced calcium content in atherosclerotic plaques presented in their brachiocephalic arteries compared with TWEAK^{+/+}ApoE^{-/-} or IgG treated controls mice.

Conclusiones: Taken together, these results show that TWEAK plays a role in the pathogenesis of atherosclerosis promoting inflammatory response and enhancing plaque instability. TWEAK may be a new therapeutic target to prevent vascular damage.

Palabras clave: Tweak. Aterosclerosis. Inflamación. Estabilidad.

W-03. EZETIMIBE INHIBE EL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN DE MONOCITO A MACRÓFAGO. PAPEL DE LOS MICRORNAS

P. Muñoz-Pacheco, A. Ortega Hernández, A. Fernández-Cruz y D. Gómez Garre

Hospital Clínico San Carlos. Madrid.

Introducción: Ezetimibe, un inhibidor selectivo de la absorción intestinal de colesterol, ha demostrado su eficacia hipolipemiente tanto en monoterapia como en combinación con cualquier estatina. Aunque en los últimos años algunos trabajos, principalmente en modelos experimentales, sugieren un efecto ateroprotector de ezetimibe, lo cierto es que los mecanismos por los cuales podría interferir sobre la progresión de la placa de aterosclerosis se desconocen en gran medida. Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de RNA no codificante capaces de interferir negativamente sobre la expresión génica, bien uniéndose al RNA mensajero (ARNm) e impidiendo su traducción, o bien promoviendo su degradación. Estudios recientes demuestran que los miRNAs están implicados en numerosos procesos fisiológicos, incluyendo la diferenciación de los monocitos a macrófagos, uno de los principales procesos en el desarrollo y progresión de la placa de aterosclerosis.

Objetivo: Investigar el efecto de ezetimibe sobre el proceso de diferenciación de monocitos a macrófagos in vitro, así como el papel de los miRNAs en este efecto.

Metodología: Hemos utilizado la línea celular monocítica THP-1 diferenciada a macrófagos con phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; 100 ng/mL, 24 h) en presencia o ausencia de ezetimibe (10-5M). La adhesión celular se evaluó mediante un ensayo colorimétrico con cristal violeta que se midió por espectrofotometría. La expresión de diferentes marcadores de macrófagos (CD11a, CD11b e ICAM-1) y la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) p44/p42-ERK se analizó mediante citometría de flujo. La expresión de los miRNAs mir-155, mir-222, mir-424 y mir-503 se cuantificó por real-time PCR y la actividad del factor nuclear κ B (NF- κ B) mediante ELISA.

Resultados: Las células THP-1 crecen en suspensión y no se adhieren a las superficies de las placas de cultivo. Tras su diferenciación a macrófagos con PMA, las células se hicieron más adherentes al plástico (100 ± 3 vs $409 \pm 15\%$; $p < 0,01$) y se incrementó la expresión de moléculas de adhesión (CD11a: 100 ± 2 vs $127 \pm 7\%$; CD11b: 100 ± 2 vs $143 \pm 13\%$; ICAM-1: 100 ± 2 vs $133 \pm 38\%$; $p < 0,05$) y de los miRNAs mir-155, mir-222, mir-424 y mir-503 (3,6-, 1-, 2,2- y 3,8-veces respectivamente; $p < 0,05$). En presencia de ezetimibe, la adhesión celular inducida por PMA disminuyó un 47% y la expresión de moléculas de adhesión se inhibió casi por completo (78-100%; $p < 0,05$). La expresión de los miRNAs disminuyó también de forma drástica (mir-155: 55%; mir-222: 99%; mir-424: 75% y mir-503: 99%; $p < 0,05$). Este efecto de ezetimibe se asoció con el bloqueo de las vías de traducción MAPK/ERK y NF- κ B.

Conclusiones: Ezetimibe inhibe la diferenciación de las células THP-1 a macrófagos inducida por PMA a través de la inhibición de miRNAs. Nuestros resultados sugieren un nuevo mecanismo por el cual ezetimibe podría ejercer un efecto anti-aterosclerótico.

Palabras clave: Ezetimibe. Diferenciación monocitos-macrófagos. MiRNAs.

W-06. MICROPARTÍCULAS ENDOTELIALES Y PLAQUETARES: NUEVOS MARCADORES EN ATHEROSCLEROSIS

J. Orbe, S. Martínez de Lizarrondo, C. Roncal, N. Varo, J.A. Rodríguez y J.A. Páramo

CIMA-Universidad de Navarra. Pamplona.

Introducción: La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria/protrombótica en la que se generan micropartículas (MPs), pequeñas ve-

sículas fosfolipídicas liberadas por distintos tipos celulares, que participan en los procesos de activación y daño endotelial o plaquetar.

Objetivo: Hemos analizado y caracterizado MPs endoteliales (EMP) y plaquetares (PMP) en presencia de estímulos inflamatorios (CD40L) y protrombóticos (trombina) y su capacidad de producir MMP-10.

Metodología: Se obtuvieron EMP a partir de cultivos de células endoteliales (HUVEC) estimuladas durante 48 h con trombina (1-10 U/ml) y/o CD40L (0,25-1 µg/ml), tras centrifugar el medio condicionado de manera seriada a 20.000 xg. Las PMP se obtuvieron después de la activación de plaquetas con trombina (1 U/ml durante 30 min) y se recogieron como se describe anteriormente. La estandarización de las MPs se realizó mediante citometría de flujo, utilizando una mezcla de estándares fluorescentes de diámetros variados (Megamix, BioCytex) y marcaje con anexina V. La cantidad total de MPs se determinó por cuantificación proteica de los lisados y la presencia de MMP-10 y CD40L se analizó mediante Western blot.

Resultados: Se observó aumento de EMPs tras estimulación con trombina, siendo más significativa con la combinación trombina/CD40L (mg/ml: $0,53 \pm 0,12$ vs $1,21 \pm 0,16$; $p < 0,05$). El CD40L por sí solo no aumenta la liberación de las EMP, lo que sugiere un efecto sinérgico de estos estímulos en la producción de MPs. Análisis por Western blot mostró que las EMP portan MMP-10 tras la estimulación con trombina, y en mayor medida con la combinación trombina/CD40L. Posteriormente, comprobamos que las PMP solas eran incapaces de inducir la MMP-10; sin embargo, tras estimulación con trombina incrementaba su producción ($5,89 \pm 0,37$ vs $4,13 \pm 0,27$; $n = 3$; $p < 0,01$). Este efecto fue dependiente de CD40L presente en las PMP, ya que el tratamiento un anticuerpo anti-CD40L previno la inducción de MMP-10.

Conclusiones: Estímulos inflamatorio/protrombóticos relacionados con la aterosclerosis inducen la formación de MPs por diversos tipos celulares. La trombina/CD40L estimula la generación de MPs que portan MMP-10.

Palabras clave: Micropartículas. Metaloproteasas. Endotelio. Plaquetas.