



# Hipertensión y riesgo vascular

www.elsevier.es/hipertension



## COMUNICACIONES PÓSTER

### 17.<sup>a</sup> Reunión Nacional de la Sociedad Española de Hipertensión- Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial Madrid, 7-9 de marzo de 2012

#### Investigación preclínica

##### 1. ANAKINRA, UN INHIBIDOR DE LOS RECEPTORES PARA INTERLEUQUINA-1 (IL-1) RESTAURA LA FUNCIÓN ENDOTELIAL ALTERADA POR LA DIABETES MELLITUS TIPO I EXPERIMENTAL

E. Palacios Rosas, F. Álvarez, C. Peiró y C. Sánchez-Ferrer

*Departamento de Farmacología, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.*

**Introducción:** Estudios de nuestro laboratorio indican que la interleuquina 1-b (IL-1b; 1, 2,5 y 10 ng/ml) induce disfunción endotelial en microvasos mesentéricos de rata, que se potencia cuando la concentración de D-glucosa extracelular asciende a 11 o 22 mmol/L. Estos efectos son inhibidos mediante el bloqueo de los receptores para IL-1 con anakinra (AK, 10 a 100 µg/mL). En el presente trabajo se ha utilizado este agente para analizar el posible papel de estas citoquinas pro-inflamatorias en la disfunción endotelial asociada a la diabetes mellitus. Asimismo, se ha analizado el papel de la enzima NADPH oxidasa como productora de aniones superóxido, utilizando un inhibidor de la enzima (apocinina) y un barredor de aniones superóxido (tempol).

**Métodos:** Se estudió la relajación endotelio-dependiente inducida por acetilcolina (ACh, 0,1 nmol/L a 10 µmol/L) en microvasos aislados de la tercera rama de la arteria mesentérica, obtenidas de ratas Sprague-Dawley con diabetes inducida dos semanas antes, mediante la inyección i.p. de estreptozotocina (60 mg/kg). Algunos grupos de animales se trataron con AK durante los días previos al estudio (AK, 100 mg/kg cada 24 h durante 3 o 7 días; AK, 160 mg/kg cada 24h durante 3 días). En algunos casos, antes de la curva a ACh, los vasos se preincubaron durante 30 min con 100 µmol/L de tempol o 10 µmol/L de apocinina.

**Resultados:** El deterioro de la relajación inducida por ACh ( $p < 0,003$ ) a partir de la segunda semana de inducción de la diabetes se revirtió parcialmente ( $p < 0,01$ ) cuando los animales recibieron previamente 100 mg/kg de AK. Este efecto no se modificó por la duración del tratamiento (3 o 7 días antes del estudio). El tratamiento de los animales diabéticos con 160 mg/kg de AK (3 días antes del estudio) restauró totalmente ( $p < 0,001$ ) la función endotelial de los microvasos de animales diabéticos, que fue entonces

similar a la de los animales no diabéticos. Las relajaciones no dependientes de endotelio, inducidas con nitroprusiato sódico (1 nmol/L a 10 mmol/L), no se alteraron en los animales diabéticos con o sin tratamiento con AK. Cuando los microvasos mesentéricos obtenidos de ratas diabéticas (no tratadas con AK) fueron pre-incubados con 100 mmol/L de tempol o 10 µmol/L de apocinina, la disfunción endotelial se redujo de forma significativa ( $p < 0,001$ ), lo que sugiere la participación de estos mecanismos, posiblemente activados por las citoquinas pro-inflamatorias circulantes.

**Conclusiones:** La disfunción endotelial asociada a la diabetes mellitus, inducida experimentalmente en ratas, parece estar mediada por citoquinas inflamatorias del tipo de la IL-1b, ya que la función endotelial se restaura totalmente en animales tratados durante tres días con 160 mg/kg de anakinra, un bloqueante de los receptores para IL-1. Además, el mecanismo estimulado por estas citoquinas puede incluir la activación de la enzima NADPH oxidasa vascular y el consiguiente aumento en la producción de aniones superóxido.

##### 2. PROPÉPTIDO NATRIURÉTICO CEREBRAL N-TERMINAL EN LA ENFERMEDAD ARTERIAL PERIFÉRICA DE PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL CRÓNICA

P. Braillard Pocard<sup>1</sup>, F. Batista García<sup>1</sup>, N. Esparza Martín<sup>1</sup>, S. Suria González<sup>1</sup>, M. Riaño Ruiz<sup>2</sup>, A.Y. Sánchez Santana<sup>1</sup>, E.J. Fernández Tagarro<sup>1</sup>, A. Ramírez Puga<sup>1</sup>, A. Calderín Ortega<sup>3</sup> y M.D. Checa Andrés<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Nefrología; <sup>2</sup>Servicio de Bioquímica; <sup>3</sup>Angiología y Cirugía Vascular, Hospital Universitario Insular de Gran Canaria, Las Palmas.

**Introducción:** Es conocido que tanto los pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) como los pacientes con enfermedad arterial periférica (EAP) presentan un aumento del riesgo de muerte por enfermedad cardiovascular. En la población general, el aumento de los niveles de pro-péptido natriurético cerebral N-Terminal (NT-proBNP) se asocia a un aumento de su morbimortalidad cardiovascular. Si bien actualmente no existe ninguna guía que aconseje su utilidad en personas asintomáticas, si parece aceptarse su utilidad en determinadas subpoblaciones, incluidas aquellas en riesgo intermedio-alto de enfermedad car-

diovascular y aquellas en las que es preciso una valoración preoperatoria.

**Objetivos:** 1) Valorar los niveles de NT-proBNP en pacientes con IRC con o sin EAP; 2) Estudiar con qué variables se correlaciona el NT-proBNP en estos pacientes.

**Métodos:** Estudio transversal de 72 pacientes con IRC y sin datos clínicos de insuficiencia cardíaca, 55 sin EAP y 17 con EAP (Todos en estadios III o IV de Fontaine). Tras la firma del consentimiento informado (Estudio aprobado por el Comité de Ética), se recogían los datos clínicos y farmacológicos y se solicitaba analítica (hemograma, bioquímica sangre y orina 24 hs, NT-proBNP, troponinas, beta2-microglobulina, PCR y PTHi). Los estudios estadísticos se realizaron con el SPSS 15.0.

**Resultados:** Se estudiaron 72 pacientes (63,82 + 11,37 años) con IRC (MDRD4: 42,18 + 10,15 ml/min), 45 hombres y 27 mujeres. Respecto a los niveles de NT-proBNP en los 72 pacientes con IRC eran de 1.404,44 + 2.125,41 mg/dl. Al subdividirlos según presentasen o no EAP, se encontró que los pacientes con EAP presentaban niveles mayores de NT-proBNP que los pacientes sin EAP (2.561,19 + 2.526,96 vs 247,69 + 309,54 mg/dl,  $p = 0,000$ ). Al estudiar con qué variables se correlacionaba el NT-proBNP en estos pacientes, se encontraron los resultados que se muestran en la tabla a pie de página.

**Conclusiones:** Para un grado similar de IRC, los pacientes con EAP presentan niveles mayores de NT-proBNP que aquellos sin EAP lo que sugeriría una mayor probabilidad de complicaciones cardiovasculares y un mayor riesgo de complicaciones perioperatorias. Los niveles de NT-proBNP se relacionan positivamente con la edad, el ADE, la PCR, la beta-2 microglobulina y los niveles de troponinas y negativamente con los niveles de HDL lo que podría indicar que el NT-proBNP está relacionado con biomarcadores de inflamación, de EAP, de riesgo cardiovascular y de daño cardíaco.

### 3. CONOCIMIENTOS SOBRE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL DE LOS ALUMNOS DE MEDICINA

M. Osorio Solar<sup>1</sup>, L. Vara González<sup>2</sup> y S. Velilla Zancada<sup>3</sup>

<sup>1</sup>CS Dávila, Santander. <sup>2</sup>CS Castilla Hermida, Santander.

<sup>3</sup>CS Centro, Santander.

**Objetivos:** Averiguar cuáles son los conocimientos que tienen los alumnos de Medicina sobre algunos conceptos básicos de la hipertensión arterial (HTA) y de la técnica de medición de la presión arterial (PA).

**Métodos:** Se ha realizado una encuesta a 122 alumnos de 4º curso de Medicina antes de iniciar un seminario sobre la técnica de medición de la PA y el diagnóstico de la HTA. En ella se ha preguntado sobre: la instrucción teórica y práctica recibida anteriormente por los alumnos; el concepto y cálculo del pico de insuflación; la conveniencia de utilizar manguitos de diferente tamaño, y sobre las cifras que definen la HTA.

**Resultados:** Todos los alumnos habían sido instruidos sobre la técnica de medición de la PA y habían realizado alguna medición en sus prácticas anteriores, a pesar de lo cual, solo el 1,6% sabían qué era y cómo se calculaba el pico de insuflación y el 37,7% que se debe utilizar un manguito adecuado al tamaño del brazo de cada paciente. Con respecto al diagnóstico de HTA, el 57,4% no conocían la cifra umbral utilizada en el diagnóstico de la misma.

**Conclusiones:** Los conocimientos sobre algunos aspectos básicos de la técnica de medición de la PA y del diagnóstico de la HTA de

los alumnos de 4º de Medicina son insuficientes. La realización de seminarios específicos sobre estas materias puede resultar útil para mejorar esta situación.

### 4. ACOPLAMIENTO CANAL DE CALCIO-RETÍCULO SARCOPLÁSMICO EN MÚSCULO LISO VASCULAR: PAPEL EN LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

C. Porras González y J. Ureña López

*Instituto de Biomedicina de Sevilla y Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Hospital Universitario Virgen del Rocío/CSIC/ Universidad de Sevilla, Sevilla.*

**Introducción:** Los canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L voltaje dependientes (CCVD) y los mecanismos de sensibilización a Ca<sup>2+</sup> en músculo liso arterial son críticos para el mantenimiento de la contracción del vaso. Los CCVD, además de permitir la entrada de Ca<sup>2+</sup> del medio externo (función clásica o ionotrópica), pueden provocar la liberación de Ca<sup>2+</sup> del retículo sarcoplásmico (RS) y contracción arterial sin necesidad de entrada del ión del medio extracelular (función metabotrópica). Este mecanismo, denominado CCICR ("Calcium Channel Induced Calcium Release"), requiere la activación de los CCVD y una ruta metabotrópica (proteína G/fosfolipasa C/síntesis de inositol trifosfato/liberación de Ca<sup>2+</sup> del RS/contracción). El CCICR tiene un papel funcional importante en el control del tono vascular dado que participa en el mantenimiento de la contracción arterial (Fernández-Tenorio et al, 2011). Ya que está descrito que la hipertensión favorece la despolarización de los miocitos arteriales y la sobreexpresión de los CCVD, el objetivo de nuestro trabajo es estudiar si el CCICR puede estar potenciado en arterias de ratas hipertensas.

**Métodos y resultados:** En un baño de órganos se ha medido la fuerza isométrica generada por anillos de arterias femorales de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y se ha estudiado la participación de los dos elementos que intervienen en el CCICR: el RS y los CCVD. Para ello se expusieron los anillos arteriales a cafeína, un activador de los receptores de rianodina del RS o ácido ciclopiazónico (ACP), un inhibidor de la ATP-asa del RS. El papel de los CCVD se estudió aplicando una solución despolarizante de alto K<sup>+</sup>, BayK 8644 o FPL 64176, dos agonistas de los CCVD. La contracción generada por la cafeína o ACP, 20K y BayK 8644 es mayor en anillos de ratas hipertensas que en los anillos de ratas normotensas. Así mismo, la contracción inducida por FPL 64176 en ausencia de Ca<sup>2+</sup> externo, es mayor en anillos de ratas hipertensas que en los de ratas normotensas.

**Conclusiones:** La contracción asociada al Ca<sup>2+</sup> almacenado en el retículo sarcoplásmico y la dependiente de los CCVD está potenciada en las arterias de ratas hipertensas. Como la contracción inducida por FPL 64176 en ausencia de Ca<sup>2+</sup> externo es mayor en arterias de animales hipertensos, nuestros resultados sugieren que el CCICR puede estar potenciado en las arterias de ratas hipertensas. Dado que los CCVD constituyen una diana farmacológica para tratar la hipertensión arterial, estos resultados y futuros experimentos, podrían ayudar a optimizar el tratamiento de esta patología.

*Este trabajo ha sido financiado por la Red RECAVA del ISCIII y por el Proyecto de Excelencia (P08-CTS-03530) de la Consejería de Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía y Unión Europea.*

	Edad	ADE	HDL	PCR	Troponinas	Beta2-microglobulina
Correlación de Pearson NT-proBNP	r = 0,45	r = 0,63	r = - 0,56	r = 0,74	r = 0,51	r = 0,81
p	0,010	0,000	0,01	0,000	0,03	0,000

## 5. DISMINUCIÓN DE LA FUNCIÓN NITRÉRGICA EN ARTERIA MESENTÉRICA DE HEMBRAS ADULTAS EN PERÍODO DE LACTANCIA

E. Sastre, J. Blanco-Rivero, M. Granado y G. Balfagón

*Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.*

**Objetivos:** El objetivo del presente estudio fue analizar si la lactancia afecta la respuesta vasomotora inducida por estimulación eléctrica (EE) en arteria mesentérica de rata, así como la participación de las inervaciones adrenérgica, y nitrérgica en estas posibles modificaciones.

**Métodos:** Se utilizaron ratas hembra adultas Sprague-Dawley divididas en dos grupos experimentales: 1) en fase estro, y 2) madres tras un periodo de lactancia de 21 días. Se analizaron las variaciones de la respuesta vasoconstrictora a EE (200 mA, 0,3 ms, 1-16 Hz, 30 s) en presencia/ausencia de 1 mmol/L del antagonista de los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos fentolamina, o de 0,1 mmol/L del inhibidor inespecífico de la óxido nítrico sintasa (NOS) L-NAME. Se analizó la respuesta vasoconstrictora a noradrenalina (NA) y vasodilatadora al donante de óxido nítrico (NO) DEA-NO. Asimismo, se midió la liberación de NA y de NO, y la expresión proteica de la NOS neuronal fosforilada (P-nNOS).

**Resultados:** La respuesta contráctil inducida por EE fue significativamente mayor en madres lactantes. La fentolamina redujo la respuesta a EE en igual medida en ambos grupos. Tanto la liberación como la respuesta vasoconstrictora a NA fueron similares en ratas control y lactantes. L-NAME incrementó la contracción inducida por EE en ambos grupos, pero en mayor medida en hembras en estro. La respuesta a DEA-NO fue similar en ambos grupos experimentales. Tanto la liberación de NO como la expresión de P-nNOS se vieron disminuidas en arterias de madres lactantes.

**Conclusiones:** El incremento en la respuesta vasoconstrictora inducida por EE en madres lactantes se debida a una disminución en la liberación deNO de origen neuronal, lo cual puede contribuir a un aumento en la resistencia vascular periférica en este lecho vascular.

## 6. ESTUDIO PROTEÓMICO DEL EFECTO DEL CANDESARTÁN SOBRE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS RELACIONADAS CON EL PROCESO INFLAMATORIO Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN PACIENTES HIPERTENSOS Y DIABÉTICOS CON CARDIOPATÍA ISQUÉMICA ESTABLECIDA

J. Modrego Martín, L. Azcona Varela, G. Moñux Ducaju, S. González, M. Hernando, P. Jiménez Mateos-Cáceres, C. Macaya y A. López Farre

*Hospital Clínico San Carlos, Madrid.*

Se han descrito diferentes efectos pleiotrópicos de los ARA-II, sin embargo existen pocos estudios analizando de forma global modificaciones en la expresión de múltiples proteínas asociadas a estos efectos. Nuestro objetivo fue evaluar, mediante análisis proteómico, el efecto del tratamiento con candesartán sobre la expresión de proteínas plasmáticas relacionadas tanto con el proceso inflamatorio como con el estrés oxidativo en pacientes hipertensos y diabéticos con cardiopatía isquémica establecida. Se reclutaron seis pacientes con hipertensión arterial mal controlada y con micro/macrovasculopatía diabética que fueron tratados con candesartán (8-16 mg/día) durante los siguientes 3 meses. Las presiones arteriales de los pacientes en la inclusión fueron (160/87) y tras 3 meses de tratamiento (134/80). El valor de eco doppler carotídeo basal fue (0,73 mm  $\pm$  0,24) que se observó significativamente mejorado a los 3 meses (0,56 mm  $\pm$  0,22;  $p < 0,05$  respecto a basal). Se analizaron las siguientes proteínas del plasma de pacientes en la inclusión y después de 3 meses de tratamiento. Se identificaron en

el plasma 5 isoformas de serotransferrina, 2 isoformas del precursor del complemento C3, 3 isoformas de la cadena b del fibrinógeno, 3 isoformas de la proteína de unión a vitamina D, 3 isoformas de la cadena gamma del fibrinógeno, 6 isoformas de alfa1-antitriplicina, vimentina, intersectina-1, precursor sérico amiloide, citoqueratina, desmoplaquina, beta-tropomiosina y adenilato kinasa 5. En ninguna de las proteínas mencionadas con anterioridad se observaron cambios estadísticamente significativos en los proteomas plasmáticos de los pacientes en el momento basal comparado con los proteomas correspondientes a los 3 meses tras la administración del tratamiento con candesartán. En conclusión, el tratamiento con candesartán consigue mejorar los niveles de presión sistólica y reduce el grosor de la placa carotídea. Sin embargo, estas mejoras fisiológicas no se corresponden a modificaciones en proteínas circulantes relacionadas ni con la respuesta inflamatoria ni con el estrés oxidativo.

## 7. RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE PROTEÍNA DE UNIÓN A VITAMINA D Y PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN CÉLULAS MONONUCLEADAS DE PACIENTES CON ISQUEMIA CORONARIA ESTABLECIDA Y PLAQUETAS RESISTENTES A ASPIRINA

J. Modrego Martín, P. de Anastasio, L. Azcona Varela, P. Jiménez Mateos-Cáceres, P. Rodríguez, L. Calatrava, J.J. Zamorano León, C. Macaya y A. López Farre

*Hospital Clínico San Carlos, Madrid.*

La aspirina es el fármaco más usado en la prevención secundaria de la enfermedad aterotrombótica y en su efecto antiplaquetario interviene la estimulación de la producción de óxido nítrico (NO) por las células mononucleadas. Sin embargo, algunos pacientes vuelven a tener eventos recurrentes a pesar del tratamiento continuado con aspirina, fenómeno conocido como "síndrome de resistencia a aspirina". Recientemente, niveles plasmáticos elevados de la proteína de unión a vitamina D (DBP) han sido descritos en pacientes cuyas plaquetas son resistentes a aspirina. Nuestro objetivo fue evaluar el contenido de DBP en las células mononucleadas de pacientes con isquemia coronaria establecida en función de la respuesta al tratamiento antiagregante con aspirina y establecer una posible relación con la capacidad de síntesis de NO por estas células. Se reclutaron 77 pacientes con isquemia coronaria establecida tratados con aspirina (100 mg/día) durante al menos 9 meses que fueron divididos en función de su respuesta plaquetaria al tratamiento con aspirina por la técnica del PFA-100 (tiempo oclusión  $< 193$  segundos, paciente resistente; tiempo oclusión  $> 193$  segundos, paciente sensible). De cada paciente se aisló sus células mononucleadas. Se llevaron a cabo análisis mediante Western blot para medir la expresión de NO sintasa endotelial (NOS<sub>e</sub>) y DBP en las células mononucleadas. Además se midió el contenido de nitratos/nitritos en el secretoma de las células mononucleadas y se comparó entre los dos grupos de estudio. Las células mononucleadas de pacientes con plaquetas resistentes a aspirina mostraron un contenido elevado de DBP ( $p < 0,05$  respecto a sensibles). Se observó una reducción significativa de la expresión de NOS<sub>e</sub> en las células mononucleadas de pacientes con plaquetas resistentes a aspirina que se acompañó con un menor contenido de nitratos/nitritos liberado al medio de cultivo (sensibles: 3,08  $\pm$  0,01  $\mu$ M; resistentes: 1,61  $\pm$  0,01  $\mu$ M;  $p < 0,05$ ). Se estableció mediante el test de Pearson la existencia de una relación positiva entre los niveles de nitratos/nitritos en el medio de cultivo de las células mononucleadas con la respuesta plaquetaria a aspirina. Se encontró una correlación negativa entre el contenido de DBP en células mononucleadas con la respuesta plaquetaria a aspirina. En conclusión, parece que el mayor contenido de DBP y la menor producción de NO en las células mononucleares está estrechamente relacionado con la falta de res-

puesta plaquetaria al tratamiento con aspirina en pacientes con isquemia coronaria establecida.

## 8. LA EXCRECIÓN URINARIA DE KLK9 SE ASOCIA A HIPERTENSIÓN, HIPERTROFIA CARDÍACA Y ENGROSAMIENTO DE LA PARED DE LA AORTA

J.M. López Novoa<sup>1</sup>, A.M. Blázquez Medela<sup>1</sup>, O. García Sánchez<sup>1</sup>, Y. Quirós Luis<sup>1</sup>, F.J. López Hernández<sup>2</sup> y C. Martínez Salgado<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Fisiopatología Renal y Cardiovascular, Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica, Universidad de Salamanca, Salamanca. <sup>2</sup>Instituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León (IECSCYL), Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca.

La hipertensión es el factor de riesgo más importante en la enfermedad cardiovascular y en la insuficiencia renal crónica. La detección temprana del daño hipertensivo en órgano diana y en otras enfermedades secundarias es un determinante fundamental de la prognosis cardiovascular en pacientes afectados de hipertensión arterial. En los últimos años se han identificado numerosos biomarcadores que pueden contribuir potencialmente a la aparición o desarrollo de daño cardiovascular y renal, pero hasta el momento no se han identificado biomarcadores que detecten la aparición de daño vascular y en órgano diana (corazón, riñón, retina) en pacientes hipertensos. En diferentes modelos experimentales de hipertensión en ratas (ratas espontáneamente hipertensas-SHR, hipertensión inducida por L-NG-nitroarginina metil éster-L-NAME), hemos observado que la excreción urinaria de la serina proteasa peptidasa 9 relacionada con la calicreína (kallikrein-related peptidase 9, KLK9) está aumentada en presencia de hipertensión. La excreción urinaria de KLK9 aparece antes de la aparición de nefropatía hipertensiva. No hay aumentos de la expresión de KLK9 en riñón, corazón, hígado, pulmón o plasma sanguíneo en presencia de hipertensión. La excreción urinaria de KLK9 en presencia de hipertensión parece ser originada por una disminución de la reabsorción tubular. La excreción urinaria de KLK9 está significativamente relacionada con la presencia de hipertrofia cardíaca y con el engrosamiento de la pared de la aorta. En nuestros modelos experimentales de hipertensión, el fármaco antihipertensivo trandolapril reduce significativamente la presión arterial así como la expresión de KLK9 en orina. Nuestros datos muestran que KLK9 aparece en la orina en la presencia de hipertensión consolidada, pero antes de la aparición de nefropatía hipertensiva. KLK9 podría ser un indicador de la presencia de daño en órgano diana (hipertrofia cardíaca, engrosamiento de la pared de la aorta) asociado a la hipertensión.

## 9. PARTICIPACIÓN DE ANIÓN SUPERÓXIDO EN LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL OBSERVADA EN UN MODELO DE PREECLAMPSIA EXPERIMENTAL EN RATA

M. Hernández García<sup>1</sup>, B. Bonacasa Fernández<sup>1</sup>, M. Pertegal Ruiz<sup>2</sup>, F.J. Fenoy Palacios<sup>1</sup> e I. Hernández García<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Murcia, Facultad de Medicina, Fisiología, Murcia.

<sup>2</sup>Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia.

El objetivo del trabajo es estudiar la participación del anión superóxido en la disfunción endotelial observada en un modelo de preeclampsia en rata obtenido mediante la inhibición de la catecol-O-metil transferasa (COMT), enzima que produce 2 metoxiestradiol (2-ME) a partir de 2-hidroxiestradiol (2-HE). A ratas SD gestantes se les administró por gavage entacapone (un inhibidor de la actividad enzimática COMT), a partir del día 10 de gestación. La valoración de la actividad enzimática se realizó mediante una técnica radioenzimática. La presión arterial se evaluó mediante ple-

tismografía en la arteria del rabo. La función endotelial vascular se evaluó midiendo el cambio de diámetro en respuesta a dosis crecientes de acetilcolina de arterias mesentéricas presurizadas previamente contraídas con fenilefrina. La liberación de NO se valoró por amperometría de pulso diferencial en endotelio vascular de tiras de aorta en respuesta a un ionóforo de calcio (A23187). Para evaluar el papel del estrés oxidativo se realizaron los protocolos de estudio de función endotelial y liberación de NO en presencia de tempol (50  $\mu$ M), un sequestrador de aniones superóxido. Las placentas de ratas gestantes tratadas con el inhibidor mostraron valores de actividad enzimática ( $V_{max} = 11,58 \mu\text{mol/mg prot/min}$ ;  $KM = 31,83$ ) significativamente inferiores comparados con los de placentas procedentes de ratas no tratadas ( $V_{max} = 167,3$ ;  $KM = 42,24$ ). La presión arterial sistólica aumentó significativamente en ratas gestantes tratadas con entacapone (de  $124 + 1,89$  mmHg en el día 9 de gestación a  $143,3 + 3,76$  mmHg en el día 14). Comparadas con ratas gestantes no tratadas, se encontraron diferencias significativas en el día 14 ( $143,3 + 3,76$  vs  $122,25 + 2,66$  mmHg) y 19 de gestación ( $128,5 + 3,87$  vs  $115,38 + 4,79$  mmHg). Las respuestas vasodilatadoras a acetilcolina, expresadas como porcentaje de dilatación de arteriolas precontraídas con fenilefrina, fueron significativamente menores en ratas preñadas tratadas con el inhibidor ( $59,7 + 10$ ) que en ratas gestantes no tratadas ( $93,3 + 6$ ) y ratas vírgenes ( $80,4 + 6$ ). Esta disfunción mejoró en presencia de tempol (Log EC50:  $-7,85 + 0,27$  vs  $-6,96 + 0,13$ ). La liberación endotelial de NO inducida por ionóforo de calcio (A23187) fue significativamente mayor en aortas procedentes de ratas preñadas no tratadas con entacapone ( $209,8 + 17$  nM) que en ratas preñadas tratadas ( $159 + 11$  nM) y ratas vírgenes ( $154,4 + 16$  nM). En presencia de tempol, la liberación de NO aumentó significativamente ( $279,17 + 27$  vs  $212,5 + 19$  nM) en las ratas gestantes tratadas con entacapone. Estos resultados muestran que la presencia de tempol mejora la reactividad vascular y liberación de NO en un modelo de preeclampsia en rata por inhibición de la actividad COMT, lo que sugiere la participación de anión superóxido en la disfunción endotelial observada en este modelo experimental.

## 10. EL EJE ANGIOTENSINA-(1-7)/MAS EXHIBE PROPIEDADES ANTIINFLAMATORIAS EN CÉLULAS VASCULARES HUMANAS DE MÚSCULO LISO

L.A. Villalobos Rodríguez, T. Romacho Romero, E. Cercas Alonso, C. Sánchez Ferrer, C. Peiró Vallejo y S. Vallejo

Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

**Objetivos:** La angiotensina (Ang)-(1-7) es un heptapéptido que ejerce sus acciones a través del receptor Mas acoplado a proteínas G y que posee acciones contrarias a la Ang II. El objetivo de este trabajo fue: 1) Determinar la posible acción antiinflamatoria de la Ang-(1-7) en células de músculo liso de aorta humana (CMLAH) estimuladas con Ang II o la citoquina interleuquina (IL)-1b, como molécula inflamatoria independiente del sistema renina angiotensina (SRA), 2) Estudiar el papel del receptor Mas como mediador de dicha acción, y 3) Definir la ruta de señalización celular por medio de la cual el eje Ang-(1-7)/receptor Mas ejerce su acción antiinflamatoria en las CMLAH.

**Métodos:** Los niveles de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), se determinaron por Western blotting y los niveles de liberación de óxido nítrico (NO) por el método de Griess. La actividad de la enzima NADPH oxidasa se determinó por el método de quimioluminiscencia derivada de lucigenina. La inducción de la activación del factor de transcripción NF-kB, se detectó por el ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA).

**Resultados:** La estimulación de las CMLAH con (Ang II)-(100 nM) o (IL)-1b (2,5 ng/ml) durante 18 horas aumentó significativamente

los niveles de iNOS y la liberación de NO. En presencia de la Ang-(1-7) (100 nM), la inducción de iNOS y la liberación de NO inducida por Ang II e (IL)-1b disminuyeron significativamente. Dicho efecto de Ang-(1-7) se abolió en células pretratadas con el antagonista del receptor Mas A779 (1  $\mu$ M). Análogamente, la estimulación de las CMLAH con Ang II e (IL)-1b provocó un aumento de la actividad NADPH oxidasa, que se vio reducida por la Ang-(1-7) en un 44% y 53%, respectivamente. También se determinó la activación del factor de transcripción NF-kB por Ang II e (IL)-1b, que disminuyó en presencia de la Ang-(1-7) en un 44% y 40% respectivamente. El antagonista del receptor Mas A779 (1  $\mu$ M), abolió significativamente la acción inhibitoria de la Ang-(1-7) sobre la activación de la NADPH oxidasa y de NF-kB. Finalmente para establecer la secuencia de señalización de la acción antiinflamatoria la Ang-(1-7) se emplearon inhibidores como la apocinina y el PDTC, que bloquean a la enzima NADPH oxidasa y al factor de transcripción NF-kB, respectivamente. Así, la apocinina (30 mM) redujo los niveles de iNOS inducidos por Ang II e (IL)-1b en un 37% y 50%, respectivamente, y la liberación de nitritos en un 57% y 45%, respectivamente. En presencia PDTC (100 mM), los niveles de iNOS inducidos por Ang II e (IL)-1b disminuyeron significativamente en un 42% y 53%, respectivamente.

**Conclusiones:** La Ang-(1-7) a través del receptor Mas previene parcialmente la inflamación del músculo liso vascular inducida no sólo por Ang II, sino también por otras moléculas inflamatorias independientes del SRA, como la IL-1b. La Ang-(1-7) atenúa dicha inflamación mediante el bloqueo de la enzima NADPH oxidasa y la inactivación del factor de transcripción NF-kB, lo que se manifiesta en una disminución de la expresión de iNOS y la liberación de NO.

## 11. INFLUENCIA DE LAS ADIPOCITOQUINAS VISFATINA E INTERLEUQUINA-1 $\beta$ EN LA SENESCENCIA DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS

A. Leivas, L. Villalobos, T. Romacho, E. Cercas, E. Palacios, C.F. Sánchez Ferrer y C. Peiró

*Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.*

**Objetivos:** La senescencia celular prematura puede ser producida por estímulos extracelulares que causan estrés y daño celular en un proceso que implica a la proteína p53 y conduce a la detención del ciclo celular. La diabetes mellitus tipo 2 (DT2) y la obesidad se consideran enfermedades progericas que pueden representar modelos prematuros de senescencia. Las complicaciones cardiovasculares son la principal causa de morbimortalidad en estas enfermedades, que se caracterizan, por la presencia de un ambiente proinflamatorio crónico de bajo grado asociado a un aumento de los niveles circulantes de adipocitoquinas como la visfatina y la interleuquina (IL)-1 $\beta$ . Éstas producen inflamación vascular, asociada con un incremento del estrés oxidativo y disfunción endotelial, considerados como fenómenos tempranos en el desarrollo de patologías vasculares, como aterosclerosis e hipertensión. En este trabajo se ha explorado la capacidad de las adipoquinas visfatina e IL-1 $\beta$  para promover la senescencia en células endoteliales procedentes de vena de cordón umbilical humano (HUVEC). Asimismo, se ha investigado si los efectos producidos por visfatina están mediados por su actividad enzimática nicotinamida fosforribosil transferasa (Nampt) y por la activación de la proteína p53.

**Métodos:** Se extrajeron las HUVEC a partir de cordones umbilicales mediante disociación enzimática con colagenasa. Las células obtenidas se sembraron hasta alcanzar la subconfluencia, momento en el cual se aplicaron los tratamientos correspondientes durante 24 horas. Posteriormente, se realizó la caracterización de las células endoteliales mediante marcaje fluorescente del factor VIII de coagulación. La presencia de células senescentes en los cultivos se

detectó mediante tinción basada en la  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (SA- $\beta$ -gal), detectable a pH 6 sólo en células senescentes. Por otra parte, los niveles de p53 se determinaron mediante técnicas de Western Blot, utilizando anticuerpos apropiados y un sistema de revelado basado en quimioluminiscencia.

**Resultados:** Como modelo de inducción de senescencia por estrés oxidativo, los cultivos de HUVEC se trataron con peróxido de hidrógeno (25, 50 y 75  $\mu$ M), que produjo un aumento del número de células senescentes de manera dependiente de la concentración. Por su parte, la IL-1b (2,5, 5 y 10 ng/ml) aumentó el número de células senescentes, con un efecto máximo a 5 ng/ml. La visfatina (10, 25, 50 y 100 ng/ml) también incrementó el número de células senescentes de manera dependiente de la concentración. Este incremento se vio revertido completamente al preincubar la visfatina (50 ng/ml) con el inhibidor específico de la actividad enzimática Nampt APO 866 (10  $\mu$ M). La visfatina (50 ng/ml) también aumentó significativamente los niveles de p53 en los cultivos de HUVEC con respecto a los niveles basales, siendo este efecto revertido por APO 866 (10  $\mu$ M).

**Conclusiones:** Tanto visfatina como IL-1 $\beta$  son capaces de inducir la entrada en senescencia de las HUVEC en cultivo. En el caso de la visfatina, este efecto está mediado por su actividad enzimática Nampt y parece implicar la activación de la proteína p53. Por tanto, en enfermedades como la DT2 y la obesidad, los elevados niveles circulantes de estas adipocitoquinas podrían contribuir al deterioro de la función vascular a través de la inducción de senescencia endotelial.

## 12. INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN VASCULAR DE LA FIBULINA-5 POR ESTÍMULOS INFLAMATORIOS

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

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

**Introducción y objetivos:** 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. Sin embargo, se desconocen en gran medida los mecanismos implicados en su regulación a nivel vascular. En este contexto, nuestro objetivo fue analizar la regulación de la FBLN5 por mediadores inflamatorios en la pared vascular.

**Métodos:** Los estudios se desarrollaron en células musculares lisas vasculares (CMLV) humanas de aorta. 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 (TNF $\alpha$ , LPS e IL1 $\beta$ ) 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 24h 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 parthenolide y BAY11-7082 (inhibidores de la vía NF- $\kappa$ B) o el NDGA (inhibidor de AP-1). Por el contrario, el pretratamiento con MS-275, un inhibidor de histonas deacetilasas (HDAC) de clase I, previno la disminución de la expresión de FBLN5.

**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.

### 13. EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE TEJIDO CONECTIVO (CTGF) AUMENTA LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA Y ACTIVA LA RESPUESTA INFLAMATORIA A NIVEL VASCULAR

R. Rodríguez Díez<sup>1</sup>, A.B. García Redondo<sup>2</sup>, M. Orejudo del Río<sup>1</sup>, C. Lavoz<sup>1</sup>, S. Rayego Mateos<sup>1</sup>, M. Salaices<sup>2</sup>, J. Egido<sup>1</sup>, A. Briones<sup>2</sup> y M. Ruiz Ortega<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Madrid. <sup>2</sup>Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) está asociado históricamente a procesos fibróticos, desempeñando un papel de mediador secundario de otros factores como angiotensina II (AngII) o el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). Estudios experimentales sugieren que el bloqueo de CTGF tiene efectos beneficiosos sobre la progresión del daño renal, pero no está bien definido su efecto en patologías cardiovasculares. Recientemente hemos descrito que la administración sistémica de CTGF en ratones activa la ruta de NF- $\kappa$ B aumentando factores proinflamatorios en el riñón, lo que demuestra la importancia de CTGF in vivo en la regulación de la respuesta inflamatoria. Uno de los mecanismos más importantes implicados en la activación de rutas inflamatorias es la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) generada por la activación, entre otras, de la enzima NADPH oxidasa. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestro objetivo ha sido evaluar si CTGF activa la ruta inflamatoria NF- $\kappa$ B a nivel vascular, y el papel que desempeña la NADPH oxidasa en esta activación. Para evaluar los efectos de CTGF in vivo, realizamos un modelo experimental en ratones C57BL/6 a los que se les administró intraperitonealmente CTGF (2,5 ng/g de peso, 24h), suero salino (grupo control), y CTGF junto con un inhibidor de la ruta NF- $\kappa$ B (Parthenolide 3,5 mg/g de peso). En las aortas de los ratones tratados con CTGF observamos un aumento en la actividad NADPH oxidasa. CTGF incrementó en aorta la expresión de la proteína p65 fosforilada (p-p65) indicando una activación del factor nuclear NF- $\kappa$ B, que fue inhibida en los ratones tratados con Parthenolide. A nivel aórtico CTGF causó una sobreexpresión de genes proinflamatorios (IL-6, ICAM-1, RANTES, MCP-1), así como de la enzima oxido nítrico sintasa inducible (iNOS), del factor nuclear NRF2, y de la hemoxigenasa 1 (HMOX1), la cual no se observó en los ratones tratados con Parthenolide. En estudios in vitro en células de músculo liso vascular de aortas de ratón (CMLVs), observamos que la estimulación con CTGF aumentó la actividad de la NADPH oxidasa y la producción de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) a partir de 30 minutos. Este efecto se correlacionó con el incremento en los niveles de p-p65. La preincubación con dos inhibidores de la NADPH oxidasa: apocinina y DPI, revirtió la activación de NF- $\kappa$ B inducida por CTGF, lo que sugiere una implicación de ROS en este proceso. En CMLVs, CTGF aumentó la expresión génica de IL-6, ICAM-1, RANTES y MCP-1, a las 6 horas. El pretratamiento con inhibidores de la NADPH oxidasa y NF- $\kappa$ B, disminuyó la expresión de estos genes causada por CTGF. Los resultados de este trabajo, sugieren que CTGF aumenta in vivo e in vitro la actividad NADPH oxidasa y la consiguiente producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> así como la posterior activación de NF- $\kappa$ B, desencadenando un aumento en los niveles de

genes proinflamatorios y de respuesta a estrés oxidativo. CTGF, por tanto, al regular procesos inflamatorios y oxidativos, podría tener un papel más importante del que se le ha atribuido hasta ahora en patología vascular.

### 14. PAPEL DE LOS MICRORNAS EN EL DESARROLLO DE INSUFICIENCIA CARDÍACA CONGESTIVA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE RATAS HIPERTENSAS

P. Muñoz-Pacheco Román<sup>1</sup>, A. Ortega Hernández<sup>1</sup>, A. Caro Vadillo<sup>2</sup>, A. Fernández-Cruz Pérez<sup>1</sup> y D. Gómez Garre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hospital Clínico San Carlos, Madrid. <sup>2</sup>Facultad de Veterinaria, UCM, Madrid.

**Objetivos:** Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de RNA no codificante capaces de iniciar la degradación del mRNA diana o de inhibir su traducción. En los últimos años, ha crecido el interés por su papel como moléculas reguladoras de la expresión génica. En la enfermedad cardiovascular, parece que algunos miRNAs podrían jugar un papel importante en el desarrollo del daño cardíaco asociado a la hipertensión arterial. En este estudio hemos investigado los niveles de expresión cardíaca de diversos miRNAs, y su modulación por una terapia antihipertensiva, durante el desarrollo de insuficiencia cardíaca (IC) descompensada utilizando un modelo experimental de ratas hipertensas que desarrollan espontáneamente IC (ratas SHHF).

**Métodos:** Machos SHHF de 2 meses de edad que se separaron en dos grupos: ratas no tratadas y ratas tratadas durante 19 meses con quinapril, torasemida y carvedilol. Como controles se usaron ratas Wistar normotensas. Tres días antes del sacrificio a cada animal se le realizó un estudio eco-doppler para determinar la función cardíaca. Los animales se sacrificaron a los 4, 9 y 19 meses de edad y se obtuvo el corazón. La expresión de miRNAs se evaluó mediante RT-PCR cuantitativa.

**Resultados:** Con la edad, las ratas SHHF desarrollaron hipertensión y signos de IC. A los 4 meses, los animales ya presentaban hipertrofia cardíaca y a partir de los 9 meses de edad, los animales comenzaron a presentar alteraciones del patrón de llenado ventricular, evaluado mediante el cociente E/A del flujo mitral. A los 19 meses los animales presentaban dilatación severa del ventrículo con disminución de la fracción de acortamiento, como señal de una progresiva alteración en la contractibilidad miocárdica, además de fibrosis cardíaca y congestión pulmonar. En comparación con ratas normotensas de la misma edad, las ratas SHHF de 19 meses mostraron un aumento en la expresión de 31 miRNAs, entre los que se encontraron la familia let-7 (3-4 veces,  $p < 0,05$ ), miR-21 (4,2 veces,  $p < 0,05$ ), miR-195 (5,8 veces,  $p < 0,05$ ), miR-29 (3,3 veces,  $p < 0,05$ ) y miR-320 (2,5 veces,  $p < 0,05$ ), los cuales han sido relacionadas con el desarrollo de hipertrofia, fibrosis, angiogénesis y/o arritmias. La administración de una terapia clásicamente usada para el tratamiento de la IC, normalizó la presión arterial, previno parcialmente el remodelamiento cardíaco y mejoró la función diastólica y sistólica ( $p < 0,05$ ) aunque sin llegar a normalizarla. Este efecto se asoció con una normalización en la expresión de solo 13 de los miRNAs (42%,  $p < 0,05$ ) que estaban aumentados en las ratas SHHF sin tratamiento.

**Conclusiones:** Nuestros resultados muestran un aumento en la expresión de diversos miRNAs en el desarrollo de IC congestiva en un modelo experimental de IC asociada a hipertensión arterial. Una terapia antihipertensiva que previno parcialmente el desarrollo de la IC solo fue capaz de normalizar el 42% de los miRNAs implicados. Es posible que los miRNAs puedan ser utilizados como marcadores de la respuesta terapéutica en el desarrollo de la IC, aunque este aspecto requiere ser aún demostrado.

## 15. INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON CPAP SOBRE LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL Y LA EXPRESIÓN DE LA SUBUNIDAD B1 DEL CANAL MAXI K EN PACIENTES CON SÍNDROME DE APNEA-HIPOPNEA DEL SUEÑO

R. Muñoz Hernández<sup>1</sup>, A.D. Costa Martins<sup>1</sup>, M.J. Domínguez Simeón<sup>1</sup>, A. Vallejo Vaz<sup>2</sup>, L.M. Beltrán Romero<sup>2</sup>, C. Caballero Eraso<sup>2</sup>, A. Armengol<sup>2</sup>, F. Capote<sup>2</sup>, P. Stiefel García-Junco<sup>2</sup> y R. Moreno Luna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IBIS, Sevilla. <sup>2</sup>Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

**Introducción:** En un estudio piloto, describimos que la exposición a la hipoxia intermitente que existe en el síndrome de apnea-hipopnea del sueño (SAHS) provoca una hipoactividad de la subunidad B1 del canal maxi-K+, que aumenta el tono vascular en células musculares lisas y se relaciona con los niveles de presión arterial. Estudios previos sugieren que la disfunción endotelial observada en enfermedades cardiovasculares se asocia con esta patología (SAHS) y que el tratamiento con presión positiva continua en la vía aérea (CPAP) reduce los valores de presión arterial en estos pacientes. Sin embargo, su efecto sobre el estado inflamatorio y estrés oxidativo en estos pacientes sigue siendo objeto de estudio.

**Objetivos:** Estudiar el efecto de la CPAP sobre la expresión génica de la subunidad Beta 1 del canal Maxi K+ en pacientes con SAHS. Analizar la disfunción endotelial y la presión arterial antes y después del tratamiento con CPAP. Buscar posibles correlaciones entre los niveles de la subunidad B1 del canal Maxi K y el grado de riesgo vascular en estos pacientes.

**Métodos:** Población: 30 individuos diagnosticados de SAHS, reclutados en la Unidad del Sueño del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla). Fueron sometidos a una polisomnografía nocturna y a una monitorización ambulatoria de la presión arterial 24h. Aquellos que presentaban un IAH > 15 fueron tratados con CPAP durante 3 meses. Antes y después del tratamiento realizamos lo siguiente: Recolección de muestras sanguíneas, les realizamos extracciones sanguíneas, para la obtención de suero, plasma y células mononucleares. Estudios de función endotelial: por técnicas no invasivas, analizamos el área hiperemia reactiva tras la isquemia, por flujimetría láser doppler. Así como estudiamos diferentes marcadores de disfunción arterial solubles en plasma, como Asymmetric Dimethyl-Arginine, (ADMA), insulinemia, óxido nítrico, LDL oxidada, homocisteína y PCR ultrasensible (PCRus), mediante técnicas del ELISA. Estudio de la tensión arterial mediante MAPA de 24 horas. Estudio de la expresión génica de la subunidad beta 1 del canal maxi K+ por RT-PCR, a partir del estudio del RNA total extraído de los leucocitos de sangre periférica.

**Resultados:** La expresión de la subunidad  $\beta 1$  del canal maxi-K+ no fue significativamente diferente en los pacientes con SAHS hipertensos respecto a los pacientes con SAHS normotensos y tampoco varió de forma significativa tras CPAP. Tras tratamiento con CPAP se produjo una mejora en la función endotelial evidenciable mediante un claro aumento en el área bajo la curva de hiperemia tras la isquemia ( $p < 0,005$ ). Igualmente tras CPAP se produjo una disminución en las cifras de PA medidas mediante MAPA que fue significativa para la media de la sistólica de 24 h, media de la diastólica de 24 h, diastólica media del periodo día y sistólica y diastólica medias del periodo noche. Tras CPAP no solo se objetivó mejora en la función endotelial medida a través de la flujimetría por técnica láser doppler, sino por una disminución de parámetros bioquímicos como es el ADMA ( $p < 0,001$ ), la LDL ox ( $p < 0,001$ ) y la homocisteína ( $p < 0,005$ ) y un aumento de los valores de ON ( $p < 0,05$ ). El cambio en la expresión de la subunidad beta-1 tras CPAP se correlacionó de forma significativa y positiva con la puntuación en la escala de Epworth ( $p < 0,05$ ), de forma negativa con la saturación de O<sub>2</sub> basal ( $p < 0,01$ ), Saturación de O<sub>2</sub> media ( $p < 0,05$ ) y saturación de O<sub>2</sub> mínima ( $p < 0,01$ ) y de forma positiva con el porcentaje de tiempo con saturación de O<sub>2</sub> por debajo del 90% ( $p < 0,05$ ).

**Conclusiones:** A mayor somnolencia y más hipoxemia mayor aumento de la subunidad  $\beta 1$  del canal maxi k tras la CPAP. Tras el tratamiento disminuye la TAS Y TAD media, más evidente en el periodo nocturno. Existe una mejora en la función endotelial medida por flujimetría de láser doppler y por los marcadores solubles en plasma.

## 16. LA REDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD AMPK CONTRIBUYE A LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL PROVOCADA POR UNA DIETA RICA EN GRASA

C.F. García-Prieto<sup>1</sup>, F. Hernández Nuño<sup>1</sup>, D. del Río<sup>1</sup>, I. Aránguez<sup>2</sup>, M.S. Fernández Alfonso<sup>2</sup>, V. Cano<sup>1</sup>, M. Ruiz Gayo<sup>1</sup> y B. Somoza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU, Madrid.

<sup>2</sup>Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid.

**Introducción:** La proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) es uno de los principales sensores metabólicos. Presenta un papel clave en la regulación de la función vascular al aumentar la liberación de óxido nítrico endotelial e inhibir la actividad de la NADPH oxidasa de la pared arterial.

**Objetivos:** El objetivo de este estudio fue conocer si en estadios iniciales de obesidad inducida por dieta se modifica la actividad de la AMPK vascular.

**Métodos:** Se utilizaron ratas macho Sprague Dawley de 12 semanas de edad, alimentadas con dieta control (10 kcal% proceden de la grasa,  $n = 5$ ) o con dieta grasa (HF, 45 kcal% proceden de la grasa,  $n = 10$ ) durante 8 semanas. Tras una semana de dieta, los animales HF se dividieron en dos grupos según su incremento de peso corporal: i) ratas sensibles (OP,  $n = 5$ ) y ii) ratas resistentes (OR,  $n = 5$ ) a la obesidad. Se determinaron los lípidos totales en tejido adiposo lumbar (TAL), en tejido adiposo subcutáneo (TAS), en hígado y en corazón mediante el método descrito por Folch. Los estudios de función vascular se realizaron en la aorta torácica aislada. Para evaluar la participación de la AMPK en la función vascular se utilizó su inhibidor específico, el compuesto C (10-5M).

**Resultados:** Tras 8 semanas de dieta, los animales control y OR presentaron el mismo peso corporal, mientras que este fue significativamente mayor en los animales OP ( $p < 0,01$ ). Ninguno de los grupos presentó resistencia a insulina. Sí se observó un aumento muy significativo en los niveles de ácidos grasos libres en plasma (NEFA, mg/dl) tanto en los animales OP como OR, que se acompañó de un aumento de lípidos totales en el TAL ( $p < 0,05$ ), TAS y en el hígado ( $p < 0,001$ ). En los estudios de función vascular se observó: i) un incremento de la respuesta contráctil a noradrenalina (NA, 10-9-10-5 M) sólo en las ratas OP ( $p < 0,05$ ), ii) una reducción significativa de la respuesta dependiente de endotelio a acetilcolina (ACh, 10-9-10-4 M) en ambos grupos comparadas con las ratas control (E<sub>max</sub>control =  $88,9 \pm 1,5\%$  vs E<sub>max</sub>Op =  $78,2 \pm 2,5\%$  vs E<sub>max</sub>OR =  $74,4 \pm 1,7\%$ ,  $p < 0,001$ ) y iii) una reducción de la respuesta relajante independiente de endotelio a nitroprusiato sódico (SNP, 10-9-10-5 M) sólo en las ratas OR. En presencia del compuesto C (10-5 M), la relajación a ACh disminuyó significativamente en todos los grupos experimentales. Sin embargo, la diferencia en los valores del área bajo la curva (ABC) de la relajación a ACh en presencia y ausencia de compuesto C, que indirectamente refleja la actividad de la AMPK, fue significativamente menor en los animales OP y OR respecto al control (AUCcontrol = 30,4% vs AUCOp = 23,1% and AUCOR = 25,2%,  $p < 0,001$ ).

**Conclusiones:** Estos datos indican que el consumo de una dieta HF: i) incrementa el contenido lipídico tanto en tejidos adiposos como no adiposos y ii) reduce la actividad de la AMPK en la aorta, contribuyendo así al desarrollo de la disfunción endotelial. Estos efectos son independientes del aumento de peso corporal.

Financiado por SAF2008-02703, SAF2011-25303, GR921641, FUSP-CEU, SESCAME.

## 17. CARACTERIZACIÓN DE UNA REGIÓN IMPLICADA EN LA ESPECIFICIDAD DE LA ESPIRONOLACTONA POR EL RECEPTOR DE MINERALOCORTICOIDES

B. Martín Fernández<sup>1</sup>, Y. Yao<sup>2</sup> y P.J. Fuller<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid. <sup>2</sup>Prince Henry's Institute of Medical Research, Monash University, Clayton, Australia.

**Introducción:** La espirolactona es un antagonista del receptor de mineralocorticoides (RM) que se utiliza en el tratamiento de patologías como la hipertensión arterial y la insuficiencia cardíaca. Se ha demostrado que en el pez cebra (Danio rerio), la espirolactona actúa como un agonista del RM. El estudio de las diferencias entre el RM humano (RMh) y el del pez cebra (RMz) contribuiría favorablemente en la búsqueda de un antagonista específico de dicho receptor.

**Objetivos:** Identificar una secuencia clave implicada en el antagonismo del RM por la espirolactona a través del estudio de la estructura del receptor.

**Métodos:** Se construyeron las siguientes quimeras: 1) el RMh en el que se sustituyó el dominio de unión al ligando (LBD) por el del pez cebra, 2) la quimera humano-pez cebra del dominio LDB (RMh2568RMz2644) del RM, 3) la quimera humano-pez cebra del dominio LDB (RMh2856RMz2932) del RM y 4) la quimera humano-pez cebra del dominio LDB (RMh3015RMz3091) del RM. A través de ensayos de clonación se obtuvieron los plásmidos correspondientes a cada una de las quimeras que posteriormente se utilizaron en el ensayo de transfección celular. Se realizó un ensayo de transactivación para analizar la actividad del RM bajo diferentes tratamientos: se utilizaron células CV-1 las cuales fueron incubadas con los plásmidos correspondientes a cada quimera (0,25 µg/µL), el agente transfectante Eugene (0,25 µg/µL) y los plásmidos MMTV-Luciferasa (0,25 µg/µL) y Renilla (0,025 µg/µL) emisores de fluorescencia. Tras 24 horas, las células fueron incubadas con los tratamientos: control (medio celular), aldosterona 1nM, espirolactona 100 nM y aldosterona 1 nM + espirolactona 100 nM. A las 24 horas de incubación se midió la actividad de la luciferasa por luminiscencia para el ensayo de transactivación con un kit comercial que ofrece una medida de la actividad del RM.

**Resultados:** La espirolactona redujo ( $p < 0,05$ ) la actividad del RM incrementada ( $p < 0,05$ ) por la aldosterona en el ensayo de sobreexpresión del RMh. En el caso de la sobreexpresión del RMz, la espirolactona aumentó ( $p < 0,05$ ) la actividad aumento de la actividad del RM tras la incubación con aldosterona. La actividad del RM estaba aumentada ( $p < 0,05$ ) en la segunda quimera (RMh2568RMz2644).

**Conclusiones:** El dominio LBD confiere la diferencia de acción de la espirolactona en el RM entre los mamíferos y el pez cebra. Este análisis preliminar podría sugerir que esta diferencia recae específicamente en la región enmarcada entre los aminoácidos en la posición 2568 y 2856 del RM humano, dentro de la cual podría residir la especificidad estructural de la espirolactona por el receptor.

## 18. PAPEL DE LA ENDOTELINA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA AUMENTADA EXPRESIÓN VASCULAR DE COX-2 EN HIPERTENSIÓN. MODULACIÓN POR PPARGAMMA

R. Palacios Ramírez<sup>1</sup>, J.V. Pérez Girón<sup>1</sup>, A. Martín Cortés<sup>1</sup>, R. Hernanz Martín<sup>1</sup>, R.M. Aras López<sup>2</sup>, L. García Redondo<sup>2</sup>, M. Salaices Sánchez<sup>2</sup> y M.J. Alonso Gordo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Rey Juan Carlos, Alcorcón, Madrid. <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

**Introducción:** El aumento en los niveles de angiotensina II (AngII) podría contribuir al incremento en la producción de especies reac-

tivas de oxígeno (ROS) y a la mayor expresión de marcadores de inflamación vascular como ciclooxigenasa-2 (COX-2) observados en la hipertensión. Se ha propuesto que el péptido vasoactivo endotelina-1 (ET-1) es un mediador que explicaría algunos de los efectos hemodinámicos y patofisiológicos cardiovasculares inducidos por AngII. Los agonistas de los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR) poseen propiedades antiinflamatorias asociadas a la interferencia con rutas de señalización mediadas, entre otros, por el factor de transcripción redox-sensible NF-κB que participa en la regulación de la expresión de enzimas proinflamatorias como COX-2.

**Objetivos:** Analizar el papel de ROS y ET-1 en la expresión de COX-2 inducida por AngII y el efecto de los agonistas PPARγ en dicha participación. **Métodos:** Se utilizaron células de músculo liso vascular (CMLV) de aorta de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y segmentos aórticos de SHR y ratas Wistar Kyoto (WKY). La cuantificación de los niveles de ARNm de COX-2, ET-1 y NOX-1 se llevó a cabo por qRT-PCR, y la translocación de la subunidad de NF-κB p65 por western blot e inmunofluorescencia.

**Resultados:** Los niveles de ARNm de COX-2 fueron mayores en aorta de SHR que de WKY; el tratamiento de SHR con losartán (14 mg/Kg/día, 12 semanas) redujo estos niveles. En CMLV de SHR, AngII (0,1 µM, 2h) indujo la transcripción de COX-2, ET-1 y NOX-1, efecto que fue reducido con losartán (10 µM). La adición exógena de ET-1 (0,1 µM, 1h) también incrementó los niveles de ARNm de COX-2. El inhibidor de la NADPH oxidasa apocinina (30 µM) redujo la expresión de COX-2 inducida por AngII y el antagonista de los receptores ETA BQ123 (1 µM) redujo tanto la expresión de COX-2 como de NOX-1. El tratamiento con el inhibidor del proteosoma lactacistina (10 µM) abolió el incremento de COX-2 y NOX-1 inducido por Ang II. AngII y ET-1 incrementaron la translocación nuclear de p65; el incremento inducido por AngII fue reducido por BQ123. El activador PPARγ pioglitazona (10 µM) disminuyó los niveles de ARNm de NOX-1, ET-1 y COX-2 así como la translocación nuclear de p65 inducidos por AngII.

**Conclusiones:** AngII contribuye al incremento de la expresión de COX-2 observada en hipertensión. En CMLV de SHR, ET-1, a través del incremento de NOX-1 y la activación de NF-κB, contribuye al incremento en la expresión de COX-2 estimulada por AngII. La activación de PPARγ inhibe la inducción de COX-2 producida por AngII por disminuir los niveles de NOX-1 a través de la reducción en los niveles de ET-1, además de por mecanismos de transrepresión reduciendo la activación de NF-κB y, en último término, la inducción de COX-2.

Subvencionado por FMM, MICIN (SAF2009-07201) e Instituto de Salud Carlos III (Red RECAVA, RD06/0014/0011).

## 19. RIESGO DE PREECLAMPSIA Y POLIMORFISMO VAL158MET DE LA CATECOL-O-METILTRANSFERASA FETAL

M. Pertegal Ruiz<sup>2</sup>, M. Hernández García<sup>1</sup>, J.L. Hernández Pérez<sup>1</sup>, A. Martínez Ruiz<sup>4</sup>, J. Mendiola<sup>3</sup>, J.L. Delgado Marín<sup>2</sup>, V.M. Bosch Giménez<sup>5</sup>, J.F. Fenoy Palacios<sup>1</sup>, I. Hernández García<sup>1</sup> y B. Bonacasa Fernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Universidad de Murcia, Murcia.

<sup>2</sup>Servicio de Ginecología y Obstetricia, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia. <sup>3</sup>Departamento de Salud y Ciencias Sociales, Universidad de Murcia, Murcia. <sup>4</sup>Servicio de Laboratorio, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia. <sup>5</sup>Cirugía, Pediatría, Obstetricia y Ginecología, Universidad de Murcia, Murcia.

**Objetivos:** El polimorfismo Val158Met de baja actividad (Met/Met) de la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT) se asocia a reducción de los niveles de 2- metoxiestradiol (2ME), producto final de la enzima; deficiente placentación y disfunción endotelial, lo

que contribuye a la patogenia de la preeclampsia (PE). Para ello estudiamos la distribución de frecuencia en sangre fetal de madres preeclámpsicas y controles (C) de dicho polimorfismo, así como los niveles del metabolito 2ME y los factores involucrados en la enfermedad: factor de crecimiento placentario (Plgf) y la forma soluble del receptor tirosín quinasa-1 tipo fms (sFlt-1).

**Métodos:** Se ha realizado un estudio prospectivo con 54 pacientes con PE (presión arterial  $\geq 140/90$  mmHg en dos medidas repetidas con un intervalo de 4h después de la semana 20 de gestación junto a  $\geq 300$  mg de proteína en orina durante 24h o  $\geq 2+$  en tira reactiva en dos medidas repetidas entre 4h) y 72 mujeres control. El genotipado del polimorfismo Val158Met del gen COMT en sangre fetal se ha realizado PCR-RFLP. Los niveles séricos maternos del Plgf y sFlt-1 (Roche Diagnostics), y los niveles plasmáticos de 2-ME (Cayman) se han medido por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

**Resultados:** El valor OR para met/met vs val/met y val/val es 2,3 (0,862-6,063) con un p-valor = 0,075. Hay diferencias significativas en las concentraciones de 2ME entre casos ( $1.878,2635 \pm 183,52$  pg/ml) y controles ( $2.697,0294 \pm 188,341$  pg/ml) en el plasma materno ( $t = -3,050$ ,  $p = 0,003$ ). Los niveles de 2ME se correlacionan significativamente con los valores de sFlt-1 (correlación de Pearson =  $-0,230$ ;  $p < 0,05$ ) y con los valores de Plgf (correlación de Pearson =  $0,278$ ;  $p < 0,01$ ).

**Conclusiones:** Hay 2,3 veces más riesgo de presentar PE si el polimorfismo Val158Met fetal es homocigoto para metionina (de baja actividad). Los niveles de 2ME están significativamente disminuidos en el plasma materno de las preeclampsias y se correlaciona negativamente con los niveles séricos de sFlt-1 y positivamente de Plgf de forma significativa.

## 20. LA PREECLAMPSIA ALTERA EL TRANSPORTE DE L-CARNITINA EN VENA UMBILICAL HUMANA

C.M. Vázquez Cueto<sup>2</sup>, E. Guzmán Gutiérrez<sup>1</sup>, S. Zambrano Sevilla<sup>2</sup>, M.V. Ruiz Armenta<sup>2</sup>, A.J. Blanca Lobato<sup>2</sup>, C.F. Salomón Gallo<sup>1</sup>, P. Arroyo Zúñiga<sup>1</sup>, A. Mate Barrero<sup>2</sup>, A. Leiva Mendoza<sup>1</sup> y L. Sobrevía<sup>1</sup>

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

**Objetivos:** La preeclampsia (PE) es un síndrome del embarazo que cursa con un aumento en la presión arterial materna y disfunción endotelial placentaria. La L-carnitina posee, entre otras, propiedades antihipertensivas, aunque hasta ahora no se ha estudiado su efecto sobre la función endotelial ante una situación de PE. Se han descrito varios sistemas de transporte para la L-carnitina; sin embargo, su actividad en células endoteliales no ha sido aún demostrada. Por ello, en este trabajo se ha estudiado el efecto de la PE sobre las propiedades de transporte de L-carnitina usando el endotelio de vena umbilical humana (HUVEC).

**Métodos:** La captación de L-carnitina ( $1-40 \mu\text{M}$ ,  $5 \mu\text{Ci/mL}$ ,  $37^\circ\text{C}$ , 20-300 seg) fue determinada en cultivos primarios de HUVEC (pase 2) provenientes de embarazos normales y de embarazos que cursaron con PE.

**Resultados:** La captación de L-carnitina presentó componentes sodio-dependiente (velocidad inicial ( $v_i$ ) =  $0,244$  fmol/ $\mu\text{g}$  proteína/min) y sodio-independiente ( $v_i$  =  $0,064$  fmol/ $\mu\text{g}$  proteína/min) en HUVEC de embarazos normales. La PE se asocia con inhibición ( $\chi$ asi98%) del componente sodio-dependiente de captación de L-carnitina ( $v_i$  =  $0,0006$  fmol/ $\mu\text{g}$  proteína/min), sin alterar significativamente el componente sodio-independiente. El transporte sodio-dependiente de L-carnitina en  $v_i$  fue saturable en HUVEC de

embarazos normales (velocidad máxima ( $V_{\text{max}}$ ) =  $0,316$  fmol/ $\mu\text{g}$  proteína/min, Km aparente =  $10 \mu\text{M}$ ). Sin embargo, el transporte sodio-dependiente de este sustrato fue bloqueado completamente en HUVEC de embarazos con PE.

**Conclusiones:** El endotelio de las venas umbilicales de embarazos que cursan con PE pierde la capacidad de transporte sodio-dependiente de L-carnitina, lo que sugiere un posible papel de este compuesto en el control del tono vascular fetal.

**Agradecimientos:** Instituto de Salud Carlos III-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación, PN de I+D+I 2008-2011 (PS09/01395), Junta de Andalucía, Consejería de Salud (PI-0034), Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) (D/031187/10; A1/036123/11), CONICYT PIA (Anillos ACT-73)-Chile y FONDECYT 1110977/11110059 (Chile). EG-G y CS son alumnos becarios de doctorado CONICYT-Chile; PA es becario de doctorado de la Facultad de Medicina, PUC-Chile; SZ es becario de doctorado de la Facultad de Medicina (proyecto PI-0034 de la Consejería de Salud); AB disfruta de un contrato del Instituto de Salud Carlos III-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación, PN de I+D+I 2008-2011 (PS09/01395).

## 21. LA LEPTINA INDUCE FIBROSIS Y ESTRÉS OXIDATIVO EN EL CORAZÓN

E. Martínez<sup>1</sup>, M. Miana<sup>1</sup>, R. Jurado<sup>1</sup>, M. Valero-Muñoz<sup>1</sup>, M. Luaces<sup>2</sup>, N. Gómez-Hurtado<sup>3</sup>, A. Briones<sup>4</sup>, M.V. Bartolomé<sup>5</sup>, V. Lahera<sup>1</sup> y V. Cachafeiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid. <sup>2</sup>Servicio de Cardiología, Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid. <sup>3</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid. <sup>4</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid. <sup>5</sup>Departamento de Oftalmología y Otorrinolaringología, Facultad de Psicología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

**Introducción y objetivos:** La leptina juega un papel central en la regulación de la ingesta y en el balance energético. El principal lugar de producción de la leptina es el tejido adiposo pero también puede producirse en otros tejidos como el corazón y sus niveles aumentan a medida que aumenta el peso corporal. Aunque se ha sugerido que la leptina puede representar un factor de riesgo independiente para el desarrollo de enfermedad isquémica cardíaca, sus efectos cardíacos no están bien establecidos ya que se han descritos también efectos protectores sobre la estructura y sobre la función cardíaca. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos cardíacos de la leptina con especial interés sobre la fibrosis y el estrés oxidativo, así como los posibles mecanismos involucrados.

**Métodos:** Se midió el efecto de la leptina ( $10-100$  ng/ml) sobre la expresión proteica de colágeno I, CTGF, TGF- $\beta$  y galectina-3 en cardioblastos (CF) aislados de rata adulta (pase 2-3), en presencia o ausencia de melatonina ( $10^{-6}$ M), factor antioxidante y de rapamicina ( $100$  nM), inhibidor de la vía mTOR. Se estudió el efecto proliferativo de la leptina sobre los CF. Asimismo, se valoró el efecto prooxidante de la leptina midiendo la producción de aniones superóxido in situ mediante la técnica de fluorescencia-inducida por dihidroetidio (DHE). Se estudió, además, los niveles proteicos de leptina, CTGF, TGF- $\beta$  y galectina-3 en corazones de ratas Wistar adultas con sobrepeso inducido por dieta (alimentadas con dieta con 33% grasa). Se valoró también la función cardíaca mediante ecocardiografía y los niveles de colágeno total mediante tinción con rojo Sirio. Finalmente se midió la producción de aniones superóxido mediante la técnica de fluorescencia inducida por DHE.

**Resultados:** La leptina aumentó los niveles de colágeno I de manera dosis y tiempo dependiente ( $p < 0,05$ ) alcanzándose los valo-

res máximos a la dosis de 100 ng/ml a las 24 horas de estimulación ( $p < 0,05$ ). El efecto fibrótico inducido por la leptina se inhibió en la presencia tanto de melatonina como de rapamicina ( $p < 0,05$ ). El aumento de colágeno se asoció con un aumento de los niveles de CTGF, TGF- $\beta$  y de galectina-3 ( $p < 0,05$ ). La presencia de leptina en el medio de incubación no fue capaz de modificar la proliferación de los CF. La leptina fue capaz de aumentar la intensidad de fluorescencia en presencia de DHE de manera dosis-dependiente ( $p < 0,001$ ), sugiriendo un aumento en la producción de aniones superóxido, efecto que se revierte con el tratamiento con melatonina o con rapamicina ( $p < 0,001$ ). En comparación con las ratas controles, los corazones de las ratas con sobrepeso presentaron un aumento en los niveles de leptina, TGF- $\beta$  y de galectina-3 ( $p < 0,05$ ) así como de la fracción de volumen de colágeno ( $p < 0,05$ ) aunque no se observaron diferencias ni en el CTGF, ni en la FEVI, PP, PPS, SIV, DTDVI o DTSVI. También se observó un aumento en los niveles de aniones superóxido ( $p < 0,05$ ).

**Conclusiones:** La leptina producida localmente en el corazón puede participar en la fibrosis y el estrés oxidativo observado en animales obesos. Este efecto fibrótico parece estar mediado por un aumento de estrés oxidativo a través de la activación de la vía mTOR y mediante el aumento de factores profibróticos como la galectina-3, el CTGF y el TGF- $\beta$ .

## 21B. LA PROTEÍNA REGULADORA DE CALCINEURINA 1 (RCAN1) PARTICIPA EN EL DESARROLLO DE LA PLACA DE ATEROMA

N. Méndez Barbero<sup>1</sup>, V. Esteban Vázquez<sup>1</sup>, V. Andrés<sup>1</sup>, M.R. Campanero<sup>2</sup> y J.M. Redondo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, Madrid.

El remodelado de la pared arterial es una de las características más importantes de enfermedades cardiovasculares. El estudio de moléculas involucradas en estos mecanismos de remodelado vascular supone un avance en la mejora de tratamientos para estas patologías. En trabajos previos recientemente publicados hemos demostrado la importancia de RCAN1 (regulador de calcineurina) como molécula implicada en el desarrollo de aneurismas abdominales aórticos y en procesos de restenosis. El objetivo de nuestro trabajo actual es analizar el papel de la proteína RCAN1 en otra patología cardiovascular que cursa remodelado vascular como es el caso de la aterosclerosis. Para analizar el papel de RCAN1 en esta patología hemos utilizado el modelo de inducción de aterosclerosis en ratones deficientes en la proteína ApoE por medio de dieta rica en colesterol. En el estudio de la placa de ateroma a nivel aórtico y también en válvulas aórticas, hemos determinado que ratones ApoE<sup>-/-</sup>-RCAN1<sup>-/-</sup> desarrollan menos placa de ateroma después de ser alimentados con dieta rica en colesterol que ratones ApoE<sup>-/-</sup>-RCAN1<sup>+/+</sup> usados como control. Además, esta reducción de la placa de ateroma observada en ratones ApoE<sup>-/-</sup>-RCAN1<sup>-/-</sup> puede ser debido a un retraso en la formación de la placa, como muestran tinciones específicas para células de musculatura lisa vascular (CMLV), macrófagos y colágeno. Ratones ApoE<sup>-/-</sup>-RCAN1<sup>-/-</sup> presentan placas menores y con mayor porcentaje de macrófagos y CMLV. Por su parte los animales ApoE<sup>-/-</sup>-RCAN1<sup>+/+</sup> muestran un contenido de colágeno mayor con menor cantidad de macrófagos y CMLVs. Con el objetivo de esclarecer si la proteína RCAN1 en el componente hematopoyético tiene algún papel en el desarrollo del ateroma, se realizaron experimentos de trasplante de médula ósea. Los resultados de estos experimentos muestran que animales reconstruidos con células hematopoyéticas deficientes en RCAN1 presentan placas de ateroma de menor tamaño. Estudios preliminares de macrófagos "in vitro" indican que la ausencia de RCAN1 provoca una deficiencia en los procesos de absorción de LDL oxidadas a

concentraciones fisiológicas de 0,25, 0,125 ug/ml. Nuestros resultados muestran que la proteína RCAN1 expresada en macrófagos está implicada en el desarrollo de placa de ateroma, identificándolo así como una diana potencial para la prevención de la enfermedad aterosclerótica.

## 22. LEPTINA INDUCE HIPERTROFIA Y REGULA EL CANAL DE POTASIO KV4.2 EN CARDIOMIOCITOS ADULTOS DE RATA

N. Gómez Hurtado<sup>1</sup>, M. Fernández Velasco<sup>2</sup>, L. Boscá Gomar<sup>3</sup>, V. Lahera Julia<sup>4</sup>, V. Cachofeiro Ramos<sup>4</sup> y C. Delgado Canencia<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina UCM, Madrid. <sup>2</sup>Hospital La Paz, IdiPAZ, Madrid. <sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (Centro Mixto CSIC-UAM), Madrid. <sup>4</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina UCM, Madrid. <sup>5</sup>Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid.

**Introducción:** Leptina es un péptido de 16 KDa. Sus principales funciones son la regulación del balance energético y del apetito. Distintos estudios clínicos han puesto de manifiesto una asociación entre hiperleptinemia, obesidad e hipertrofia cardíaca (HC). Estos datos son consistentes con estudios in vitro que sugieren que leptina induce hipertrofia en cardiomiocitos neonatales. La HC aparece como una respuesta adaptativa pero a medio largo plazo predispone a la aparición de isquemia, arritmias e insuficiencia cardíaca. Está bien establecido que los corazones hipertroáficos muestran alteraciones en la expresión o función de ciertos canales iónicos lo que les hace más sensibles a desarrollar arritmias graves. Entre ellos destacaríamos la regulación a la baja del canal de K<sup>+</sup>, Kv4.2 y la reexpresión en el ventrículo del canal de Ca<sup>2+</sup> tipo T, Cav3.1 y 3.2. Dado el interés clínico que tendría conocer los mecanismos implicados en el efecto hipertrofico de leptina y su papel en el remodelado eléctrico de los cardiomiocitos adultos, el objetivo del presente estudio fue analizar las rutas de señalización implicadas en los efectos prohipertroáficos de leptina, así como el posible efecto de esta citoquina sobre los canales iónicos cardíacos.

**Métodos:** Se aislaron cardiomiocitos ventriculares de corazones de ratas adultas mediante disociación enzimática y se incubaron 48h con 6 nM de leptina. Posteriormente se midió el área de los cardiomiocitos en  $\mu\text{m}^2$  y las capacitancias celulares. La expresión génica se analizó mediante qRT-PCR y la expresión proteica mediante Western blot. Finalmente, la corriente transitoria de K<sup>+</sup> característica del canal Kv4.2 (Ito) se midió usando la técnica de parche de membrana en su configuración de célula entera.

**Resultados:** Los cardiomiocitos incubados durante 48h con leptina (6 nM) presentaron un incremento significativo de la superficie celular ( $p < 0,001$ ) y de la capacitancia de membrana ( $p < 0,05$ ) y un aumento de la expresión de genes hipertroáficos como la cadena pesada de la  $\beta$ -miosina. Leptina indujo la activación de Akt, mTOR y STAT-3. El bloqueo de Akt con triciribina y de mTOR con rapamicina, previno el aumento de la superficie celular inducido por leptina. Los cardiomiocitos tratados 48h con leptina, no mostraron reexpresión del canal de calcio tipo T (Cav3.1 y 3.2) pero sorprendentemente mostraron un aumento de la expresión del canal de potasio Kv4.2. El análisis mediante patch-clamp de Ito mostró que tanto la amplitud como la densidad de esta corriente se encontraban significativamente elevadas en los cardiomiocitos tratados. Asimismo, la preincubación de los cardiomiocitos con triciribina pero no con rapamicina previno ambos efectos.

**Conclusiones:** Nuestros resultados demuestran que leptina a través de la activación de la vía de Akt/mTOR es capaz de inducir hipertrofia en los cardiomiocitos adultos. Además, es capaz de aumentar la expresión y la función del canal de potasio Kv4.2 a través de un mecanismo que requiere la activación de Akt. Este hallazgo sugiere que leptina podría ejercer un efecto protector sobre el

corazón al compensar la caída en la reserva de potasio asociada al desarrollo de HC patológica que acompaña a las complicaciones de la obesidad (hipertensión, diabetes), haciendo al corazón menos proclive a la aparición de arritmias.

### 23. IMPLICACIÓN DE LA CARDIOTROFINA-1 EN EL SÍNDROME CARDIO-VÁSULO-RENAL

N. López Andrés<sup>1</sup>, A. Rousseau<sup>1</sup>, L. Calvier<sup>1</sup>, C. Labat<sup>1</sup>, J. Díez<sup>2</sup>, F. Zannad<sup>1</sup>, P. Lacolley<sup>1</sup> y P. Rossignol<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inserm U961, Nancy, Francia. <sup>2</sup>CIMA, Pamplona.

**Introducción:** La expresión de cardiotrofina-1 (CT-1), una citoquina de la familia de la interleuquina-6, aumenta en la hipertensión y en la insuficiencia cardíaca (IC). Este trabajo investiga el efecto de la CT-1 en ratas normotensas a tres niveles: molecular, celular y geométrico, y sus consecuencias sobre las funciones cardíaca, vascular y renal.

**Métodos:** Se trataron ratas Wistar con CT-1 (20 µg/Kg/día) o vehículo durante 6 semanas. Las funciones cardíacas y vasculares se analizaron in vivo mediante ecocardiografía, Doppler y ecotracking, y ex vivo por microscopía electrónica acústica. La histomorfología cardiovascular y renal se analizó mediante inmunohistoquímica, RT-PCR y Western Blot. La función renal se evaluó mediante la creatinina sérica, la relación microalbuminuria/creatininuria y la lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos (NGAL).

**Resultados:** En ausencia de modificaciones de la presión arterial, el tratamiento con CT-1 aumentó los volúmenes ventriculares, disminuyó la fracción de acortamiento y la fracción de eyección y provocó una dilatación miocárdica acompañada de fibrosis. En la aorta de ratas tratadas con CT-1, la curva módulo elástico/estrés parietal indicó un aumento en la rigidez arterial que fue confirmado por el aumento en la velocidad acústica del sonido. Las ratas tratadas con CT-1 presentaron un aumento en el espesor de la pared vascular y su contenido en colágeno y fibronectina. El tratamiento con CT-1 no modificó la creatinina sérica pero aumentó la relación microalbuminuria/creatininuria y NGAL, así como la fibrosis tubulointersticial y glomerular.

**Conclusiones:** La CT-1 es un nuevo agente profibrótico en corazón, vaso y riñón que induce una disfunción cardio-vásculo-renal independientemente de la presión arterial. Por ello, la CT-1 puede ser una nueva diana terapéutica que integra simultáneamente las alteraciones cardíacas, vasculares y renales en los estadios precoces de la IC.

### 24. EFECTO ANTIHIPERTENSIVO Y CARDIOPROTECTOR DE LA L-CARNITINA EN RATAS TRATADAS CON SUNITINIB

M.V. Ruiz Armenta<sup>1</sup>, S. Zambrano Sevilla<sup>1</sup>, A.J. Blanca Lobato<sup>1</sup>, M.T. Monserrat García<sup>2</sup>, J.L. Arias Jiménez<sup>2</sup>, A. Mate Barrero<sup>1</sup>, O. Aramburu Bodas<sup>2</sup> y C.M. Vázquez Cueto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología y Zoología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla. <sup>2</sup>Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla.

**Objetivos:** El sunitinib (inhibidor de la tirosina kinasa), está indicado actualmente para el tratamiento del carcinoma renal avanzado y de los tumores gastrointestinales estromales. Muchos trabajos relacionan el uso de este fármaco con la aparición de hipertensión arterial (HTA). Estudios previos de nuestro grupo de investigación han puesto de manifiesto las propiedades antihipertensiva y antioxidante de la L-carnitina (LC) en la HTA. En este trabajo pretendemos analizar el efecto cardioprotector de la LC sobre la cardiotoxicidad del sunitinib, estudiando las cifras de tensión arterial y los parámetros de estrés oxidativo.

**Métodos:** El estudio se ha realizado en ratas Wistar de peso 280-350 g, divididas en cuatro grupos: (1) controles normotensas; (2) ratas tratadas con sunitinib (25 mg/Kg/día); (3) ratas tratadas con LC (400 mg/Kg/día) y (4) ratas tratadas con sunitinib más LC. La duración del tratamiento con sunitinib en los grupos (2) y (4) ha sido de 8 semanas. La LC, en los grupos (3) y (4), se ha administrado durante 10 semanas, comenzando el tratamiento 2 semanas antes de la administración de sunitinib. Se ha realizado un seguimiento semanal de las cifras de presión arterial y frecuencia cardíaca. Al finalizar el tratamiento, los animales se sacrifican previa extracción de sangre por punción cardíaca. Esta sangre se utiliza para la determinación de las actividades de las enzimas antioxidantes: glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y superóxido dismutasa (SOD). Posteriormente, se extirpa el corazón, se aísla el ventrículo izquierdo y se pesa, congelándolo a -80°C. Tras obtener los homogeneizados de corazón, se procede al estudio de las actividades de las enzimas antioxidantes y de la peroxidación lipídica.

**Resultados:** El peso del corazón aumenta de forma significativa tras el tratamiento con sunitinib, lo que demuestra la presencia de un corazón hipertrofiado (hipertrofia que desaparece tras el tratamiento simultáneo con LC). La presión sistólica, diastólica y la frecuencia cardíaca aumentan significativamente tras el tratamiento con sunitinib, mientras que la administración simultánea de LC restaura los valores de presión sanguínea y reduce significativamente la frecuencia cardíaca. Además, las actividades de las enzimas antioxidantes medidas en sangre disminuyen significativamente tras el tratamiento con sunitinib, alteración que se revierte, en el caso de GPx y GR, con el tratamiento simultáneo con LC. Por su parte, los estudios realizados sobre los homogeneizados de corazón muestran una disminución significativa en las actividades de las enzimas GPx y SOD en las ratas tratadas con sunitinib, con respecto a las ratas controles normotensas. De nuevo, estas actividades aumentan tras el tratamiento simultáneo con LC. La actividad de la GR, por otro lado, no se ve modificada en el corazón de los cuatro grupos experimentales de animales. Finalmente, la peroxidación lipídica aumenta en las ratas tratadas con sunitinib, normalizándose los valores en el grupo sometido a tratamiento simultáneo con LC.

**Conclusiones:** La terapia combinada sunitinib + L-carnitina reduce la hipertrofia cardíaca y la hipertensión inducidas por el sunitinib. Por otro lado, la L-carnitina es capaz de mejorar, a nivel sistémico y cardíaco, el daño oxidativo, atribuible al sunitinib, lo que implica al estrés oxidativo como uno de los mecanismos fisiopatológicos responsables de la cardiotoxicidad asociada al tratamiento con sunitinib.

### 25. PAPEL DEL MICRORNA-133A EN LA REGULACIÓN DE ANGIOTENSINOGENO EN LA MIOCARDIOPATÍA DIABÉTICA EXPERIMENTAL

E. Ramírez<sup>1</sup>, S. Ares<sup>1</sup>, R. Bragado<sup>1</sup>, B. Picatoste<sup>1</sup>, A. Caro<sup>2</sup>, J. Tuñón<sup>1</sup> y O. Lorenzo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IIS-Fundación Jiménez Díaz, Madrid. <sup>2</sup>Facultad de Veterinaria, UCM, Madrid.

**Introducción:** Los miRs son importantes reguladores de la expresión génica, degradando el RNA mensajero específico o inhibiendo su traducción. Algunos de ellos participan en el desarrollo de hipertrofia y fibrosis cardíaca, las cuales están reguladas por el sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). El precursor de este sistema, angiotensinógeno (Agt), es un potencial gen diana de miR-133a.

**Objetivos:** Estudiar el potencial papel del microRNA (miR)-133a en la miocardiopatía diabética.

**Métodos:** Veinte ratas obesas/diabéticas tipo-II (ZDF) y sus respectivos controles (n = 10 por grupo) se examinaron por ecocardiograma-Doppler a las 28 semanas de edad. Posteriormente se extra-

jo plasma y se aisló el ventrículo izquierdo (VI) para estudios de histología, Q-PCR y Western-Blot. La línea celular de cardiomiocitos adultos, H9c2, se utilizó para los estudios in vitro.

**Resultados:** Las ratas ZDF presentaron hiperglicemia e hiperlipidemia, sin cambios en la presión arterial. Por Eco-Doppler, además mostraron un elevado grosor del septo interventricular (2,4 vs 1,8 mm,  $p < 0,01$ ) y un diámetro diastólico reducido (0,51 vs 0,71 mm,  $p < 0,01$ ) del VI. El miocardio presentaba hipertrofia celular y fibrosis intersticial, incremento de la expresión de miR-133a (2,12 veces vs control,  $p < 0,05$ ) y reducción del mRNA (0,29-fold,  $p < 0,01$ ) y proteína de Agt (0,82-fold,  $p < 0,05$ ). En cultivos de cardiomiocitos, la incubación con alta concentración de ácido palmítico (PA) redujo la expresión del mRNA (0,14-fold vs control,  $p < 0,05$ ) y proteína (0,59-fold) de angiotensinógeno, mientras que estimuló la de miR-133a (7,06-fold vs control,  $p < 0,05$ ). Además, la transfección del anti-miR-133a en cardiomiocitos incubados con PA revirtió este efecto.

**Conclusiones:** La diabetes tipo-II puede ejercer un efecto directo sobre el miocardio, induciendo fenómenos de hipertrofia y fibrosis. Sin embargo, la sobre-expresión de miR-133a podría controlar estos procesos a través de la atenuación de la expresión de Agt, como mecanismo cardioprotector.

## 26. CARDIOPROTECCIÓN EN EL DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN: ESTIMULACIÓN DE LOS RECEPTORES $\beta_3$ ADRENÉRGICOS

D. Sanz-Rosa<sup>1</sup>, J. García-Prieto Cuesta<sup>1</sup>, A. Osuna Gálvez<sup>1</sup>, V. Fuster Carulla<sup>1,3</sup> y B. Ibáñez Cabeza<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Imagen en Cardiología Experimental, CNIC, Madrid. <sup>2</sup>Hospital Clínico San Carlos, Madrid. <sup>3</sup>Mount Sinai, School of Medicine, Nueva York, EE.UU.

**Introducción:** Recientemente se han identificado los receptores  $\beta_3$  adrenérgicos ( $\beta_3$ AR) en el corazón. Cuando se estimulan con catecolaminas, los  $\beta_3$ AR ejercen un efecto inotrópico negativo. Asimismo existen evidencias de que dicha estimulación podría aumentar los niveles de óxido nítrico (NO). Se ha demostrado que la estimulación de los  $\beta_3$ AR ejerce un efecto beneficioso en modelos animales de insuficiencia cardíaca. Sin embargo el papel de los  $\beta_3$ AR en isquemia y reperfusión no ha sido explorado hasta el momento.

**Métodos y resultados:** Cuando se expusieron las células HL1 (línea celular de cardiomiocitos) a periodos de 6h de hipoxia y 18h de reoxigenación, se observó un descenso significativo en la viabilidad celular acompañado por un aumento significativo del proceso apoptótico (analizados por citometría de flujo, western blot e inmunofluorescencia con caspasa 3 truncada). El tratamiento de los cardiomiocitos con el agonista selectivo del  $\beta_3$ AR (BRL-37344; 5-100  $\mu$ M) aumentó significativamente la supervivencia celular en un 25% y redujo un 20% la población de células apoptóticas. La cardioprotección conseguida por la estimulación  $\beta_3$ AR podría mediada por JNK ya que el tratamiento de las HL-1 con el inhibidor específico de las JNK (SP600125; 10  $\mu$ M) bajo estimulación de los  $\beta_3$ AR anula el efecto cardioprotector del BRL. Sin embargo no se ha podido demostrar que el NO esté implicado en tal mecanismo ya que aunque se ha visto un aumento en la fosforilación en la S-1177 de la eNOS, el co-tratamiento de los cardiomiocitos con BRL y el inhibidor de la NOS, L-NAME (0,5-1 mM), proporcionó la misma cardioprotección que el agonista administrado solo. Posteriormente, se sometieron ratones C57/bl6 a 45 minutos de oclusión de la arteria coronaria seguidos de 24h de reperfusión. Diez minutos antes de la reperfusión se administró BRL-37344 a una concentración de 5  $\mu$ g/kg o vehículo por vía intravenosa. El análisis de los corazones mostró una reducción significativa del tamaño de infarto (normalizado respec-

to al área en riesgo) en aquellos animales que recibieron el agonista  $\beta_3$ AR antes de la reperfusión. Para confirmar que dicha cardioprotección era mediada por los  $\beta_3$ AR, se realizó el mismo procedimiento de isquemia/reperfusión en ratones  $\beta_3$ AR KO. Al evaluar el área de infarto no se observaron diferencias significativas entre los ratones KO y los controles.

**Conclusiones:** Los  $\beta_3$ AR juegan un papel cardioprotector durante la isquemia y reperfusión, convirtiéndose en una prometedora diana terapéutica.

## 27. EL EJERCICIO FÍSICO MEJORA EL REMODELADO Y LA FUNCIÓN VASCULARES EN HIPERTENSIÓN. PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO

A.M. Briones<sup>1</sup>, F.R. Roque<sup>1</sup>, A.B. García Redondo<sup>1</sup>, M. Galán<sup>1</sup>, M.S. Avendaño<sup>1</sup>, S. Martínez Revelles<sup>1</sup>, A. Aguado<sup>1</sup>, V. Cachofeiro<sup>2</sup>, D.V. Vassallo<sup>3</sup> y M. Salaces<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid. <sup>2</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid. <sup>3</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.

**Introducción:** La práctica regular de ejercicio físico se considera una terapia no farmacológica efectiva en la prevención y control de la hipertensión.

**Objetivos:** Este estudio investiga los efectos del ejercicio físico aeróbico en el remodelado vascular y en las alteraciones funcionales y mecánicas de arterias coronarias y mesentéricas de resistencia de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) así como los mecanismos responsables de dichos efectos.

**Métodos:** Se utilizaron ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY), SHR y SHR-entrenadas (cinta de correr, 12 semanas) y se estudiaron las propiedades estructurales y mecánicas mediante miografía de presión, la función vascular con un miógrafo de alambres, la producción de anión superóxido mediante tinción con dihidroetidio y microscopía confocal, la expresión proteica mediante western blot, la estructura de elastina mediante microscopía confocal, la deposición de colágeno mediante tinción con rojo sirio y la presión arterial mediante pletismografía en la arteria caudal.

**Resultados:** El entrenamiento físico no afectó al remodelado vascular de arterias coronarias y mesentéricas de ratas SHR pero redujo la incrementada rigidez y la aumentada deposición de colágeno y normalizó la disminuida expresión de la metaloproteinasa de matriz 9 así como la alterada organización de elastina. En arterias coronarias de SHR, el entrenamiento físico no afectó a las respuestas contráctiles a KCl, al análogo del tromboxano A2 U46619 o a 5-HT pero mejoró la empeorada relajación inducida por acetilcolina (ACh). El entrenamiento también normalizó las incrementadas respuestas vasoconstrictoras inducidas por U46619 y por elevadas concentraciones de ACh observadas en arterias mesentéricas de SHR. Además, el entrenamiento: 1) redujo la producción vascular de anión superóxido y aumentó la de óxido nítrico y 2) redujo el efecto del inhibidor de la NADPH oxidasa apocinina sobre en las respuestas vasoconstrictoras y vasodilatadoras mientras que aumentó el efecto del inhibidor de la sintasa de óxido nítrico L-NAME. El entrenamiento físico también redujo en parte la presión arterial.

**Conclusiones:** Nuestros resultados demuestran que el ejercicio físico mejora las alteraciones funcionales y mecánicas observadas en arterias coronarias y mesentéricas de ratas hipertensas, disminuye el estrés oxidativo e incrementa la disponibilidad de óxido nítrico. Estos datos aportan evidencias adicionales de los efectos beneficiosos del ejercicio físico en el sistema vascular.

## 28. PAPEL DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA EN LA REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL POR ENDOGLINA SOLUBLE

B. Ojuo González<sup>1</sup>, M. González Núñez<sup>1</sup>, F. Pérez Barriocanal<sup>1</sup>, M. Arévalo<sup>2</sup>, C. Bernabeu<sup>3</sup> y J.M. López Novoa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Fisiopatología Renal y Cardiovascular, Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca, Salamanca. <sup>2</sup>Unidad de Fisiopatología Renal y Cardiovascular, Departamento de Anatomía e Histología Humana, Universidad de Salamanca, Salamanca. <sup>3</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid.

La preeclampsia es una patología que se presenta en el 5% de los embarazos y que se caracteriza por una elevación de la presión arterial y una marcada proteinuria en el tercer trimestre de embarazo. La endoglina (Eng) es una glicoproteína de membrana que actúa como receptor auxiliar en la vía de señalización de TGF $\beta$ , en algunas circunstancias es separada de la membrana apareciendo como endoglina soluble en suero (sEng). Estudios previos de nuestro laboratorio han descrito el papel de las isoformas de endoglina de membrana en la regulación de la presión arterial (Jerkic et al, FASEB J. 2004; Circ Res. 2006; Blanco et al. Circ Res. 2008). Varios autores han descrito el aumento de sEng y del receptor soluble de VEGF, sFlt-1, en el suero de mujeres con preeclampsia. El objetivo de nuestro estudio se centró en analizar la implicación de la sEng en el incremento de presión arterial descrito en la preeclampsia. Para ello se ha puesto a punto un modelo de ratones transgénicos que sobreexpresan la forma soluble de endoglina humana bajo el control de un promotor ubicuo, lo que hace que aumente mucho la concentración de sEng en plasma (sEng+). La presión arterial se ha medido por telemetría, técnica que nos permite registrarla en animales despiertos y con total movilidad. Los ratones sEng+ tienen una presión arterial mayor (PAS: 140  $\pm$  3 mmHg; PAD: 110  $\pm$  2 mmHg; n = 5) que sus Controles (PAS: 106  $\pm$  2 mmHg; PAD: 84  $\pm$  7 mmHg; n = 5). Presentan también una elevada proteinuria y alteraciones estructurales renales (cilindros intratubulares e infiltración intersticial). Se estudió la posible contribución del sistema renina angiotensina (SRA) a la hipertensión que presentaban estos animales. Para ello se les administró un inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina captopril (100 mg/L) y un inhibidor de los receptores AT1: losartán (150 mg/L), durante 5 días en agua de bebida. Dicho tratamiento produjo una mayor respuesta hipotensora en los ratones sEng+ que en los controles. También se administró angiotensina II (0,8 mg/Kg, ip), observando que los ratones sEng+ presentaban una menor respuesta hipertensora. Estos resultados parecen implicar al SRA en la hipertensión que presentan los ratones que sobreexpresan endoglina soluble.

## 29. EL TRATAMIENTO CON ROSUVASTATINA MEJORA LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA EN UN MODELO DE SOBREPESO INDUCIDO POR DIETA GRASA. PAPEL DE LA LEPTINA, SIRT-1, PPAR-G Y GLUT-4

M. Valero-Muñoz, S. Ballesteros, B. Martín-Fernández, V. Cachofeiro, V. Lahera y N. de las Heras

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

**Objetivos:** Estudiar los efectos del tratamiento con rosuvastatina sobre la resistencia a la insulina en un modelo de sobrepeso inducido por dieta, así como los mediadores y mecanismos implicados.

**Métodos:** Se utilizaron ratas macho Wistar de 250-300 g de peso, alimentadas con dieta estándar (CT) o con una dieta con alto contenido en grasa (33,5% del contenido calórico) durante 7 semanas (SBP). La mitad de los animales SBP fueron tratados con rosuvasta-

tina (15 mg/Kg/día) (SBP+ROSU) durante las 7 semanas del estudio. El grupo de ratas alimentadas con dieta estándar se utilizó como referencia de condiciones de normalidad.

**Resultados:** Las ratas alimentadas con la dieta grasa presentaron un aumento del peso corporal ( $p < 0,05$ ), del tejido adiposo blanco epididimal ( $p < 0,001$ ) y del lumbar ( $p < 0,001$ ), sin observarse cambios en el peso del tejido adiposo marrón. El tratamiento con rosuvastatina disminuyó ligeramente el peso del tejido adiposo lumbar en las ratas SBP. Los niveles plasmáticos de glucosa e insulina aumentaron en las ratas SBP respecto a los animales CT ( $p < 0,05$ ), y como consecuencia, el índice HOMA de resistencia a la insulina fue superior en este grupo ( $p < 0,01$ ). El tratamiento con rosuvastatina redujo significativamente los niveles plasmáticos de glucosa, insulina y el índice HOMA. La expresión proteica de sirtuina-1 (SIRT-1), del receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma (PPAR- $\gamma$ ) y del transportador de glucosa 4 (GLUT-4) en tejido adiposo blanco fue menor ( $p < 0,05$ ) en ratas SBP respecto a los animales CT. El tratamiento con rosuvastatina normalizó ( $p < 0,05$ ) la expresión proteica de estos tres mediadores. El cociente de las concentraciones plasmáticas de leptina/adiponectina fue mayor en las ratas SBP vs CT ( $p < 0,001$ ); la rosuvastatina redujo dicho cociente ( $p < 0,01$ ). Asimismo, la expresión proteica, en tejido adiposo blanco lumbar, de leptina fue mayor en ratas SBP ( $p < 0,05$ ), y el tratamiento con rosuvastatina normalizó este parámetro. Los niveles de adiponectina fueron menores en las ratas alimentadas con dieta grasa ( $p < 0,05$ ), y no se modificaron con el tratamiento.

**Conclusiones:** El tratamiento con rosuvastatina mejora la sensibilidad a la insulina en ratas con sobrepeso inducido por dieta con alto contenido en grasa. Este efecto está mediado por varios mecanismos como la reducción de los niveles de leptina y el aumento en la expresión de SIRT-1, PPAR- $\gamma$  y GLUT-4 en tejido adiposo blanco. SIRT-1 podría considerarse un importante mediador de los efectos beneficiosos de la rosuvastatina sobre la sensibilidad a la insulina en ratas con sobrepeso inducido por dieta.

## 30. EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE TEJIDO CONECTIVO (CTGF) MODULA LA RUTA SMAD ACTIVANDO SMAD2 DE MANERA INDEPENDIENTE DE TGF-BETA. POSIBLE PAPEL DE ESTA RUTA EN LA INFLAMACIÓN VASCULAR

M. Orejudo del Río, R.R. Rodríguez Díez, R. Rodríguez Díez, M. Alique, C. Lavoz, S. Rayego Mateos, J.L. Morgado Pascual, A. Ortiz, J. Egido y M. Ruiz Ortega

Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

La ruta de activación de los factores de transcripción citosólicos Smad2/3/4, está asociada con procesos fibróticos inducidos por el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). La ruta clásica TGF- $\beta$ /Smad incluye la activación y formación del heterodímero Smad2/Smad3 fosforilado, su unión con Smad4 y la translocación del complejo al núcleo. Datos recientes cuestionan las funciones concretas que desempeñan Smad2 y Smad3. Aunque se ha demostrado que Smad3 participa en procesos de crecimiento celular, diferenciación, apoptosis, fibrosis e inflamación, la función de Smad2 en estos procesos no está bien definida. Así, se ha descrito que la activación de Smad2 tiene un efecto protector frente a la fibrosis mediada por TGF- $\beta$  ya que neutraliza la señalización TGF- $\beta$ /Smad3. Una de las principales proteínas relacionadas con TGF- $\beta$  es el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), el cual está descrito como un mediador de la fibrosis vascular inducida por TGF- $\beta$ . Estudios en modelos experimentales de daño vascular han demostrado que TGF- $\beta$  tiene propiedades anti-inflamatorias. Sin embargo, nuestro grupo ha observado que CTGF in vivo activa una respuesta inflamatoria rápida a nivel vascular, lo que sugiere que CTGF puede

tener otras funciones, independientes de las descritas como mediador de TGF- $\beta$ . Nuestro principal objetivo ha sido estudiar si CTGF activa la ruta TGF- $\beta$ /Smad e induce fibrosis vascular. Para ello realizamos un modelo experimental de administración sistémica de CTGF (inyección intraperitoneal de 2,5 ng/g peso) en ratones C57BL/6, y se estudiaron a las 24 horas (modelo agudo) y 10 días (crónico). A 24h CTGF activó la ruta Smad en aorta, determinado por un aumento en los niveles de Smad2 fosforilado, pero no se modificaron los niveles de TGF- $\beta$  (gen y proteína), ni de factores profibróticos, como PAI-1, comparados con el grupo control. A los 10 días de administración de CTGF, no se observó aumento en el depósito de colágenos, ni en los niveles de TGF- $\beta$  en aorta. Estos resultados muestran que CTGF no es capaz de inducir fibrosis vascular en ausencia de aumento de TGF- $\beta$ . Por el contrario, CTGF incrementó la expresión aórtica de genes proinflamatorios (RANTES, IL-6, MCP-1), observada desde 24 h y mantenida a 10 días. El bloqueo de TGF- $\beta$  activo, mediante un anticuerpo neutralizante, aumentó la respuesta inflamatoria vascular causada por CTGF (MCP-1 y RANTES) a 10 días, lo que apoya las propiedades anti-inflamatorias de TGF- $\beta$  a nivel vascular. En estudios realizados in vitro en células de músculo liso vascular (CMLVs), la estimulación con CTGF durante 20 minutos aumentó la fosforilación de Smad2 y causó su traslocación al núcleo. Estos efectos no fueron inhibidos con un anticuerpo neutralizante de TGF- $\beta$ , lo que demuestra que CTGF activa Smad2 de manera independiente de TGF- $\beta$ . En CMLVs observamos que CTGF es capaz de aumentar los niveles génicos de factores proinflamatorios, pero no de TGF- $\beta$ . Aunque son necesarios más estudios nuestros datos sugieren que podría existir una relación directa entre la activación de la proteína Smad2 y el aumento de genes proinflamatorios inducidos por CTGF a nivel vascular. Esto hace pensar que CTGF o TGF- $\beta$ , a nivel local, podrían modular la respuesta proinflamatoria o profibrótica, respectivamente, contribuyendo a la evolución del daño vascular.

### 31. EL FTY-720 INDUCE LA LIBERACIÓN DE PGI2 Y LA EXPRESIÓN VASCULAR DE COX-2 IN VIVO: POTENCIACIÓN POR ESTATINAS

C. Rodríguez, M. González-Díez, F. Alegre, M. Orriols y J. Martínez-González

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

**Introducción y objetivos:** El FTY-720 es un análogo de la esfingosina-1-fosfato (S1P) que ha demostrado efectos vasoprotectores in vivo. En estudios previos hemos demostrado que la S1P es el componente de las HDL responsable del incremento en la liberación de prostaciclina (PGI2) en células vasculares y que la simvastatina potencia este efecto a través de la regulación de receptores S1P. Nuestro objetivo fue determinar si el FTY720 es capaz de regular la producción de PGI2 in vivo y si las estatinas podrían modular este efecto.

**Métodos:** Los estudios se realizaron en ratones de la cepa C57/BL6J y en células musculares lisas vasculares de coronarias humanas (CMLV). Los animales recibieron una dosis de simvastatina o atorvastatina 75 mg/kg/día en la dieta durante 8 días. El quinto día se administró una dosis única de FTY-720 por vía intraperitoneal (1 mg/Kg ip). El nivel de mRNA de COX-2 y de los receptores de S1P en CMLV y aorta se analizó mediante PCR a tiempo real. Los niveles plasmáticos de PGI2 se determinaron mediante un ensayo inmunoenzimático.

**Resultados:** El FTY720 incrementó la expresión de COX-2 en CMLV, con un patrón temporal similar al observado previamente en presencia de S1P o HDL, en el que la máxima inducción (4 veces) se detectó al cabo de 90 minutos tras el estímulo. Análogamente, en estudios in vivo, el FTY720 incrementó la expresión de COX-2 en

aorta e indujo los niveles plasmáticos de PGI2 de forma dependiente del tiempo con una inducción máxima a las 72 h (2.5 veces). Ambos efectos se vieron potenciados por la administración de simvastatina y atorvastatina, fármacos que incrementaron el nivel de expresión del receptor S1P1 en la pared vascular. El efecto sobre la COX-2 en la aorta de los animales se produjo sin que se alterase la expresión de COX-1 (isoforma "constitutiva") ni de la prostaciclina sintasa (PGIS).

**Conclusiones:** Nuestros resultados sugieren que el incremento en la producción de PGI2 puede ser uno de los mecanismos responsables del efecto vasoprotector del FTY720 y que las estatinas potencian esta respuesta a través de la modulación de la expresión de receptores S1p.

### 32. LA L-CARNITINA ATENÚA LA FIBROSIS RENAL ASOCIADA A LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL

S. Zambrano Sevilla<sup>1</sup>, A.J. Blanca Lobato<sup>1</sup>, M.V. Ruiz Armenta<sup>1</sup>, L. Sobrevía<sup>2</sup>, A. Leiva<sup>2</sup>, M. Arévalo<sup>3</sup>, A. Mate Barrero<sup>1</sup> y C.M. Vázquez Cueto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Sevilla, Sevilla. <sup>2</sup>Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile. <sup>3</sup>Universidad de Salamanca, Salamanca.

**Objetivos:** Una de las consecuencias de sufrir hipertensión arterial es el desarrollo de fibrosis renal. En este estudio analizamos si la L-carnitina (LC) atenúa el desarrollo de fibrosis en el riñón de ratas hipertensas, así como los mecanismos de acción implicados.

**Métodos:** Se han empleado 4 grupos de ratas: Wistar (control), ratas tratadas con LC (400 mg/Kg/día), ratas hipertensas inducidas con NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 25 mg/Kg/día) y ratas tratadas simultáneamente con LC y L-NAME. La presión fue tomada cada semana a cada uno de los grupos de ratas mediante el método de oclusión en la cola. En cada uno de los grupos analizamos la función renal determinando la proteinuria y los niveles de creatinina en plasma. Se han realizado estudios morfométricos utilizando un sistema de análisis de imagen para cuantificar la fibrosis en los tejidos previamente teñidos con rojo sirio, así como se evaluó la actividad de la enzima NADPH oxidasa, la expresión proteica y génica de la subunidad NOX4, del colágeno y de los factores profibróticos, factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF). Por último, para comprobar la implicación del sistema renina-angiotensina (SRA), se determinó la expresión génica de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y del receptor de angiotensina tipo 1 (AT1).

**Resultados:** Los niveles plasmáticos de creatinina no mostraron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales de ratas. Los valores de proteinuria se ven claramente aumentados en las ratas hipertensas con respecto al control, normalizándose estos valores en el grupo tratado simultáneamente con L-carnitina. El estudio del riñón con rojo sirio muestra como las ratas del grupo L-NAME presentan una mayor cantidad de fibras de colágeno en el mesangio y en el espacio intersticial, observándose una disminución de las mismas en las ratas hipertensas tratadas simultáneamente con LC. Estas modificaciones van acompañadas por un aumento en la actividad y en la expresión proteica y génica de la enzima NADPH oxidasa, así como por un aumento en la expresión génica de colágeno, TGF- $\beta$ , CTGF, ECA y AT1 en las ratas hipertensas, determinantes todos que disminuyen tras el tratamiento conjunto de LC.

**Conclusiones:** Nuestro estudio muestra como la LC atenúa la fibrosis renal asociada a la hipertensión arterial, y pone de manifiesto la mediación de la enzima NADPH oxidasa así como la participación del SRA en este efecto.

*Agradecimientos: Instituto de Salud Carlos III-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación, PN de I+D+I 2008-2011 (PS09/01395), Junta de Andalucía, Consejería de Salud (PI-0034), Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) (D/031187/10; A1/036123/11), CONICYT PIA (Anillos ACT-73)-Chile y FONDECYT 1110977/11110059 (Chile).*

### 33. EL ESTRÉS OXIDATIVO PERIFÉRICO Y CENTRAL Y EL AUMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO 20-HIDROXITETRAENOICO SON RESPONSABLES DE LA HIPERTENSIÓN EN LOS RATONES QUE SOBREENPRESAN EN EL RIÑÓN LA PROTEÍNA RENAL REGULADA POR ANDRÓGENOS

J.M. López Novoa<sup>1</sup>, M.T. Grande<sup>1</sup>, G. Pascual<sup>2</sup>, A. Sánchez Riobos<sup>1</sup>, M. González Núñez<sup>1</sup>, B. Bardají<sup>2</sup>, L. Barreiro<sup>2</sup>, O. Tornavaca<sup>2</sup> y A. Meseguer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca. <sup>2</sup>Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM), Institut de Recerca Vall d'Hebron, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona.

**Objetivos:** En la literatura hay evidencias de que tanto el estrés oxidativo como productos del citocromo p450 como el ácido 20-hidroxitetraenoico (20-HETE) juegan un papel importante en la mayor prevalencia de hipertensión asociada al sexo masculino (Singh y Schwartzman, *Pharmacol reports*. 2008;60:20). La proteína renal regulada por andrógenos (Kidney Androgen-Regulated Protein, KAP) es la proteína más abundantemente expresada en el túbulo proximal, y se regula de forma muy específica por andrógenos, aunque su función es muy poco conocida. Estudios anteriores de nuestro laboratorio demuestran que los ratones macho que sobreexpresan KAP en el riñón (KAP-Tg) son hipertensos (Tornavaca et al. *Circulation*. 2009;119:14). El propósito de este trabajo es analizar el papel del estrés oxidativo periférico y central y 20 HETE en la hipertensión que muestran los ratones KAP-Tg.

**Métodos:** En ratones KAP-Tg previamente descritos, machos con una edad de 6 meses, se estudió la excreción urinaria de marcadores de estrés oxidativo como 8-iso-prostaglandina F2 alpha (8-iso-PGF2a), 8-hidroxi-2-dehidroguanosina (8-OHdG) y peróxidos lipídicos (TBARS), y de 20-HETE. También se estudió el efecto de la administración intraperitoneal e intra-cerebroventricular de tempol (un mimético de la superóxido dismutasa) y mitotempo (una molécula similar con efectos mitocondriales directos), de la administración de apocinina, un inhibidor de la NAPPH-oxidasas, la principal fuente de anión superóxido, de N-acetil cisteína, y de la administración de un inhibidor de la síntesis de 20-HETE (N-hydroxy-N'- (4-n-butyl-2-methylphenyl) formamidine: het0016)) en la presión arterial medida tanto por canulación directa como por telemetría en animal despierto y en libre movimiento.

**Resultados:** Los animales transgénicos para KAP tenían una presión arterial significativamente mayor que sus controles y una mayor excreción urinaria de 20-HETE, 8-iso-PGF2a, 8-OHdG y TBARS, y mayor producción renal de H2O2. La administración i.p. de tempol, o de apocinina redujo mucho más la presión arterial, la excreción urinaria de 8-iso-PGF2a, 8-OHdG y de 20-HETE y los niveles plasmáticos de angiotensina II y de catecolaminas en los KapTg que en los controles. La inhibición de la síntesis de 20-HETE también redujo la presión arterial. La administración icv de tempol o mitotempo disminuyó la presión arterial en los KAP-Tg y no en los controles.

**Conclusiones:** Nuestros datos demuestran que un aumento del estrés oxidativo central y periférico y de la síntesis de 20 HETE juegan un papel clave en la hipertensión de los ratones KAP-Tg y confirman su papel importante en la hipertensión asociada al sexo masculino.

### 34. CALCIFICACIÓN VASCULAR: UN PROCESO PASIVO QUE NECESITA INHIBIDORES

R. Villa Bellosta<sup>1</sup>, V. Sorbias<sup>1</sup> y W. O'Neill<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Toxicología Molecular, Universidad de Zaragoza, Zaragoza. <sup>2</sup>Renal Division, School of Medicine, Emory University, Atlanta, EE.UU.

El propósito del presente estudio ha consistido en profundizar en los mecanismos genéticos y moleculares que rigen la calcificación vascular, el proceso de acumulo de depósitos de calcio en la pared arterial. Para ello, se han utilizado cultivos de células de la musculatura lisa (CML) de la pared de la aorta de rata, extraídas de la capa medial por el método descrito de doble digestión con colagenasa. Utilizando un medio que induce la formación de depósitos de calcio-fosfato se ha comprobado que la calcificación es un proceso termodinámicamente favorable que no necesita de ninguna actividad celular y que ocurre en condiciones fisiológicas, descartando el transporte de fosfato inorgánico como principal inductor de la calcificación vascular. Profundizando en esta idea, se ha observado que el calcio es el principal limitante en el proceso de formación de los depósitos de fosfato-calcio, por lo que el producto de la concentración de calcio y fosfato (CaxPi) descrito en la literatura como un factor de riesgo en el proceso de calcificación, debe ser revisado. Además se ha verificado por PCR cuantitativa que los cambios en la expresión génica descritos en la literatura y observados durante el proceso de calcificación (BMP-2, SM22a, Runx y Cbfa, principalmente) son la respuesta a los depósitos de fosfato y calcio (hidroxiapatita); pero no el causante de dichos depósitos. Por otro lado, se ha procedido a comprobar el papel que desempeña el pirofosfato extracelular (ePPI) durante la calcificación vascular. El ePPI es el principal inhibidor endógeno de la formación de los depósitos de fosfatos de calcio, con una EC50 en el rango micromolar. Haciendo uso de cultivos de CML, ATP marcado con <sup>32</sup>P como radiotrazador y cromatografía en capa fina, hemos demostrado que en las aortas, la síntesis del ePPI vía hidrólisis del ATP extracelular depende de la enzima eNPP1, mientras que la hidrólisis del ePPI depende de la fosfatasa alcalina (ALP). Estas dos enzimas son las principales reguladoras de la concentración extracelular de ePPI en la pared vascular y la cantidad presente de ePPI a nivel local, determina en gran medida la capacidad inhibitoria de la calcificación de los tejidos blandos. En conclusión podemos afirmar que el depósito de calcio en las arterias es un proceso pasivo que necesita ser prevenido con la síntesis de inhibidores endógenos. El principal inhibidor endógeno de la calcificación vascular es el ePPI, por lo que el estudio de las enzimas involucradas en su síntesis y degradación, son factores a tener en consideración a la hora de diagnosticar y diseñar terapias para prevenir los depósitos de calcio en el sistema cardiovascular.

### 35. DIMORFISMO SEXUAL EN EL SISTEMA HEMO-HEMO-OXIGENASA RENAL EN RATAS DIABÉTICAS

C. Pérez Pardo<sup>1</sup>, B. Bonacasa Fernández<sup>1</sup>, F. Sáez Belmonte<sup>2</sup>, B. López Cano<sup>1</sup>, M. García Salom<sup>1</sup>, F. Fenoy Palacios<sup>1</sup> y F. Rodríguez Mulero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Murcia. <sup>2</sup>Servicio de Análisis de Imagen, Servicio de Apoyo a la Investigación, Universidad de Murcia, Murcia.

**Introducción y objetivos:** El sexo condiciona los niveles de estrés oxidativo en diversos tejidos y la respuesta hemodinámica renal ante una hiperglicemia aguda. Las hemo-oxigenasas-1, (HO-1), y -2 (HO-2), se expresan en estructuras vasculares y tubulares renales, catalizan la degradación del grupo hemo, y dan lugar a la formación de metabolitos activos como monóxido de carbono, bilirrubina y biliverdina. La HO-2 es una enzima constitutiva, mientras

que, la isoforma inducible HO-1 ejerce acciones antioxidantes, vasodilatadoras y citoprotectoras en el riñón de animales macho con diabetes tipo-1 (DM-1). A pesar de todo ello, la importancia funcional de la HO renal, como sistema limitante de los niveles de estrés oxidativo que acompañan a una DM-1 en individuos de distinto sexo, no ha sido previamente analizada. El presente estudio trató de comprobar si 1) la expresión y/o actividad del sistema hemo-HO renal difiere en animales diabéticos de ambos sexos y si 2) los niveles de estrés oxidativo están diferencialmente regulados en el riñón de ratas macho y hembras con DM-1 experimental.

**Métodos y resultados:** Ratas Sprague Dawley fueron estudiadas 14 días después de la administración de estreptozocina (65 mg/kg. ip) a machos (MD = 11) o hembras (HD = 10), y comparadas con animales machos (MC = 10) o hembras (HC = 10) control tratados con vehículo. Tanto MD como HD presentaron un aumento de la relación entre peso del riñón/peso corporal junto a niveles significativamente elevados de hemoglobina glicosilada A1C ( $9,8 \pm 0,2\%$ , MD;  $8,4 \pm 0,4\%$ , HD) comparados con MC ( $4 \pm 0,1\%$ ) o HC ( $4,2 \pm 0,1\%$ ). El análisis por Western Blot de extractos de corteza renal demostró un aumento ( $p < 0,05$ ) de expresión de proteína HO-1 en HD ( $0,31 \pm 0,09$ , unidades densitométricas normalizadas por  $\beta$ -actina) comparada con HC ( $0,08 \pm 0,01$ ), y similares niveles de nitrotirosina, ( $26 \pm 1$  vs  $22 \pm 2$  nmol/mg proteína;  $p > 0,05$ ), un índice de estrés oxidativo determinados por un ELISA. Por su parte, los niveles de nitrotirosina fueron significativamente mayores en MD ( $36 \pm 5$  nmol/mg proteína) comparados con MC ( $24 \pm 2$  nmol/mg proteína), mientras que los niveles de proteína HO-1 fueron similares en ambos grupos de machos. En animales anestesiados preparados para el estudio de su función renal, la presión arterial media, (PAM, mmHg) fue significativamente menor en MD ( $114 \pm 4$ ) que en MC ( $126 \pm 5$ ), así como en HD ( $100 \pm 4$ ) comparados con HC ( $123 \pm 3$ ). Del mismo modo, los valores de la tasa de filtración glomerular (TFG;  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$ ) fueron significativamente menores en MD ( $748 \pm 29$ ) y HD ( $843 \pm 93$ ), que en sus correspondientes controles, MC ( $1038 \pm 79$ ) y HC ( $1138 \pm 83$ ). La administración a estos animales de mesoporfirina de estaño (SnMP 40  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , iv), un inhibidor de la actividad de HO, no tuvo efecto sobre la PAM, la TFG y la resistencia vascular renal (RVR) en MC o HC, pero redujo significativamente la TFG en ambos grupos de animales diabéticos. En el grupo de HD la infusión de SnMP disminuyó el FSR ( $\Delta = -0,8 \pm 0,2$  ml/min/g,  $p < 0,05$ ) e incrementó las RVR ( $\Delta = 3 \pm 1$  UR,  $p < 0,05$ ) respecto a sus respectivos periodos basales. Sin embargo, estos parámetros no se modificaron en el grupo de MD ( $\Delta = -0,3 \pm 0,2$  ml/min/g;  $\Delta = -0,1 \pm 0,8$  UR),  $p > 0,05$ .

**Conclusiones:** Estos datos demuestran la existencia de diferencias de género en la regulación de la expresión de HO-1, y en la actividad de HO en el riñón diabético, que pueden contribuir a limitar el daño renal asociado a estrés oxidativo en DM-1.

### 36. DISFUNCIÓN ENDOTELIAL PRODUCIDA POR ADIPOCINAS VASOACTIVAS ORIGINADAS EN EL TEJIDO ADIPOSO VISCERAL DEL LECHO MESENTÉRICO DE RATAS OBESAS CON SÍNDROME METABÓLICO

Y. Mendizábal Castillo, S. Llorens Folgado y E. Nava Hernández

*Facultad de Medicina, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete.*

El exceso de adiposidad visceral está asociado a la enfermedad cardiovascular. La rata SHROB es un modelo animal de síndrome metabólico con obesidad visceral. En nuestro laboratorio hemos observado que las arterias mesentéricas de resistencia de la SHROB sufren una grave disfunción endotelial. El objetivo de este trabajo es determinar si la grasa visceral que rodea estos vasos está relacionada con la disfunción endotelial de los mismos. Y si fuera así, si esto se debe a una alteración de la vía del NO endotelial por

parte de dicha grasa y (o) a la acción de las siguientes adipocinas vasoactivas: angiotensina II, endotelina-1, prostaglandina E2, prostaciclina, tromboxano A2 o ROS. Para ello, realizamos la experimentación destinada a medir los cambios de tensión isométrica que desarrollan los segmentos de arterias mesentéricas de resistencia procedentes de ratas SHROB y de ratas control (Wistar-Kyoto): a) manteniendo una esfera de tejido adiposo perivasculoso (grupo con PAT), o b) disecando todo el tejido adventicial (grupo sin PAT). La función endotelial se valoró por medio de curvas dosis-respuesta a acetilcolina. Nuestros resultados indican que las arterias de SHROB con PAT (pero no las de WKY) relajan mucho peor que las arterias sin PAT de la misma rata. La inhibición de la actividad de la NO sintasa mermó las respuestas a acetilcolina en todos los grupos (SHROB sin PAT y WKY con y sin PAT) con excepción de la SHROB con PAT. La inhibición o bloqueo de angiotensina II, endotelina-1, ciclooxigenasa II, prostaciclina, tromboxano A2 mejoraron, más o menos eficazmente, la respuesta a la acetilcolina de las arterias de SHROB con PAT. En cambio, la relajación de las arterias de WKY con PAT mejoraron sólo al inhibir la ciclooxigenasa II o bloqueando receptores de prostaglandina E2. Concluimos que el tejido adiposo visceral perivasculoso de la SHROB, pero no el de la WKY, libera adipocinas que trastornan la función endotelial de las arterias de resistencia adyacentes a nivel de la vía del NO. Este tejido adiposo es también una fuente de prostaglandinas vasoactivas, tanto en la grasa mesentérica de animales no obesos (WKY), como en la de los obesos (SHROB). Sin embargo, en estos últimos, la naturaleza de dichas prostaglandinas adipocíticas contribuiría a la disfunción endotelial propia de su condición.