

Papel de las proteínas oxidadas sobre el daño endotelial asociado a la enfermedad renal crónica: aproximación “in vivo” e “in vitro”

Estefanía Navalmoral Arenas^{1*}, Carlos Luna Ruiz¹, Matilde Alique Aguilar¹, Rafael Ramírez Chamond¹

¹ Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

Resumen

Una manifestación temprana de las enfermedades cardiovasculares es la disfunción endotelial, asociada a un entorno inflamatorio propio de patologías crónicas como la insuficiencia renal crónica (IRC). Está descrito que en la IRC se producen modificaciones pos-traduccionales en las proteínas, tales como la oxidación, que serían capaces de generar un daño endotelial y como consecuencia producir eventos cardiovasculares asociados a esta patología (IRC). Por ello, nos centramos en caracterizar y determinar el papel de estas proteínas oxidadas presentes en los plasmas de pacientes con IRC. Además, valoramos los efectos de una proteína en concreto, albúmina humana, sobre cultivos endoteliales, para relacionar estas moléculas alteradas presentes en plasmas de sujetos patológicos y nuestra proteína modificada en cuanto a la capacidad de provocar fenómenos de daño y senescencia prematura inducida en el endotelio, con las consiguientes complicaciones fisiopatológicas. Se realizó una aproximación in vivo, en la cual, mediante técnica ELISA, se determinó la cantidad (ng/mL) de AOPP (Advance Oxidized Protein Products) en plasmas de sujetos (n=18) con IRC, procedentes del Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda. Paralelamente, se cuantificó el número de micropartículas (MPs) endoteliales en las muestras para observar el daño endotelial. “In Vitro”, se utilizó Albúmina Humana Oxidada (mediante sulfato de cobre) como tratamiento, para ver los posibles efectos deletéreos de la misma, medidos como senescencia y daño (actividad B-gal, producción de MPs, reendotelización y proliferación). Se observó una mayor cantidad de proteínas oxidadas así como mayor número de MPs endoteliales en los plasmas de los sujetos respecto al control; se valoró que la presencia de albúmina oxidada induce senescencia prematura en el endotelio, así como expresión de mayor número de MPs e inhibición parcial de la proliferación y reendotelización del mismo, además de una mayor expresión de ciclina D1 a las 6 horas de tratamiento, proteína relacionada con la senescencia.

Palabras clave: proteínas oxidadas; senescencia endotelial; daño vascular; insuficiencia renal crónica.

Cita: Navalmoral E, Luna C, Alique M, Ramírez-Chamond R (2014) Papel de las proteínas oxidadas sobre el daño endotelial asociado a la enfermedad renal crónica: aproximación “in vivo” e “in vitro”. *Dianas* 3(1): e20140901. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20140901 URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 26 de junio de 2014

Copyright: © 2014 Estefanía Navalmoral Arenas et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

***E-mail:** estefania.navalmoral@gmail.com



Introducción

Los enfermos con insuficiencia renal crónica (IRC) tienen un riesgo elevado de padecer algún tipo de ECV (enfermedad cardiovascular) a lo largo de su vida; la enfermedad renal crónica y los eventos cardiovasculares están íntimamente ligados teniendo varias complicaciones asociadas, siendo una de las más importantes la disfunción endotelial. Uno de los mecanismos relacionados con el daño endotelial presente en estos pacientes, es el proceso de envejecimiento prematuro del endotelio vascular. Por otra parte, el sistema biológico endotelial de un paciente con estas complicaciones está completamente desbalanceado, lo cual se ve reflejado en parámetros clínicos bien definidos y en otros parámetros recientes aún en desarrollo, como la presencia de micropartículas (MPs) endoteliales y proteínas modificadas por reacciones químicas normalmente irreversibles que ocurren en este entorno (oxidación, carbamitación...). Sin embargo, el hecho de que existan estos factores en sangre circulante de pacientes con IRC, junto con las patologías cardiovasculares, hace que el endotelio envejezca anormalmente rápido en un proceso denominado Senescencia Prematura Inducida por Estrés, que ha sido relacionado con el desarrollo de numerosas patologías.

A nivel celular, las células envejecen como consecuencia de su actividad proliferativa. Tras alcanzar un número de ciclos replicativos, la mayor parte de las células, incluidas las células endoteliales, sufren un proceso de senescencia que hace que cese su actividad proliferativa.

Este proceso de “senescencia replicativa” puede precipitarse ante situaciones de estrés que produzcan ciclos celulares reiterados y/o generar daño en el genoma celular. En consecuencia, la senescencia celular se considera un mecanismo fisiológico para evitar la proliferación de células que hayan acumulado daños o puedan tener alterado su genoma [1]. Uno de los mecanismos que emplean estas células para evitar la progresión del ciclo celular, es una sobreexpresión de la ciclina D1, de este modo, se produce una retroalimentación negativa de la ciclina, en la que está implicada p21, que evita su unión con la CDK correspondiente; todo eso se traduce en una progresión de las células a un estado senescente o apoptótico [2]. Los agentes inductores de la senescencia, producen cambios en el fenotipo celular, dando lugar a un fenotipo senescente con una serie de características, como son: resistencia a la apoptosis, alteración del patrón de la expresión génica, y la aparición de marcadores de senescencia asociada como la β -galactosidasa. En general, este fenotipo se mantiene en una célula senescente, aunque puede haber cambios, en función del tipo celular [3].

Junto al cese de su actividad mitótica, las células senescentes presentan cambios moleculares, fenotípicos, y en su actividad funcional que ha hecho que el acúmulo de células senescentes se relacione con el desarrollo de diferentes patologías [4]. Concretamente, en el caso de las células endoteliales, la senescencia celular se acompaña de la expresión de un fenotipo pro-inflamatorio, pro-aterosclerótico, y pro-trombótico. Además, y a diferencia de lo que ocurre con otras células, la célula endotelial senescente muestra mayor fragilidad y mayor susceptibilidad a morir por apoptosis en situaciones de estrés. Esta mayor fragilidad de la célula endotelial senescente parece deberse al hecho de que estas células producen y mantienen niveles más elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS) [5].

Como consecuencia de la estimulación celular, la práctica totalidad de las células producen y liberan vesículas. Estas vesículas que reciben diferentes nombres en función de su tamaño, su composición, o la forma de producirse, se consideran biomarcadores que reflejan el daño celular. En el caso de las células endoteliales activadas, producen y liberan al torrente sanguíneo vesículas denominadas micropartículas, que con un tamaño aproximado de 1 μ m, se forman a partir de evaginaciones de la membrana celular. La cuantificación en plasma de estas MPs se correlaciona con la senescencia endotelial y la ECV. Específicamente en enfermos con IRC, el daño vascular se asocia a un incremento plasmático en MPs [6].

Asociado al proceso de envejecimiento, se producen modificaciones post-traduccionales de proteínas. Estos cambios estructurales, conllevan alteraciones en la actividad funcional desempeñadas por estas proteínas. De hecho, en modelos experimentales se ha observado que algunas proteínas modificadas, como la LDL o la albúmina, pueden provocar la muerte de las células endoteliales, lo que se ha considerado como el primer estadio en el deterioro de la pared vascular que va a conducir de forma irreversible al desarrollo de enfermedad vascular. Al igual que ocurre en los ancianos, en los enfermos con IRC, la presencia de proteínas que muestran modificaciones post-traduccionales, se ha asociado igualmente con el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular.

Hasta donde hemos podido conocer, no existen estudios que determinen si la oxidación de proteínas, una de las principales modificaciones post-traduccionales que sufren las proteínas “in vivo”, puede estar implicada en el daño endotelial y la enfermedad cardiovascular de la IRC, por lo que hemos planteado este estudio en el contexto de los recientes trabajos que señalan la necesidad de conocer mejor los mecanismos por los que las proteínas modificadas inducen daño celular (sobre todo en células vasculares) para identificar posibles dianas terapéuticas orientadas a prevenir o a frenar este daño.

Métodos

Elisa

Se realiza técnica de inmunoensayo con los plasmas de los pacientes (n=18) procedentes del Hospital Puerta de Hierro, Majadahonda, para determinar el nivel de proteínas oxidadas de los mismos (AOPP, ng/ml). Para ello se utiliza el kit comercial ELISA, cat No. CSB-E09925h, (CUSABIO BIOTECH. LTD).

Cultivo celular

Se utiliza como modelo de endotelio humano, línea celular HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) (Clonetics, Solingen, Alemania) que se cultiva a 37 ° C, 5% de CO₂ en medio endotelial estándar basal (EeBM, CAMBREX BioScience, Walkersville, EE.UU.), junto con los suplementos de crecimiento celular (EGM, Cambrex) y 10% de suero bovino fetal (FBS, Invitrogen-Molecular Probes, Eugene OR, EE.UU.). A partir de un vial inicial criopreservado en Albúmina+DMSO (10%), se consiguen duplicaciones de cultivos de manera seriada.

Antes de realizar los experimentos, los cultivos se deprivan de FBS con el fin de que todas las células se encuentren en el mismo estado basal fisiológico (evitar la hiperestimulación). Para la realización de los

experimentos únicamente se utilizan pases celulares jóvenes (<8), ya que las células de pases mayores presentan otro tipo de propiedades y responden de manera diferente a los tratamientos.

Proteína Nativa control; Albúmina (Albn)

Se utiliza Albúmina comercial (GRIFOLS, Albutein 20% 10g/50mL) como proteína sin modificar para los controles internos de nuestros experimentos. La solución stock se diluye una concentración 20µg/µl en PBS 1X, y la cantidad de la misma se valora mediante Bradford.

Oxidación de Albumina (Albox)

Se diluye Albúmina comercial (GRIFOLS, Albutein 20% 10g/50mL) a una concentración 20µg/µl en PBS 1X para su posterior oxidación “in vitro” mediante el agente oxidante Sulfato de Cobre (Copper (II) Sulfate 451657-10g, Sigma Aldrich, USA). Se pone en contacto el agente oxidante con la proteína a una relación de 1µL de CuSO₄ por ml de proteína a oxidar, y se incuba a 37 °C durante 16-18h, en oscuridad. Pasado este tiempo, se para la reacción con el agente quelante EDTA (0,5M) a una relación de 1µL/mL de proteína a oxidar; la cantidad de la misma se valora mediante Bradford [7].

Diálisis

Se intercambia la solución oxidante de la proteína por PBS 1X para evitar contaminación del agente oxidante a la hora de tratar las células. Para ello se utiliza una membrana de diálisis de 3.5K MWCO (Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Devices, Thermo Scientific, USA) para purificar la proteína oxidada durante 4 horas, a temperatura ambiente, en un agitador horizontal (100-300rpm). Se cuantifica la cantidad de proteína oxidada (libre de agente oxidante) mediante Bradford.

Valoración de la oxidación de albúmina

Se determina la oxidación de la albúmina mediante el kit OxyBlot™Protein Oxidation Detection Kit, catalog No, S7150, Millipore. (Western-Blot). Se complementa el estudio mediante la realización de una electroforesis en 2D SDS-PAGE, tanto de la proteína nativa como de la proteína oxidada.

Caracterización de micropartículas endoteliales en plasma

Se diluyen 100µl de plasma de los pacientes en PBS 1X (1:4). A continuación se añaden 10µl del anticuerpo anti-anexinaV (FITC Annexin V, cat. 556419, BD Pharmingen) y 5µl del anticuerpo anti-CD31, marcador endotelial PECAM, proteína de membrana que expresan las células procedentes del endotelio (CD31 PE, cat.34297, BD Bioscience). Se incuba 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, y se procede a la caracterización mediante citometría de flujo (Citómetro BD Accuri™ C6), separando las micropartículas endoteliales del resto por sus marcadores específicos (CD31+/Annexin V+) y por su tamaño y complejidad (Log FSC-H vs Log SSC-H), utilizando como referencia microesferas fluorescentes de 1µm de diámetro (Flow-Count Fluorospheres ref 7547053, Beckman Coulter, Brea, California, EE.UU).

Caracterización de micropartículas endoteliales de los ensayos “in vitro”

Las células se siembran en dos placas de 6 pocillos cada una (200.000 células/pocillo) y se tratan (células control, +Albn 2mg/mL, +Albox 2mg/mL [8]) durante 6 y 12 horas respectivamente. Se recogen los sobrenadantes (2mL) de los diferentes tratamientos y se procede a caracterizar las MPS mediante citometría de flujo. Se utilizó la misma técnica que en el apartado anterior, con la salvedad de que en este caso no se utilizan anticuerpos propios de endotelio (ya que las micropartículas provienen de cultivos de células endoteliales).

Ensayo de herida

Para el ensayo de herida se siembran 100.000 células/pocillo en una placa de 12 pocillos. Cuando se alcanza una confluencia aproximada del 80-90%, las células se deprivan previamente de FBS overnight (medio al 1% de FBS) y se procede al ensayo. En primer lugar, se realiza la herida sobre la monocapa de células con una punta de pipeta estéril de 200µl volumen máximo. A continuación, se retira el medio para eliminar con él el resto de desechos celulares y células no adheridas. Se añade medio nuevo (1% FBS) con los tratamientos correspondientes (células control, +Albn 2mg/mL, +Albox 2mg/mL). Se realizan fotografías a tiempo de 0, 2, 4, 6, 8, y 24 horas para ver como avanza el cierre de la herida.

Análisis por Western Blot

Las células se siembran en dos placas de 6 pocillos cada una (200.000 células/pocillo) y se tratan durante 6 y 12 horas respectivamente. Después se extraen las proteínas celulares con tampón de lisis (Cytobuster, Millipore, EEUU) al que se añade cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (ROCHE). Mediante el

método Bradford se determina la cantidad total de proteína existente en el sobrenadante de la lisis celular. Los lisados de cada muestra (50µg) se separan en un gel al 10% SDS-PAGE, se transfieren a membranas de nitrocelulosa durante 40 minutos (BIO-RAD), se bloquean con una solución al 5% de leche en TPBS 1X, durante 1h a temperatura ambiente, e incuban con el anticuerpo primario anticiclina D1 (1:1000) (Cyclin D1, Clone SP4, Rabbit Monoclonal Antibody, RM- 9104-SO, Thermo). Las membranas se incuban con el anticuerpo secundario (anti-rabbit antibody, NA934VS) durante 1h a temperatura ambiente, y se normalizan los valores de expresión de la ciclina D1 respecto a β-actina (Santa Cruz, ssc-47778). Finalmente las bandas se detectan con las películas de revelado por quimioluminiscencia (ECL; Luminata Crescendo Western HRP substrate, WBLUR500, Millipore). La cuantificación de la intensidad de banda se determina utilizando el software ImageJ.

Senescencia mediante actividad β-galactosidasa

El patrón de estimulación de los cultivos fue similar al experimento de cierre de herida; las células se ponen en contacto con los tratamientos durante 24h. Posteriormente se lleva a cabo el protocolo para detectar células senescentes mediante el kit comercial de senescencia; Senescence Detection Kit, cat. JM-K320-250, MBL) en una placa de 12 pocillos. Finalmente, se cuentan las células β-gal positivas (senescentes) y las células β-gal negativas (normales) y se establece una relación expresada en tanto por ciento (células senescentes/células normales).

Proliferación celular

Se cuantifica la proliferación celular mediante recuento con la cámara Neubauer. Se siembran 100.000 células por pocillo en una placa de 12 pocillos. Tras 24h de tratamiento se retira el medio y se añade PBS estéril 1X para su disgregación mecánica. Se utilizan 10 µl de cada una de las muestras para realizar el recuento mediante la siguiente fórmula:

Número Células= $(X1 + X2 + X3 + X4 /4) *10.000$ = número células/mL. Siendo X los cuadrantes de la cámara Neubauer.

Análisis estadístico

Para analizar los datos se emplea el programa GraphPad Prism mediante un test ANOVA-Kruskal Wally post-hoc, y Bonferroni's post-hoc, con una n=3. La significación se ha fijado para valores de $p < 0.05$.

Resultados

Determinación de proteínas oxidadas y micropartículas en el plasma de pacientes pertenecientes al estudio

Como se muestra en la figura 1A. Existe un aumento estadísticamente significativo ($p=0.03$) de las AOPP en pacientes con insuficiencia renal crónica respecto a sujetos sanos; además en la figura 1B, se observa una tendencia en el aumento del número de MPs endoteliales en dichos pacientes respecto a los sujetos sanos ($p=0.06$).

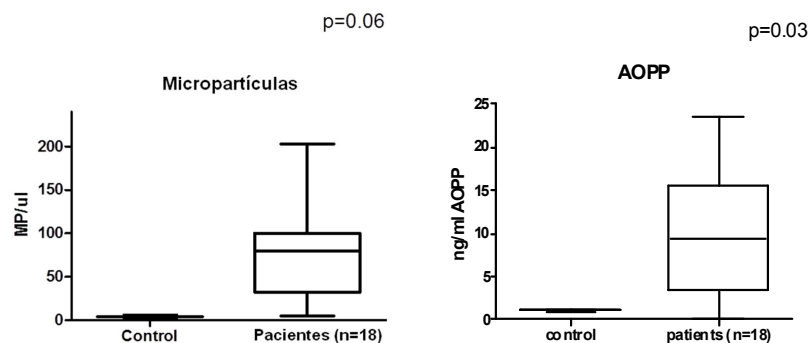


Figura 1.A) Análisis mediante técnica ELISA de las proteínas oxidadas de los plasmas de los pacientes con insuficiencia renal. Se representa la cantidad de AOPP en ng/mL de plasma. B) Cuantificación de las MPs endoteliales (MPs/µl; CD31+/ AnexinaV+) de los plasmas de los pacientes mediante citometría de flujo.

Análisis de la oxidación de albúmina

Como se observa en la figura 2, confirmamos mediante electroforesis bidimensional y Western Blot (OxyBlot™), que el tratamiento descrito en la sección metodológica, provoca la oxidación de albúmina humana.

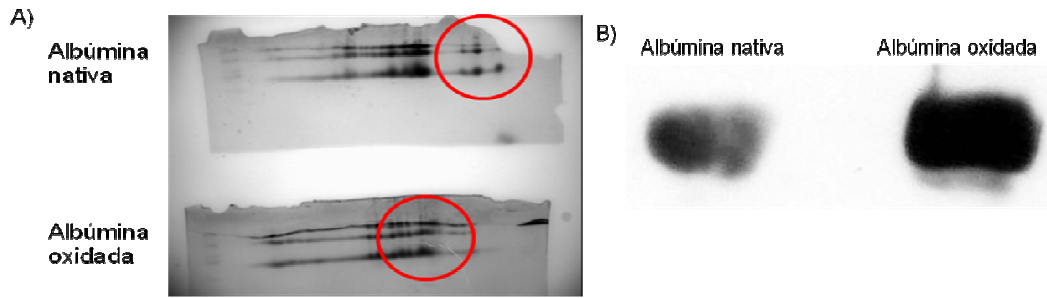


Figura 2.A) Electroforesis bidimensional. Tras la oxidación de la proteína disminuye su punto isoeléctrico, que se refleja en el desplazamiento de la misma hacia la izquierda en el gel. B) Western-Blot representativo de la oxidación “in vitro” de la albúmina humana.

Determinación de las micropartículas endoteliales de los ensayos “in vitro”

Los resultados muestran que no hay diferencias significativas en cuanto al número de MPs en los sobrenadantes correspondientes a cada condición tras 6 h de tratamiento. Sin embargo, se observa un aumento significativo en el número de MPs endoteliales en los sobrenadantes de células tratadas con albúmina oxidada, respecto al basal y al control sin proteína oxidada, a las 12 horas de tratamiento.

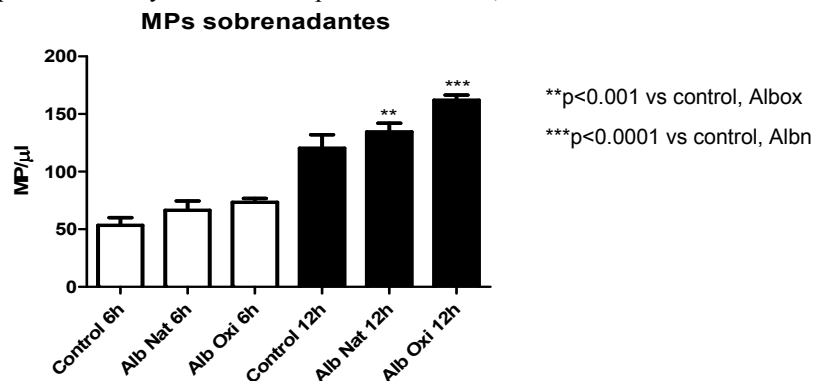


Figura 3. Niveles de MPs endoteliales por μl de sobrenadante de células control, +Albn 2mg/ml, +Albox 2mg/ml, a las 6 y 12 horas de tratamiento.

Actividad proliferativa y cierre de herida inducida por proteínas oxidadas

El estudio del cierre de herida, se considera un reflejo de la actividad vasculogénica y de reparación endotelial. En la figura 4A se muestra una disminución significativa en el área descubierta de las células tratadas durante 6 horas con albúmina nativa, respecto al control (0h) y a las células tratadas con albúmina oxidada (*p<0.05).

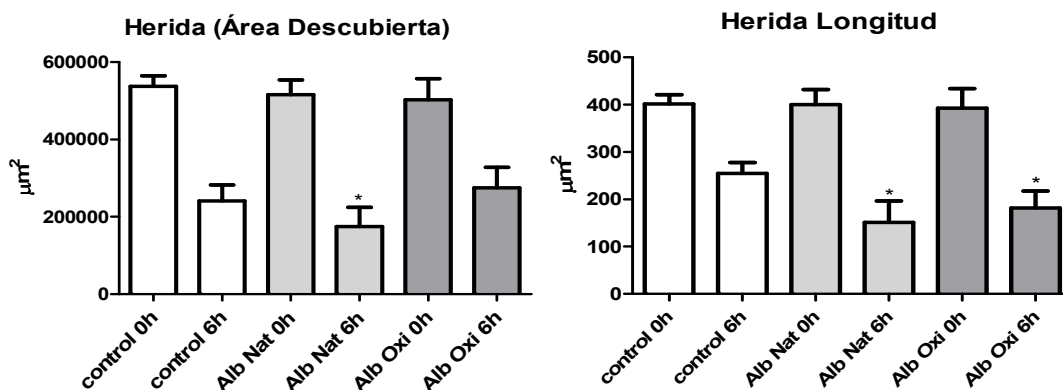


Figura 4.A) Área descubierta (μm²) de la herida realizada a las células control, +Albn 2mg/mL, +Albox 2mg/mL, a las 0 y 6 horas de tratamiento. 4B) Longitud de herida (μm²) realizada a las células control, +Albn 2mg/mL, +Albox 2mg/mL a las 0 y 6 horas de tratamiento.

En la Figura 4B se observa una disminución significativa (*p<0.05) en la longitud (ancho) en la herida de las células tratadas con albúmina nativa a las 6 horas, respecto al control (0h) y a las tratadas con

albúmina oxidada; estas últimas presentan una mayor longitud de herida a las 6 horas de tratamiento, respecto a su control (0h), y a las células tratadas con albúmina nativa (*p<0.05).

Análisis de proliferación celular

Respecto al recuento celular, se observa una disminución significativa en el número de células por mililitro en aquellas que han sido tratadas durante 24 horas con albúmina oxidada, respecto al control y células tratadas con proteína sin oxidar.

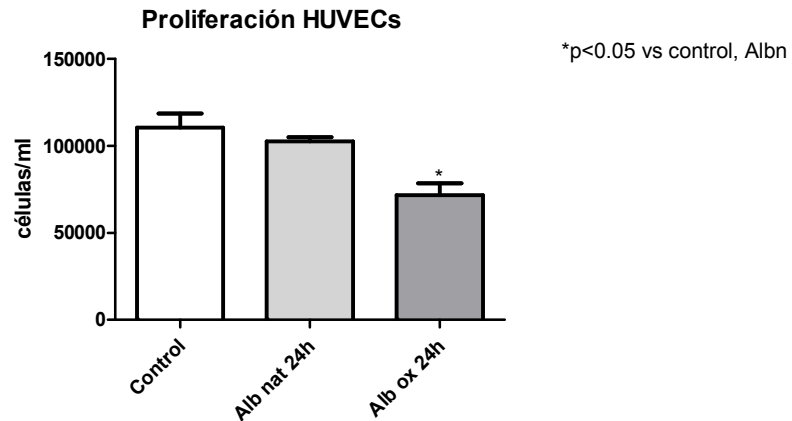


Figura 5. Recuento en cámara Neubauer del número de células por ml de las células control, células tratadas con albúmina nativa y células tratadas con albúmina oxidada, a las 24 horas.

Análisis de la ciclina D1 como mecanismo de senescencia inducida

Diversos estudios demuestran que una sobreexpresión de la ciclina D1 (proteína implicada en la progresión del ciclo celular), se asocia con un estado de senescencia celular, por ello, se determinaron los niveles de ciclina D1a las 6 h y a las 12 horas de tratamiento. Los resultados muestran, a las 6 horas, un aumento significativo de la ciclina D1 en las células tratadas con albúmina oxidada, sin embargo, a las 12 h no se perciben cambios, aunque se observa una tendencia a la disminución de la expresión de la ciclina D1 (*p<0.05).

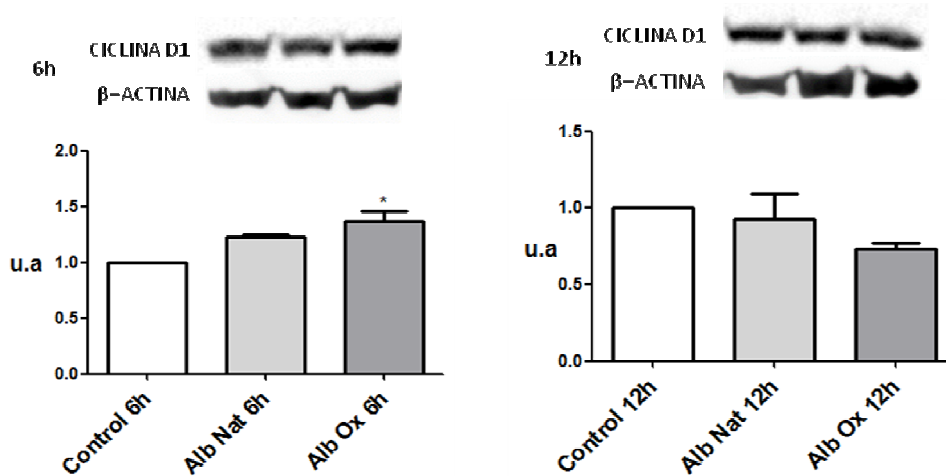


Figura 6. Análisis de la expresión de la ciclina D1 mediante técnica de Western Blot a las 6 y 12 horas de tratamiento en células control, células tratadas con albúmina nativa, y células tratadas con albúmina oxidada.

β-galactosidasa como marcador de senescencia

La presencia de niveles aumentados de actividad de β-galactosidasa están relacionados con la presencia de un fenotipo senescente. Los resultados muestran un aumento estadísticamente significativo en el ratio células senescentes/células jóvenes, en aquellas células que han sido tratadas durante 24 horas con albúmina oxidada frente al control y a las células tratadas con albúmina nativa (***p<0.0001). Es más, en estas últimas se observa una disminución significativa del cociente células senescentes/células jóvenes, respecto tanto al control como a las tratadas con albúmina oxidada (***p<0.0001).

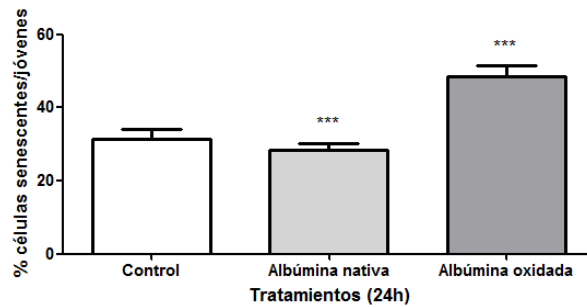


Figura 7. Determinación del porcentaje de células senescentes frente a células jóvenes, en las células control, en células tratadas con proteína sin oxidar, células tratadas con proteína oxidada, a las 24 horas de tratamiento.

Discusión

Existen pocos estudios que hablen sobre el papel de las proteínas oxidadas en el endotelio vascular, y hasta donde hemos podido conocer, ningún trabajo ha analizado el papel de las proteínas oxidadas en el daño endotelial asociado a IRC, por ello, este proyecto se centró en determinar si ciertas modificaciones pos-traduccionales eran capaces de generar una disfunción endotelial. Para ello, en primer lugar, se determinó el nivel de oxidación de proteínas que poseían un grupo de pacientes con insuficiencia renal crónica. Para completar este estudio, se realizaron una serie de aproximaciones “in vitro” para conocer el papel de estas proteínas oxidadas, en concreto albúmina, sobre la línea celular HUVEC, evaluando determinados parámetros característicos de un endotelio disfuncional, como son: retardo en la proliferación celular, aumento de micropartículas endoteliales secretadas, y presencia de fenotipo senescente relacionado con cambios morfológicos y funcionales.

En cuanto al análisis de los plasmas de pacientes que participan en el estudio, se observa un aumento en los niveles de proteínas oxidadas respecto al control, esto es debido a que la inflamación y por tanto el estrés oxidativo están presentes en la insuficiencia renal crónica. Al ser un grupo heterogéneo de pacientes, seleccionados al azar y con la IRC como único parámetro común, el nivel de micropartículas endoteliales está en el límite de la significación ($p < 0.06$). Aún así, estos pacientes presentan un mayor número de micropartículas endoteliales respecto al control, probablemente como reflejo de que el endotelio de estos pacientes está dañado. Pensamos que el no haber alcanzado una significación estadística se debe al escaso número de pacientes que hemos podido incluir en el estudio, aunque previamente ha sido descrito un incremento de MPs en pacientes con IRC. Por la misma razón (reducido número de pacientes) no nos parecía adecuado realizar estudios de correlación entre los niveles de MPs y proteínas oxidadas, aunque continuamos este ensayo para aumentar la casuística y poder realizar estos análisis estadísticos.

En esta primera etapa del trabajo nos pareció más apropiado profundizar en estudios “ex vivo” para determinar posibles mecanismos biológicos activados por las proteínas oxidadas que medien el daño endotelial y, concretamente, centramos nuestro objetivo en el análisis de la senescencia celular dado el papel relevante que este mecanismo ha adquirido como inductor de patología, y específicamente la senescencia endotelial prematura, en la patología vascular asociada a la IRC. Además, quisimos analizar en estos modelos “ex vivo”, el papel de las micropartículas endoteliales ya que actúan como medio de comunicación con células adyacentes. Los resultados obtenidos confirman la hipótesis y hemos observado un aumento estadísticamente significativo del nivel de MPs en los sobrenadantes de células tratadas con albúmina oxidada, generando un daño en las células endoteliales que dará lugar a la aparición de un fenotipo senescente.

Para estudiar la proliferación celular se realizaron estudios de cierre de herida, en los que se observa una disminución significativa en el área descubierta de la herida de células tratadas con albúmina nativa; además, estas células, presentan una menor longitud en cuanto a anchura de la herida, referido tanto al control como a las células tratadas con albúmina oxidada, donde existe un mayor área y longitud de herida. Esto significa que estas células reducen su capacidad proliferativa, ya que se está creando un entorno oxidativo y por tanto un daño endotelial. Además, este ensayo se completó con la cuantificación de la proliferación mediante el recuento de cámara Neubauer, donde se observa un menor número de células en aquellas tratadas con albúmina oxidada, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en los ensayos de herida, ya que si existe un menor número de células capaces de reparar la herida, ésta tendrá unos valores de área y longitud más elevados.

Una de las características asociadas a senescencia celular es el cese proliferativo. En este sentido se ha demostrado un aumento en la expresión de la ciclina D1 asociado a senescencia celular. Para comprobar si la senescencia inducida por proteínas oxidadas se acompaña de cambios en la expresión de la ciclina D1

se realizó un Western-Blot de dicha proteína, en el que se observa un aumento estadísticamente significativo de la expresión de la misma en células tratadas con albúmina oxidada, esto puede explicar que, posteriormente, estas células progresen hacia un estado senescente. Esta metodología apoya la hipótesis de diversos estudios en los que demuestran que un aumento de esta ciclina evita la degradación de p21 a nivel del proteosoma, inhibiendo la actividad del complejo ciclina-CDK. De este modo se impide el avance en el ciclo celular y la célula progresa hasta un estado senescente o apoptótico [2].

Finalmente, para estudiar el proceso de senescencia prematura inducida, se utilizó la actividad de la β -galactosidasa como marcador, donde se observa un mayor número de células senescentes en aquellas que han sido tratadas con albúmina oxidada. Esto se debe a que se genera un entorno oxidativo que da lugar a un daño en las células endoteliales, siendo la senescencia un mecanismo fisiológico para evitar la proliferación de células que hayan acumulado daños.

En resumen, en este estudio hemos demostrado que la albúmina oxidada induce un daño en la célula endotelial, que no progresa en su ciclo proliferativo, y que activa un mecanismo de senescencia acelerada con liberación al medio extracelular de micropartículas endoteliales. La traslación de los estudios “ex vivo” a pacientes demostró que, asociado a la progresión de IRC, se produce un incremento en los niveles de proteínas oxidadas, que presenta tendencia a asociarse a un incremento de micropartículas endoteliales. En consecuencia, los resultados obtenidos de este estudio apoyan la determinación de proteínas oxidadas como un biomarcador de enfermedad renal, y posiblemente de daño endotelial; y sugieren la posibilidad de utilizar las proteínas oxidadas como posible diana terapéutica en el tratamiento del daño endotelial en pacientes con IRC.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la Universidad de Alcalá el haberme concedido la oportunidad de realizar este proyecto mediante la beca de iniciación a la investigación. Agradecer al grupo de investigación del Prof Dr Rafael Ramírez Chamond todo el apoyo, conocimientos y la formación que me han otorgado durante todo este tiempo. También agradecer al grupo de la Prof Dra Marta Saura y al grupo del Prof Catedrático Javier de Lucio, por su ayuda en este trabajo.

Referencias

1. Stenvinkel, P. and T.E. Larsson. 2013. Chronic kidney disease: a clinical model of premature aging. *Am J Kidney Dis*, 62(2):339-5.
2. Burton D.G., A.N. Sheerin, et al. 2007. Cyclin D1 overexpression permits the reproducible detection of senescent human vascular smooth muscle cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1119:20-31.
3. Campisi J. and F. d'Adda di Fagagna. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(9):729-40.
4. Brownlee M. 1995. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med*, 46:223-234.
5. López-Otín, C., M.A. Blasco, et al. 2013. The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6):1194-1217.
6. Fadini, G.P., M. Albiero, et al. 2013. Diabetes impairs stem cell and proangiogenic cell mobilization in humans. *Diabetes Care*, 36(4):943-9.
7. Speidl, W.S., G. Cimmino, et al. 2010. Recombinant apolipoprotein A-I Milano rapidly reverses aortic valve stenosis and decreases leaflet inflammation in an experimental rabbit model. *Eur Heart J*, 31(16):2049-57.
8. Rubenstein D.A., M. Zahra, et al. 2011. Glycated albumin modulates endothelial cell thrombogenic and inflammatory responses. *J Diabetes Sci Technol*, 5(3):703-13.