

8. Daño endotelial inducido por los anticuerpos antifosfolípidos: papel del estrés oxidativo y mTOR en la regulación de procesos autofágicos

Carlos M. Rodríguez C.; Ángela P. Cadavid J.; Angela M. Álvarez G.;
Carolina Rúa-Molina

El síndrome antifosfolípido (SAF) es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por trombosis o morbilidad gestacional, en presencia recurrente de anticuerpos antifosfolípidos (aAFL). Los mecanismos celulares que desencadenan los aAFL son muy variados lo cual se explica por la heterogeneidad de los mismos, ya que éstos pueden interactuar con diferentes receptores celulares, de forma directa o con la ayuda de cofactores, entre los cuales es de gran importancia la $\beta 2$ glicoproteína I. Los mecanismos celulares-moleculares por los cuales se presenta la trombosis en el SAF aún son materia de estudio, ya que se han visto altas tasas de recurrencia en individuos con terapia antitrombótica, lo que lleva a pensar que no solo defectos en la coagulación expliquen estas manifestaciones clínicas.

Estudios recientes en individuos con nefropatía asociada a aAFLs han demostrado que los eventos trombóticos se asocian a hiperplasia endotelial de la íntima en microvasculatura renal, lo que disminuye la luz de los vasos, favoreciendo así la formación de trombos. Estudios in-vitro en células endoteliales han demostrado que los aAFL inducen estrés oxidativo relacionado con la disminución del potencial mitocondrial, y es sabido que por este mecanismo puede ser activado el blanco para rapamicina en mamíferos complejo 1 (m-TORC1) que aumenta la proliferación celular, lo cual explica la hiperplasia de la íntima en diferentes territorios vasculares.

Un mecanismo opuesto a la proliferación es la autofagia, en la cual se degradan organelas y demás productos celulares que al acumularse pueden causar toxicidad

celular y es bien sabido que la autofagia puede ser inhibida cuando m-TORC1 se encuentra activo. La autofagia se ha visto alterada por los aAFL en células trofoblásticas y se quiere evaluar si ocurre lo mismo en células endoteliales.

Teniendo en cuenta lo anterior, planteamos que en células endoteliales los aAFL al inducir estrés oxidativo, mediante un daño en la mitocondria, llevan a un aumento en la activación de mTORC1, y este a su vez inhibe procesos de autofagia, reduciendo el control de la respuesta inflamatoria.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación del potencial mitocondrial, la actividad del complejo mTORC1 y la autofagia, en la fisiopatogénesis del Síndrome Antifosfolípido y la modulación por las lipoxinas inducidas por aspirina.

Población de estudio:

Se incluirán un grupo de mujeres con aAFL y los siguientes criterios: antecedentes de morbilidad gestacional (n=10), antecedentes de morbilidad gestacional y trombosis vascular (n=10). Además, se incluirán los siguientes controles con aAFL negativos: mujeres con antecedentes de morbilidad gestacional (n=10) y mujeres sanas, con embarazos previos sin complicaciones (n=10).

El modelo de estudio seleccionado son células endoteliales de venas de cordón umbilical humano (HUVEC) las cuales se estimularán con IgG purificada por cromatografía de afinidad a partir de los sueros de las mujeres de los diferentes grupos de estudio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinación potencial de membrana mitocondrial, proliferación celular y acidificación de lisosomas detectados por citometría de flujo con DIOC-6, Ki-67 y Lysotracker green, respectivamente.
- Determinación de actividad de m-TORC1 y formación de autofagosomas detectados por Western Blot con anticuerpos para LC3 II, ULK 1 total y fosforilado y S6 ribosomal Total y fosforilado; se observará el efecto de la rapamicina en la inhibición de m-TORC1, y evaluación de producción de las citoquinas proinflamatorias IL-8 e IL-1 β (ELISA)

.....
Grupo de investigación: Grupo Reproducción

Correspondencia: Carlos M. Rodríguez; carlos.rodriguez@udea.edu.co

Financiación: CODI-2015-7448

RESULTADOS PRELIMINARES

- Entrenamiento en el aislamiento y cultivo de células HUVEC.
- Obtención de las muestras de las mujeres con y sin aAFL.
- Estandarización de las siguientes técnicas: Western Blot para fosforilación de S6r; cambios en el potencial mitocondrial por DIOC-6; detección, por

citometría de flujo, de la formación de lisosomas y proliferación celular con Lysotracker green y Ki-67, respectivamente.

PALABRAS CLAVE

Anticuerpos Antifosfolípidos; Autofagia; Endotelio; Estrés Oxidativo; mTORC1; Síndrome Antifosfolípido; Trombosis