

La senescencia replicativa con daño endotelial es modulada por el factor inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α) de forma independiente de la regulación por el microRNA-126

Andrea Figuer, Patricia Tato, Matilde Alique, Julia Carracedo, Guillermo Bodega, Rafael Ramírez

Índice:

1. Antecedentes
2. Objetivos
3. Materiales
4. Resultados:
 - a. Medición de senescencia en HUVEC
 - b. Alteración de la función endotelial en las células senescentes
 - c. Expresión reducida de HIF-1 α y Hsp90 en las células y microvesículas senescentes
 - d. Descenso de la expresión de miRNA-126 en células senescentes
 - e. Alteración de la función endotelial en las células tratadas con un inhibidor de HIF-1 α
 - f. HIF-1 α no regula la expresión del miRNA-126 en células endoteliales
5. Conclusiones

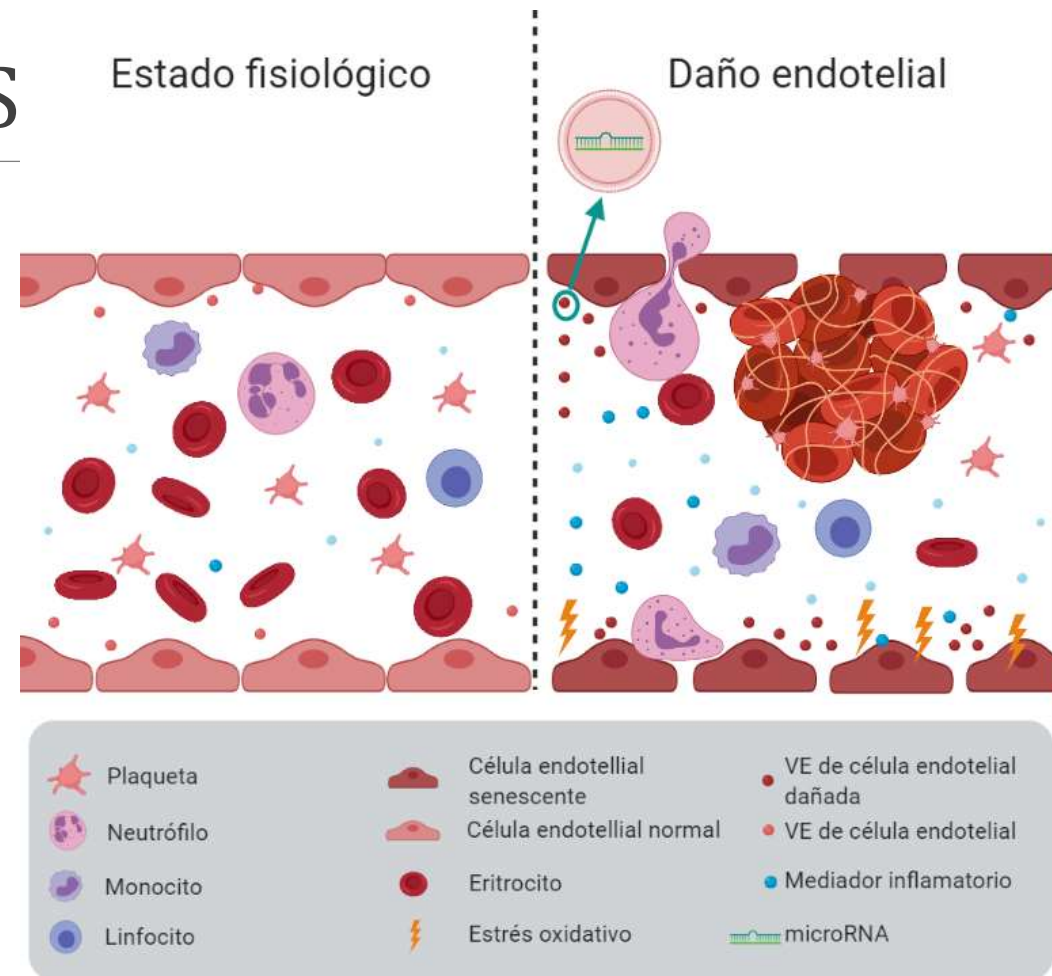
CÉLULAS ENDOTELIALES

Tapizan el interior de los vasos sanguíneos.

En estado senescente, son disfuncionales y causan problemas cardiovasculares, como la calcificación vascular.

En el proceso de envejecimiento vascular participan el estrés oxidativo, la disrupción de las uniones intercelulares, la disfunción de células progenitoras y la inflamación.

En estas condiciones, las células endoteliales liberan un mayor número de microvesículas.

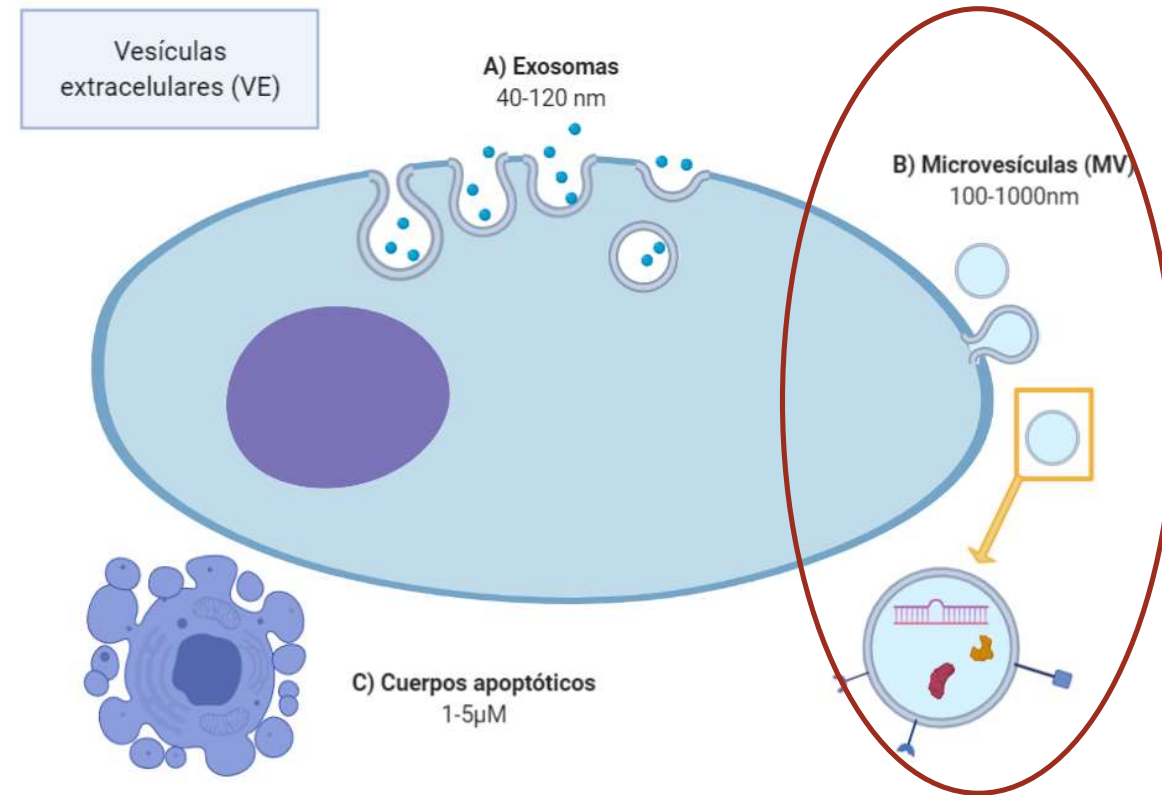


Microvesículas (MV)

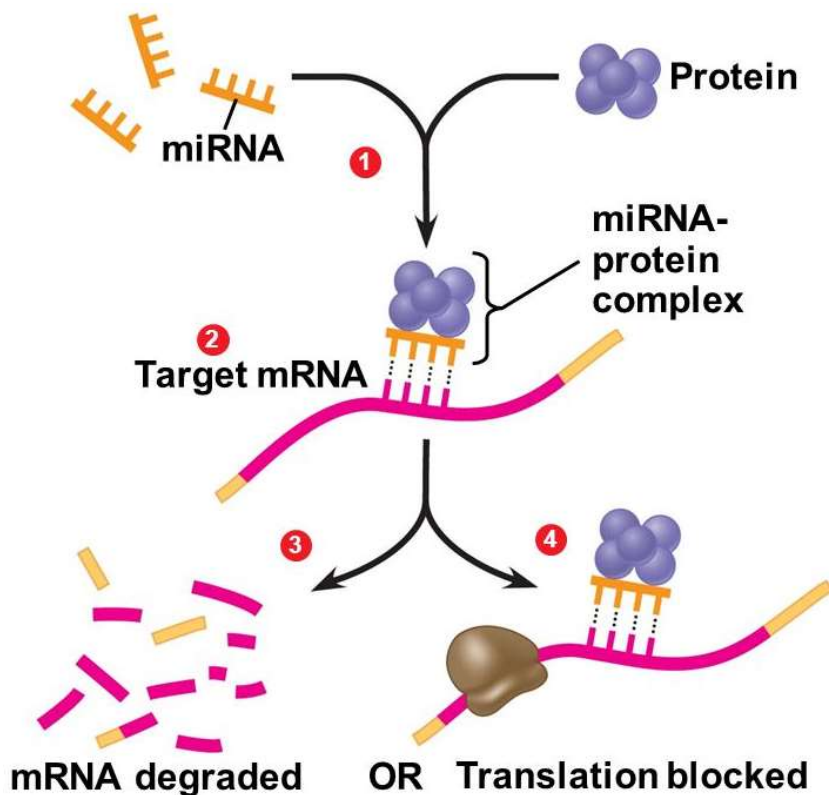
Tipo de vesícula extracelular (VE)

En su interior se encuentran ácidos nucleicos, lípidos y proteínas.

Participan en la comunicación intercelular, la angiogénesis, la coagulación y la maduración de reticulocitos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.



microRNAs



Copyright © 2009 Pearson Education, Inc. <https://images.app.goo.gl/h8Z4caXP5Ze9S3J9A>

Son RNAs endógenos no codificantes con un tamaño de unos 22 nucleótidos y que pueden aparecer en sangre tanto libres como en el interior de VE.

Actúan sobre mRNAs específicos y así regulan numerosos procesos, como la angiogénesis y la inflamación de los vasos sanguíneos.

Destaca el microRNA-126 (miR-126), que es secretado por las células endoteliales e interviene en proliferación y migración endotelial y en angiogénesis.

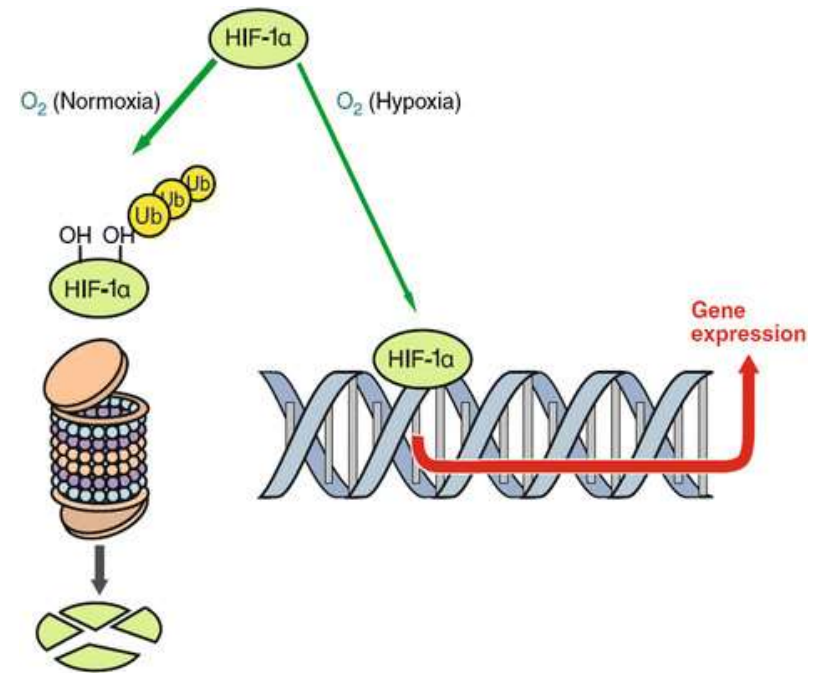
Factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α)

Factor de transcripción que permite la adaptación de las células ante una disminución de los niveles de O₂.

Regula el metabolismo de la glucosa y del hierro, la supervivencia, la proliferación celular y la angiogénesis.

A niveles de O₂ normales, HIF-1 es degradado constantemente. Si el O₂ disminuye, Hsp90 se une a HIF-1 α , lo que impide su degradación.

HIF-1 α podría estar relacionado con la senescencia endotelial.



<https://images.app.goo.gl/1Cw7zSjdMQMaY5nc7>

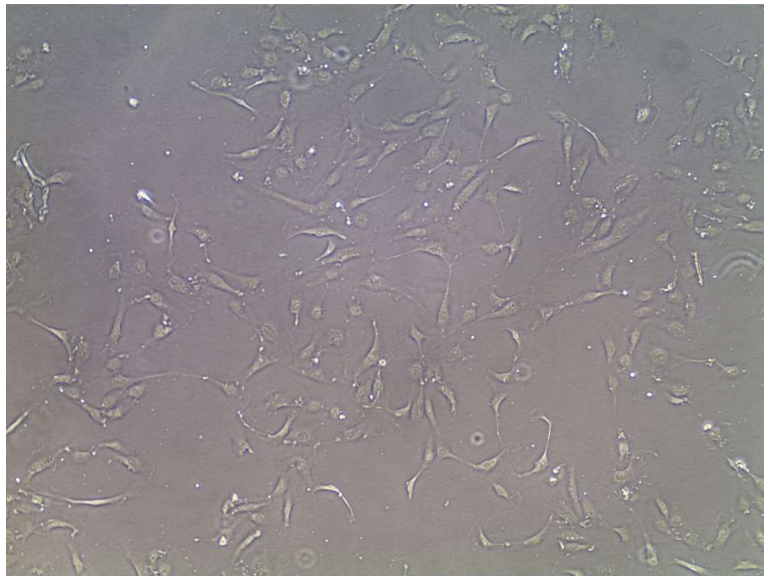
Objetivos

Estudiar la implicación de HIF-1 α y miRNA-126 (miR-126) en la senescencia replicativa asociada al daño endotelial

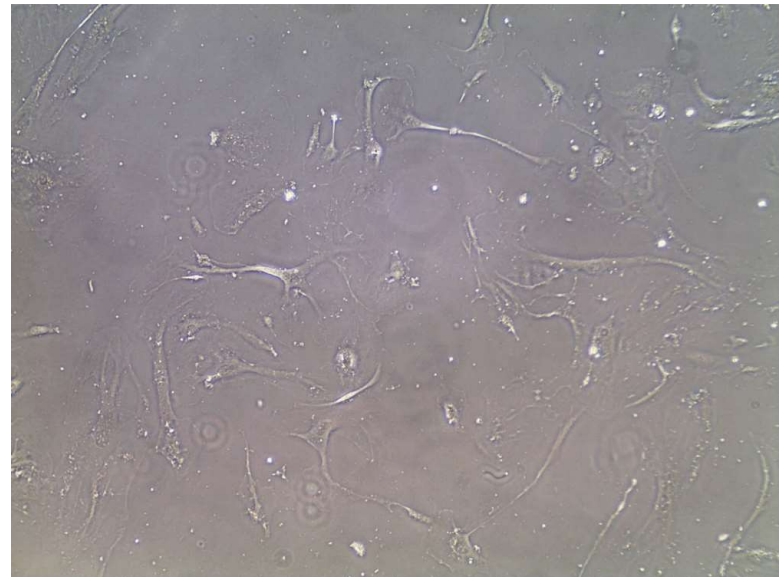
- Analizar su expresión en el modelo de senescencia
- Observar si la expresión de miR-126 es dependiente de HIF-1 α
- Analizar la presencia de HIF-1 α y miRNA-126 en las MV
- Estudiar si Hsp90 es un regulador de la expresión de HIF-1 α en nuestro modelo

Modelo de senescencia replicativa

Línea celular HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) cultivada de forma seriada hasta alcanzar la senescencia, con un “population doubling” (PD) superior a 96



Células HUVEC de pase bajo (pase 6)

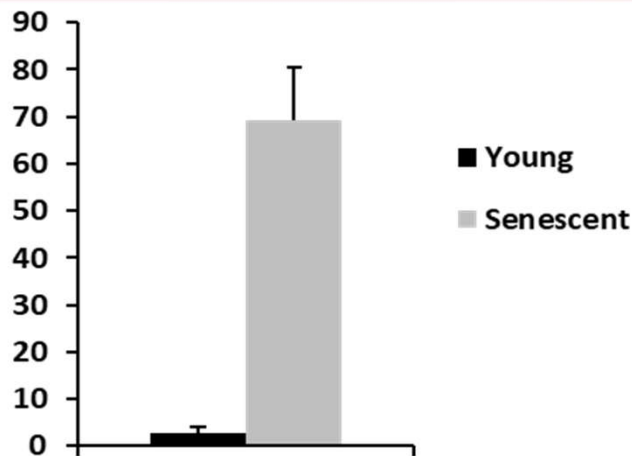


Células HUVEC de pase alto (pase 26)

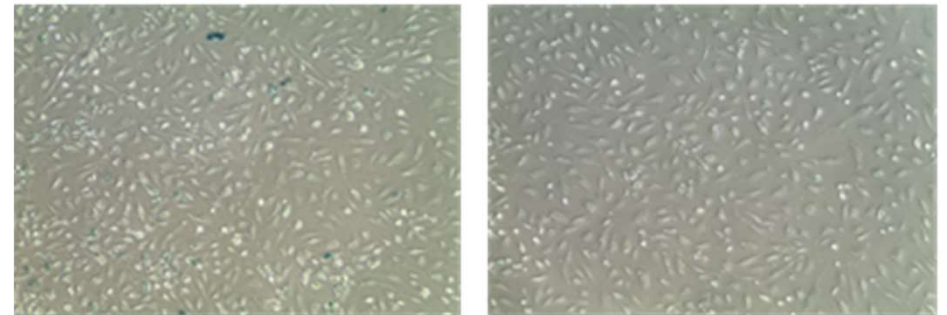
Senescencia en HUVEC: X-gal

Tinción con X-gal, sustrato de la β -galactosidasa, enzima que se expresa en mayores cantidades en células senescentes

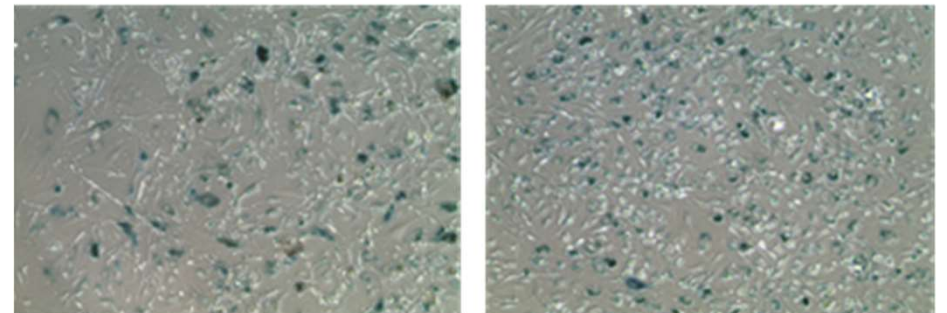
Mayor número de células senescentes (azules) en las de pases más altos



Young endothelial cells



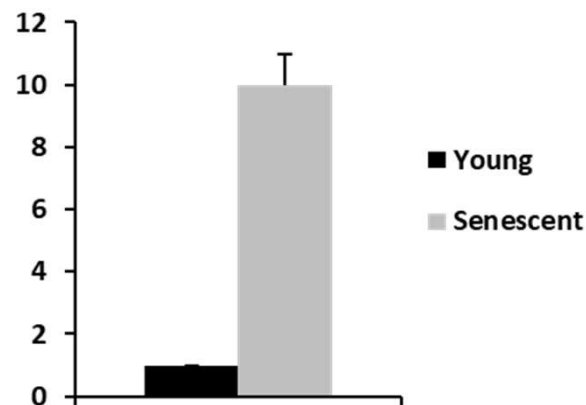
Senescent endothelial cells



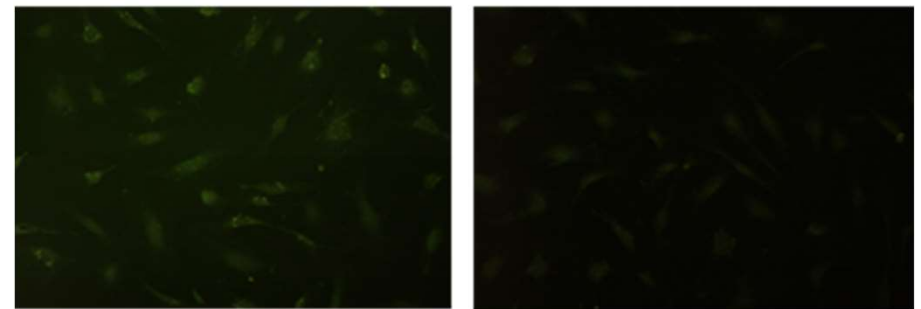
Senescencia en HUVEC: marcaje con C12FDG

CD12FDG: sustrato eliminado por la β -galactosidasa, generando un compuesto fluorescente que queda retenido en las células

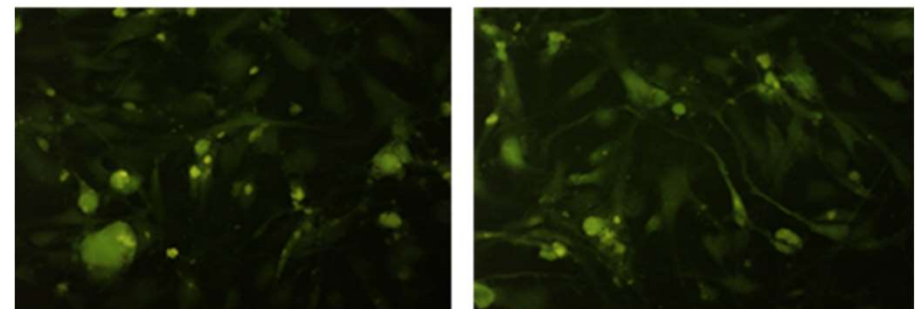
Observamos mayor fluorescencia en las células de pases altos/senescentes



Young endothelial cells



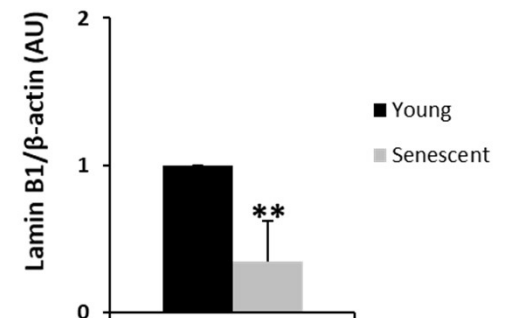
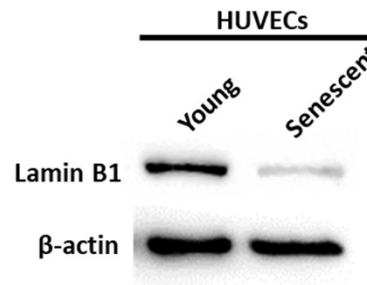
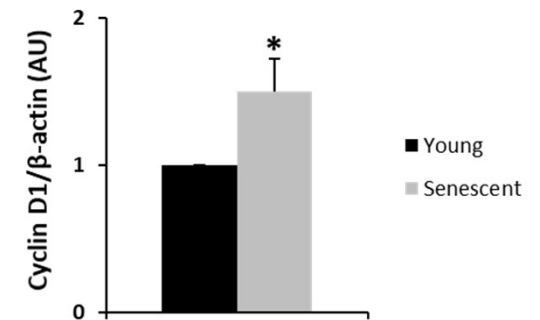
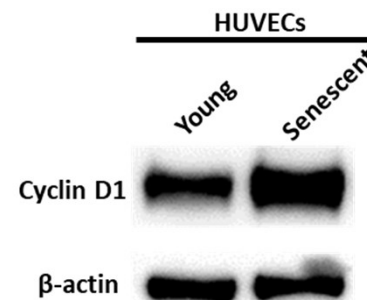
Senescent endothelial cells



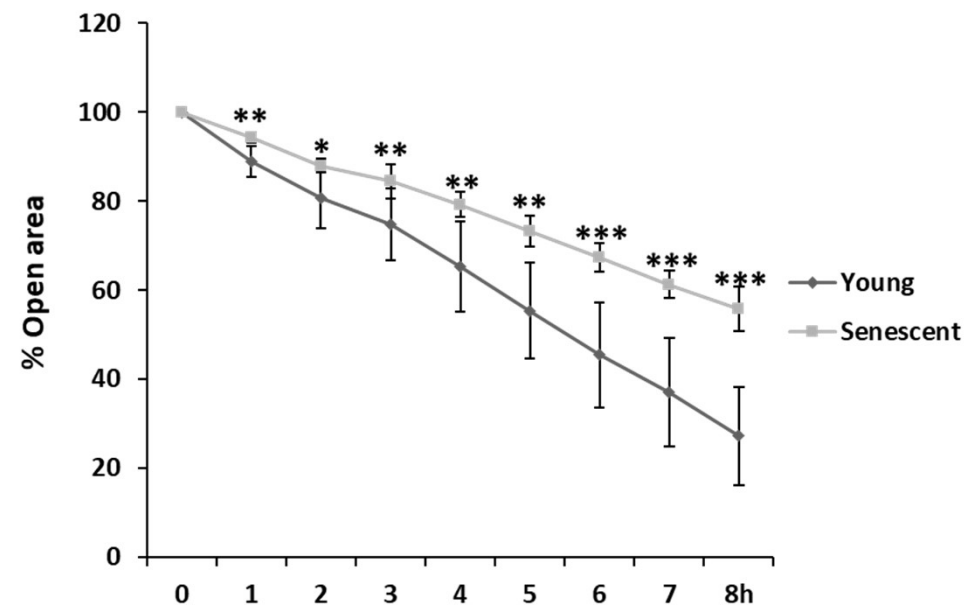
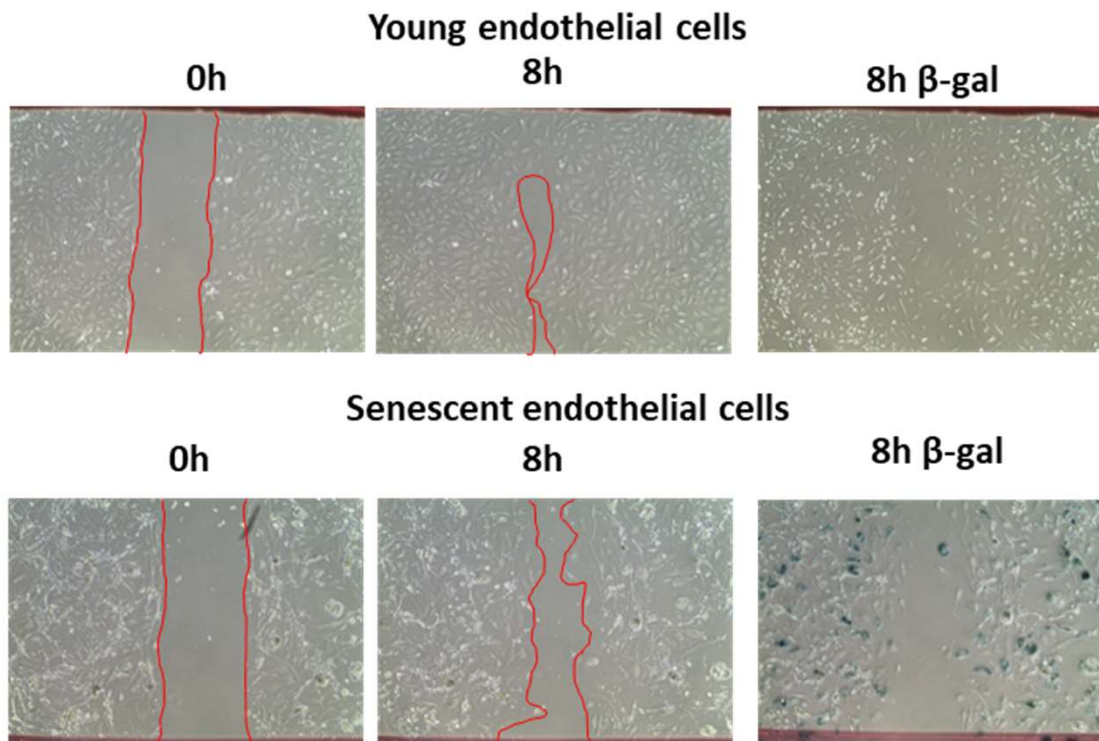
Senescencia en HUVEC: ciclina D1 y laminina B1

Se realiza Western blot (WB) de células jóvenes y senescentes, para analizar la expresión de ciclina D1 y laminina B1 (β -actina como control de carga)

Se observa mayor expresión de ciclina D1 y laminina B1 en las células senescentes, lo que valida nuestro modelo de senescencia



Alteración de la función endotelial: Ensayo de cierre de herida

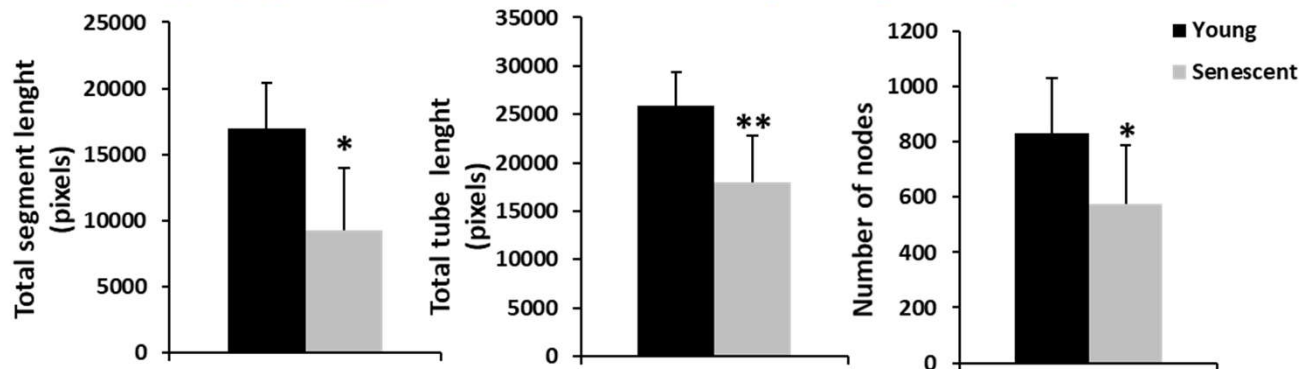
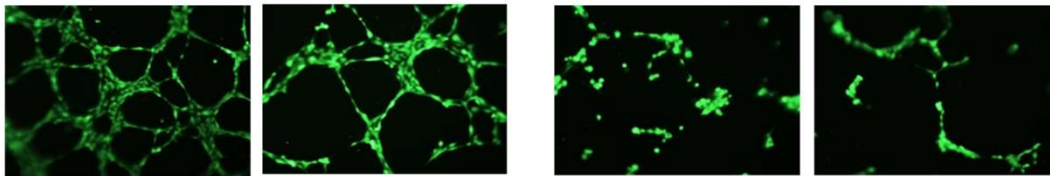
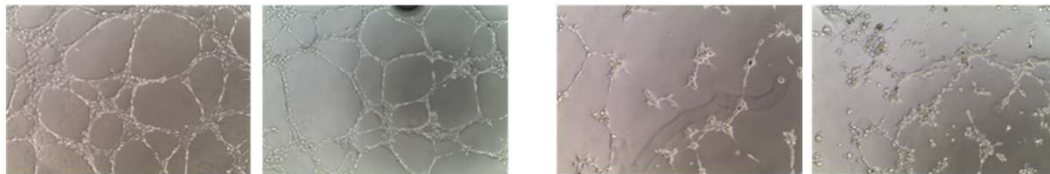


Observamos un cierre más lento en las células senescentes

Alteración de la función endotelial: Ensayo de angiogénesis

Young endothelial cells

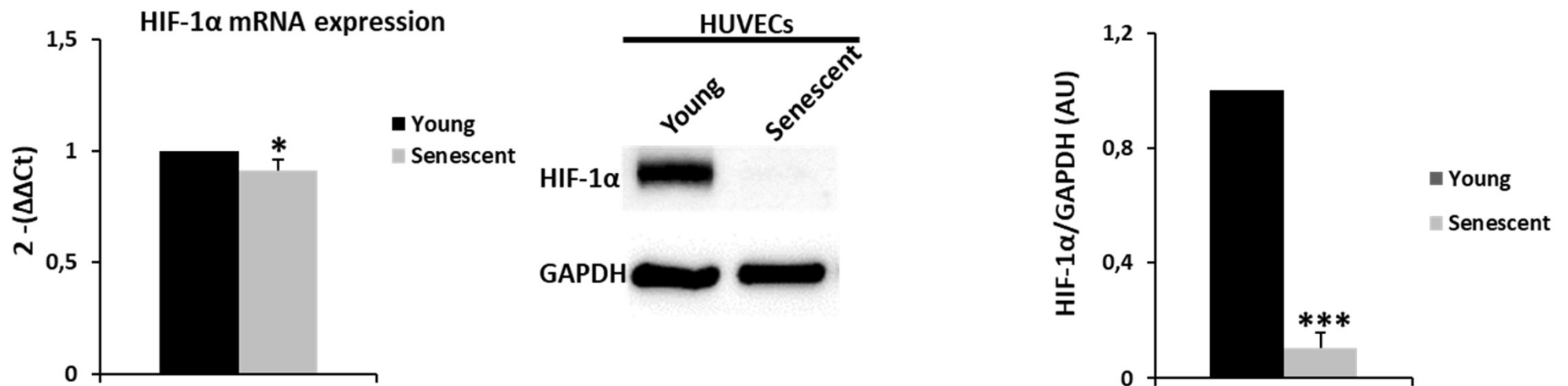
Senescent endothelial cells



Siembra de HUVEC en Matrigel para valorar la capacidad de formación de vasos. Se realizan fotos con microscopio óptico y fluorescente (usando calceína AM)

La longitud de los segmentos formados es menor en las células senescentes

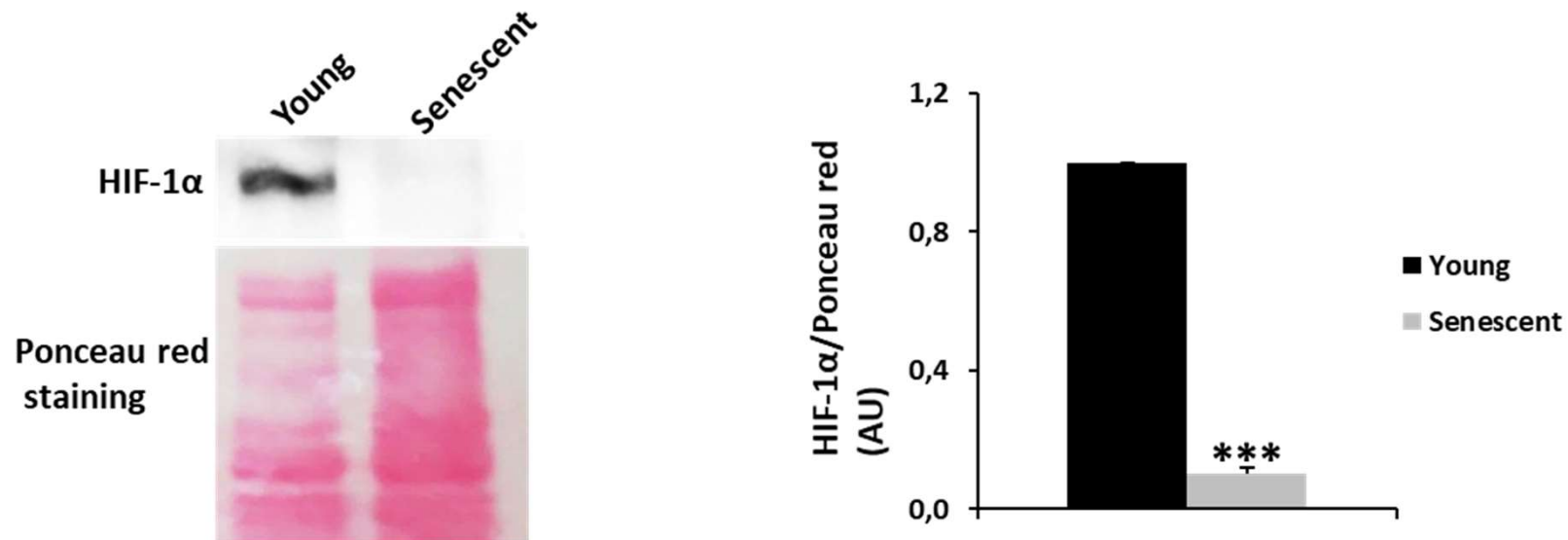
Expresión de HIF-1 α en células HUVEC



Se analiza por qPCR y WB la expresión de HIF-1 α

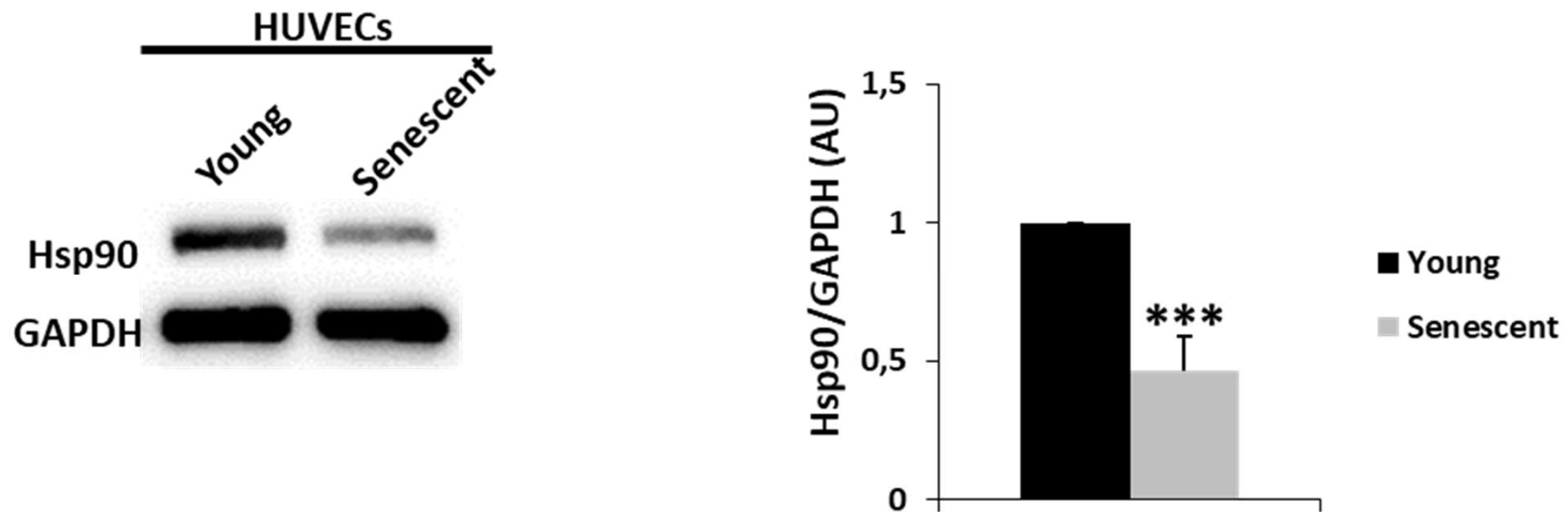
Se observa una expresión de HIF-1 α significativamente reducida en las células endoteliales senescentes

Expresión de HIF-1 α en MV de HUVEC



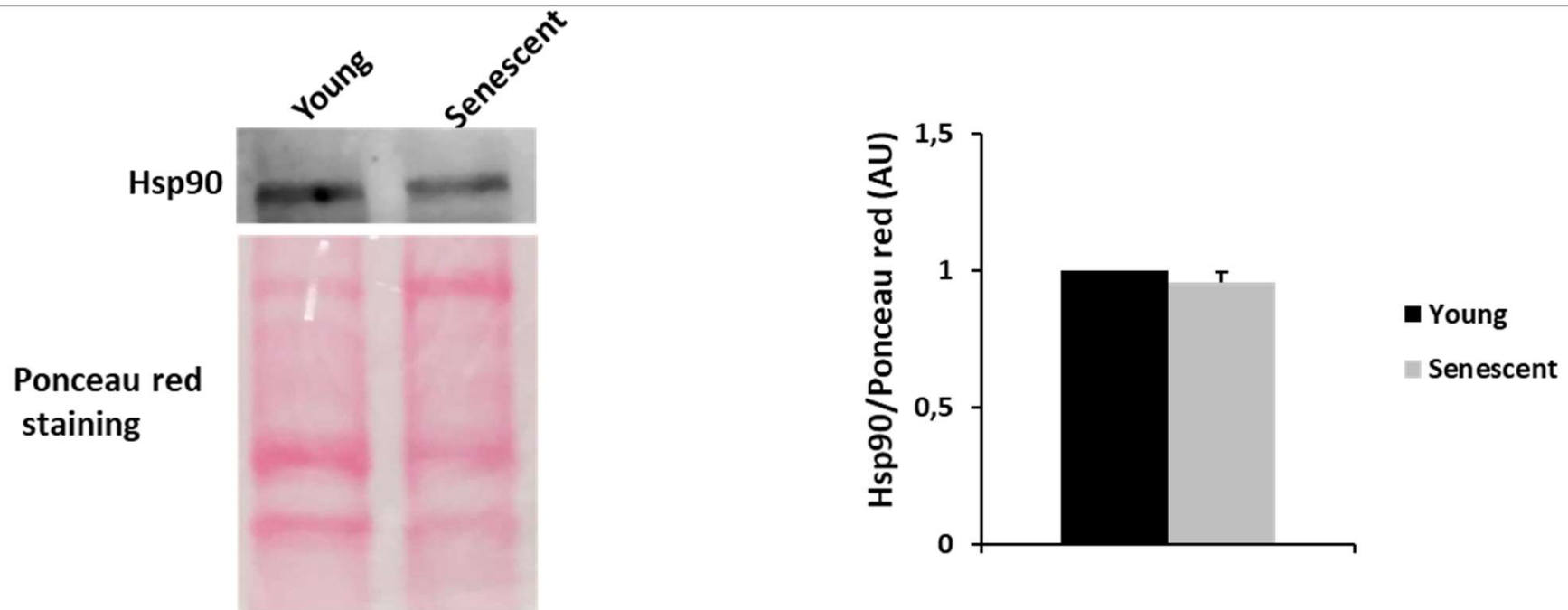
También se observa una menor cantidad de proteína HIF-1 α en el interior de las MV liberadas por las células HUVEC senescentes

Expresión de Hsp90 en células HUVEC



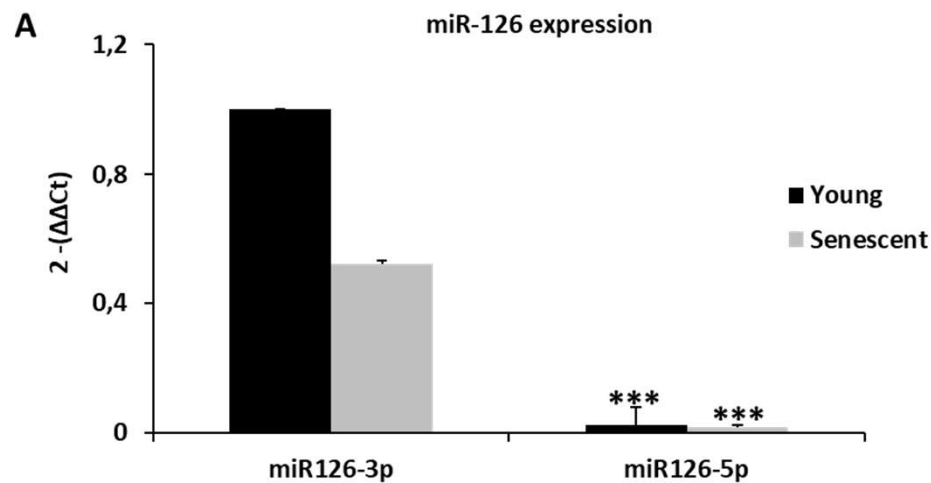
Se analiza la expresión de Hsp90 en células HUVEC por WB, y se observa una menor expresión en las células senescentes, por lo que podría estar implicado en la desaparición de HIF-1 α

Expresión de Hsp90 en MV de HUVEC



Por el contrario, la expresión de Hsp90 en las MV no se ve alterada, por lo que podría estar implicado en la formación o la carga de las MV

miR-126 en células HUVEC



Se analiza la expresión mediante qPCR

Fig. A: Observamos una menor expresión de miR126-5p comparado con miR126-3p tanto en jóvenes como en senescentes

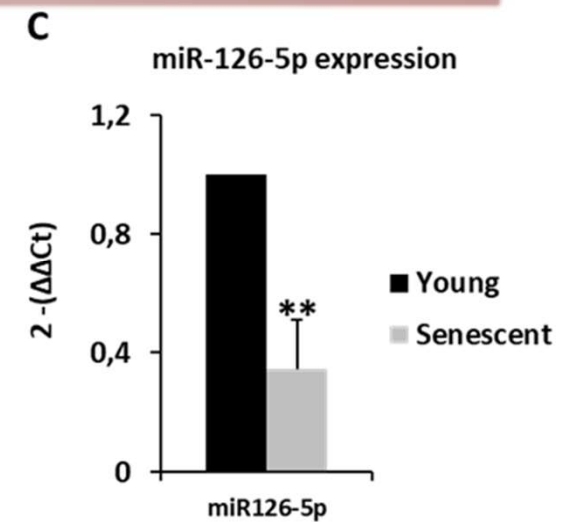
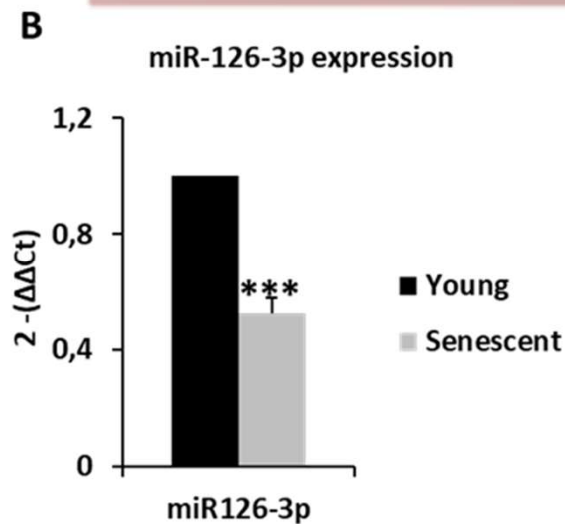
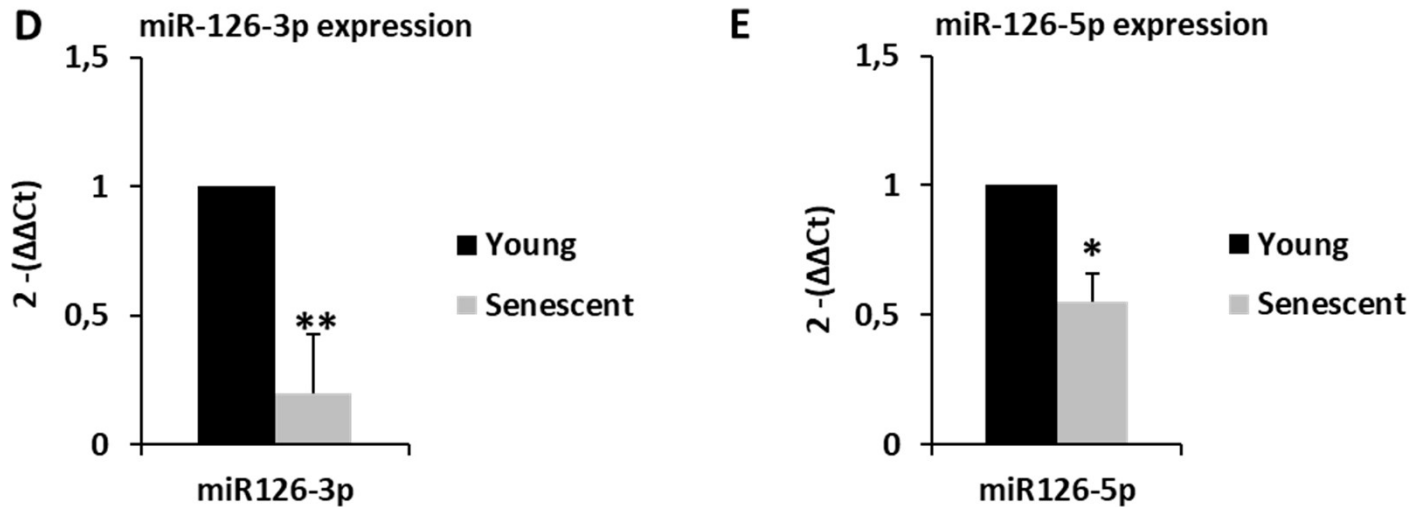


Fig. B y C: La expresión de miR126-3p y miR126-5p está disminuida en las HUVEC senescentes

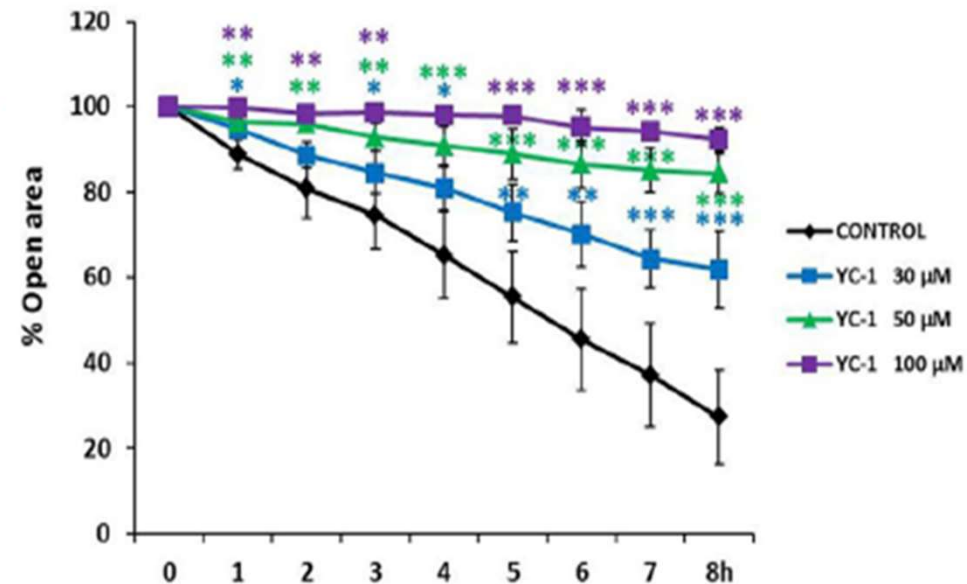
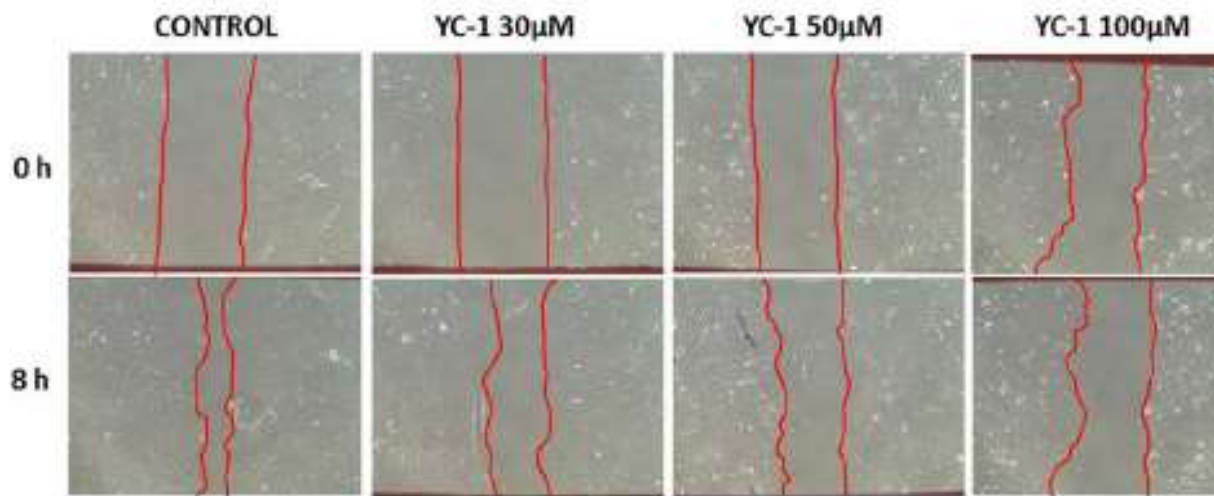
miR-126 en MV de HUVEC



La expresión de miR126-3p y miR126-5p está disminuida en las MV procedentes de HUVEC senescentes comparado con las procedentes de células jóvenes

Inhibición de HIF-1 α en HUVEC jóvenes: Ensayo de cierre de herida

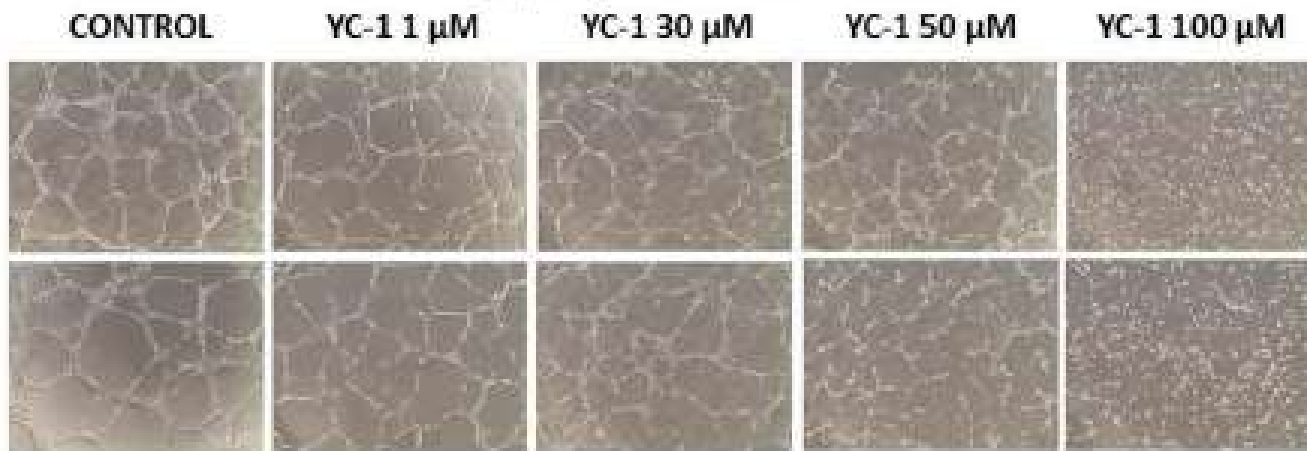
Early passage endothelial cells



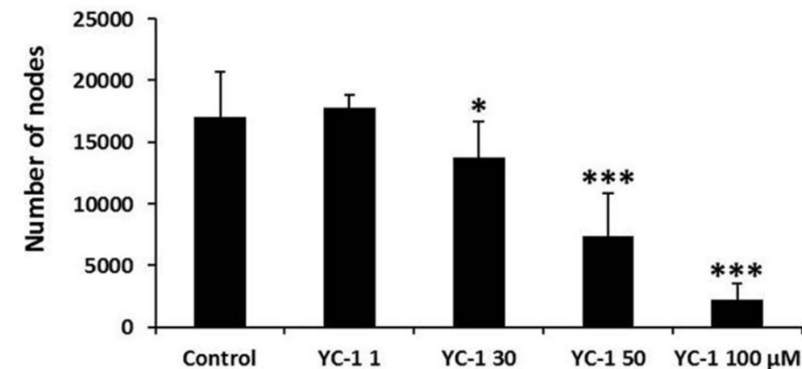
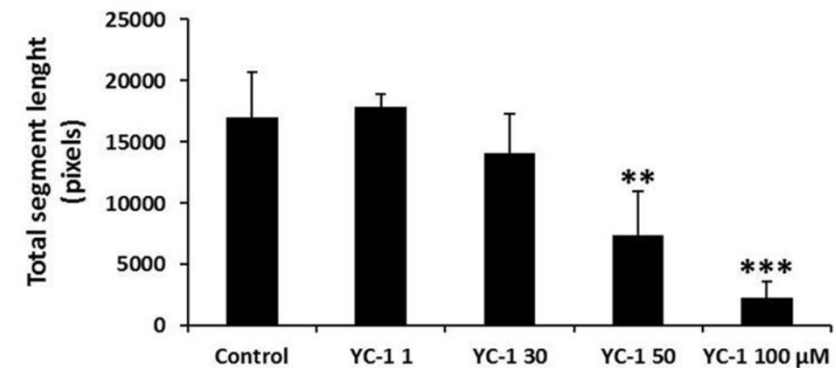
Capacidad de cierre de herida reducida cuando se tratan las HUVEC jóvenes con un inhibidor de HIF-1 α (YC-1)

Inhibición de HIF-1 α en HUVEC jóvenes: Ensayo de angiogénesis

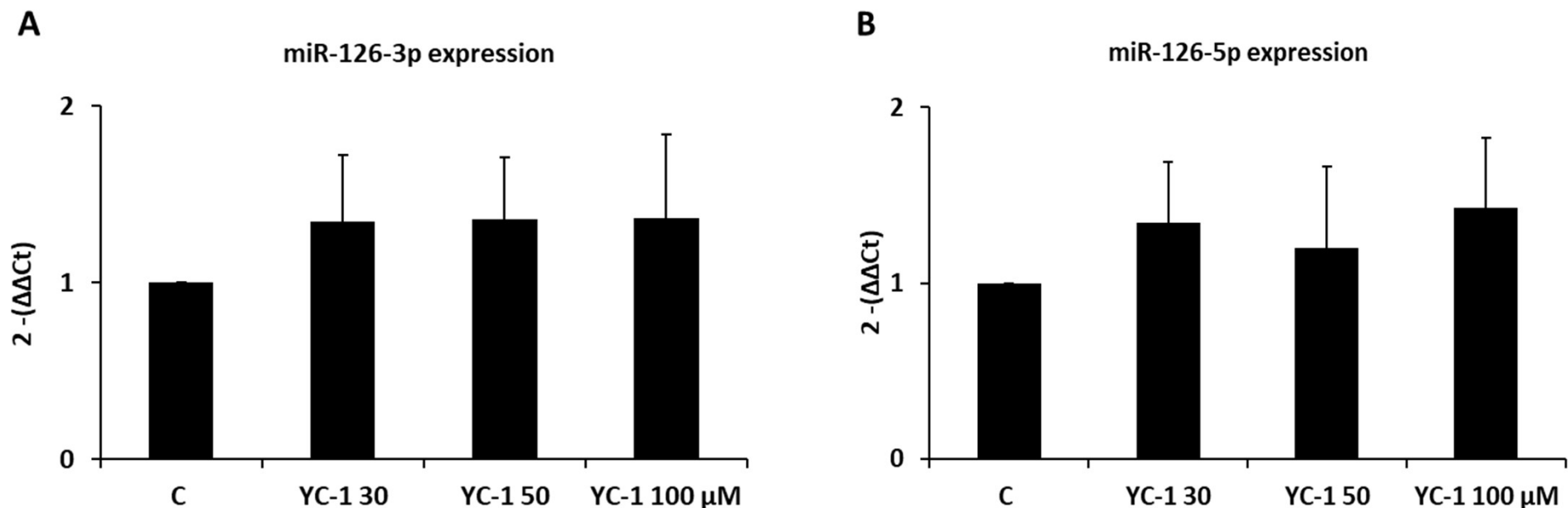
Early passage endothelial cells



A mayor dosis del inhibidor de HIF-1 α , disminuye la capacidad de formación de vasos



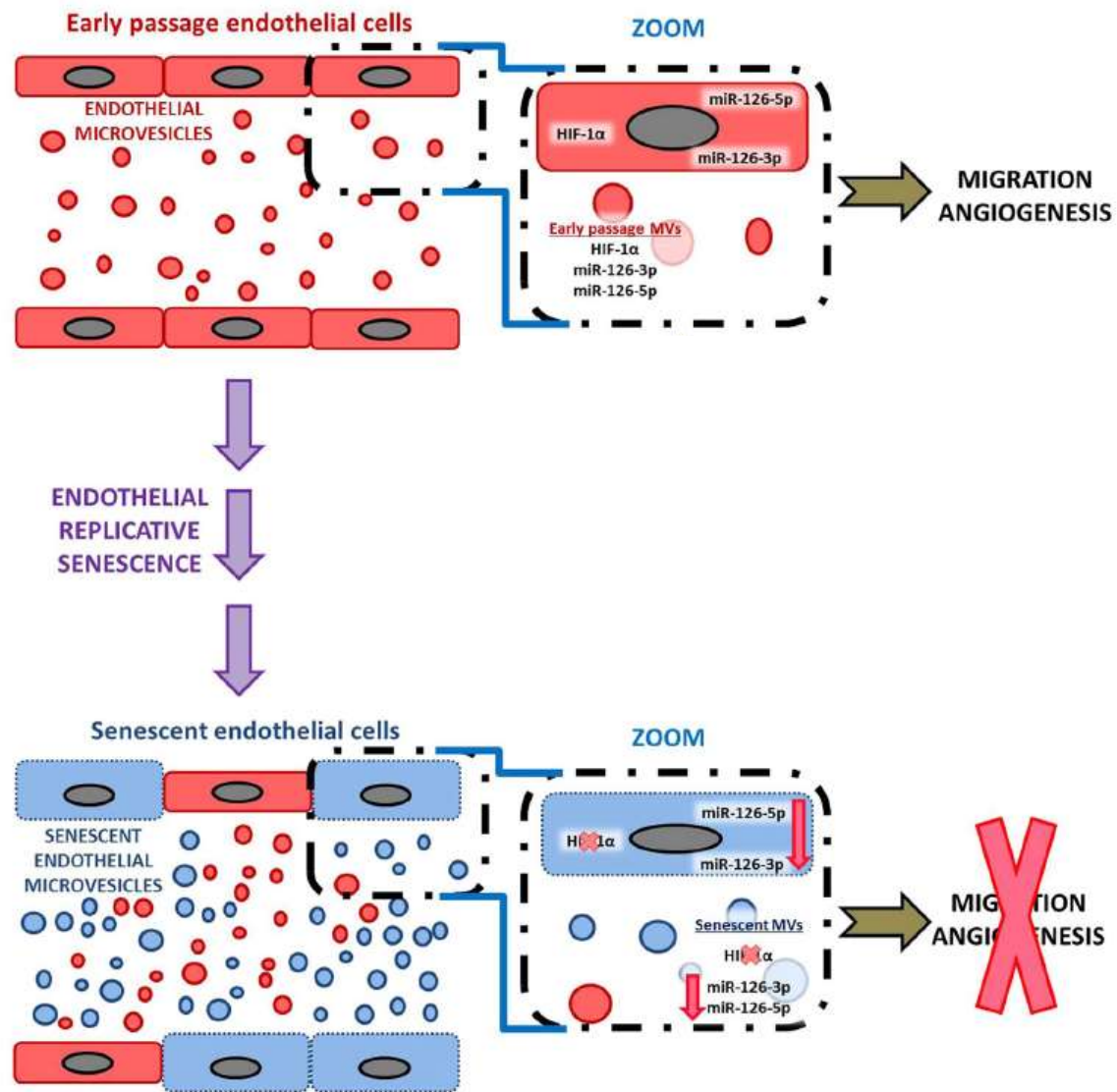
HIF-1 α no regula la expresión de miR-126



Al tratar las HUVEC jóvenes con el inhibidor de HIF-1 α , no se observan cambios en la expresión del miR-126

CONCLUSIONES

- 1 La expresión de HIF-1 α y el miRNA-126 juegan un papel esencial en la homeostasis de las células endoteliales.
- 2 La función protectora y de reparación de HIF-1 α y miRNA-126 son independientes entre sí.
- 3 Estas moléculas pueden ser una diana terapéutica potencial para tratar desórdenes asociados a la edad en la enfermedad renal crónica.



¡Muchas gracias por su
atención!

El estudio ha sido financiado por el Plan Nacional Proyectos de Investigación en Salud del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Feder European Grant (PI14/00806)