

Regulación de la filtración glomerular por la matriz extracelular: implicación de la quinasa ligada a integrinas en la vía del NO/GMPc

José Luis Cano Peñalver*, Sergio de Frutos García, Mercedes Griera Merino, Manuel Rodríguez Puyol*

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, Crta. Madrid-Barcelona Km 33,600 Alcalá de Henares, 28871 Madrid, España

Resumen

El proceso de vasodilatación del eje óxido nítrico (NO)/guanilato ciclasa soluble (GCs)/GMPc/proteína quinasa dependiente de GMPc (PKG) permite regular la filtración glomerular en el riñón. En las patologías renales crónicas se producen cambios cuantitativos y cualitativos de matriz extracelular (MEC), que mediante la activación de la quinasa ligada a integrinas (ILK) disminuyen la actividad vasodilatadora de la vía NO/GMPc. El presente trabajo estudia el papel de la ILK en la regulación del eje NO/GMPc a nivel renal y sus consecuencias sobre la filtración glomerular en un modelo murino knock-out condicional para la ILK en condiciones basales o tratados con un donador de NO. El grupo knock-out mostró basalmente poliuria y mayor aclaramiento de creatinina en comparación con el control, debido a una mayor expresión de GCs y PKG. El tratamiento con el NO aumentó de manera sinérgica ambas medidas en el grupo knock-out. Aunque el tratamiento con el donador de NO produjo taquifilaxia en ambos grupos, los niveles de GCs y PKG en los animales knock-out se vieron compensados en parte con respecto a los controles. La delección de la ILK favorece la filtración glomerular y además revierte parcialmente los efectos de tolerancia debidos a un tratamiento prolongado con donadores de NO.

Palabras clave: matriz extracelular, quinasa ligada a integrinas, óxido nítrico, guanilato ciclasa soluble, proteína quinasa dependiente de GMPc, taquifilaxia.

Cita: Vano J L, de Frutos S, Griera M, Rodríguez-Puyol M (2013) Regulación de la filtración glomerular por la matriz extracelular: implicación de la quinasa ligada a integrinas en la vía del NO/GMPc. *Dianas* 2(1): e20130303. ISSN 1886-8746 [dianas.20130303](https://doi.org/10.1016/j.dianas.2013.03.003) URI

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: 6 de julio, 2012

Copyright: © 2013 Cano et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.es_ES

*E-mail: jose.cano@edu.uah.es; manuel.rodriguez@uah.es



Introducción

Para el buen funcionamiento de los órganos se precisa de una correcta interacción entre las células y la MEC. La fibrosis se considera una alteración característica de varias enfermedades de los sistemas vascular y renal entre otros, de manera que aparece un cambio cualitativo y cuantitativo en la MEC.

La MEC interacciona con las células mediante una serie de receptores de membrana conocidos como integrinas. Uno de los principales mediadores en esta transmisión de señales es la quinasa ligada a integrinas (ILK). A nivel renal, la función de ILK es fundamental en el desarrollo del riñón [1] así como en procesos patológicos que cursan con fibrosis [2] o en la diabetes [3]. Además su bloqueo farmacológico previene el desarrollo de fibrosis en un modelo de nefropatía obstructiva [4]. Estos hallazgos ponen de manifiesto la importancia de la ILK en la fibrosis renal.

Se sabe que el riñón tiene la capacidad de regular la filtración glomerular (FG) ajustando el calibre de los vasos del glomérulo, principalmente la arteriola aferente [5]. Para ello puede servirse de la vía del NO/GMPc entre otras. En un riñón sano, la óxido nítrico sintasa produce NO. Este se une a la GCs para favorecer un aumento en los niveles de GMPc, el cual activa a la PKG que media la relajación del músculo liso, aumentando así la FG [6]. Sin embargo, en un riñón enfermo que haya sufrido fibrosis este proceso puede estar alterado. En trabajos del grupo, se ha demostrado que en modelos celulares la MEC alterada puede activar a la ILK reduciéndose la expresión de NO [7] y de la GCs [8]. De estos resultados se deduce que la activación de la vía del NO/GMPc es inhibida por la ILK.

En la fibrosis renal podría existir una alteración en el sistema NO/GMPc cuyas consecuencias alterasen la FG. El objetivo del presente trabajo es estudiar cuáles pueden ser las consecuencias de la delección de la

ILK sobre la función renal y, más concretamente, en el mecanismo de vasodilatación a ese nivel. Para ello se han empleado ratones control (WT) y ratones knock-out para la ILK inducidos en la edad adulta (cKO-ILK).

Materiales y Métodos

Obtención y mantenimiento de ratones cKO-ILK, tratamientos y adquisición de muestras biológicas

Los ratones permanecieron enjaulados en condiciones controladas, libre de patógenos a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Se les proporcionó comida y bebida ad libitum. La cepa de ratón empleada fue la C57BL/6, que se modificó genéticamente mediante el sistema Cre/Lox. Ratones transformados con el gen que codifica para la ILK, con una secuencia LoxP entre los exones 4 y 5 y los exones 12 y 13, homocigotos (ILK^{fl/fl}, floxeados); fueron cruzados con otros transformados con el gen que codifica para la recombinasa Cre, con un promotor inducible por tamoxifeno, homocigotos (Cre/Cre). Así se obtuvieron ratones heterocigotos para ambas transformaciones (ILK^{fl/+}, Cre). Estos ratones fueron retrocruzados con los floxeados para obtener ratones con ambos alelos de la ILK floxeados, y la secuencia Cre (ILK^{fl/fl}, Cre). La inducción de Cre, se realizó a los 2 meses del nacimiento mediante una inyección de tamoxifeno (1,5 mg/ratón por día) durante 5 días. La delección de ILK fue confirmada por PCR cualitativa tres semanas después de pinchar el tamoxifeno (a los 3 meses de edad) [9]. Una vez verificada la delección de ILK, este grupo cKO-ILK y otro grupo WT se dispusieron en cajas metabólicas durante 24h para su habituamiento y otras 24h para recolectar su orina. Paralelamente, este mismo proceso se siguió con otros dos grupos de animales, uno cKO-ILK y otro WT, tratados con dinitrato de isosorbide (IDN, 300 mg/kg por día) durante 24h. Tras este periodo, los animales fueron sacrificados para extraer sus riñones y su sangre. La orina fue centrifugada a 1500 rpm durante 5 min y el sobrenadante se pasó a un nuevo eppendorf para ser almacenado a -20°C . La sangre fue centrifugada a 3000 rpm durante 15 min, a 4°C ; y el plasma se pasó a un nuevo eppendorf para ser almacenado a -20°C . Los riñones fueron almacenados a -20°C en RNA later (Ambion).

Aclaramiento de creatinina

La creatinina fue medida en orina (Cu) y en plasma (Cp) usando kits comerciales (Cayman Chemical) siguiendo las instrucciones del fabricante. El aclaramiento de creatinina se obtuvo multiplicando el ratio Cu/Cp por el volumen de orina a las 24h.

Western-blot

Fragmentos de la corteza del riñón fueron homogeneizados mecánicamente en buffer de lisis (10 mmol/L Tris-HCL, pH 7,6, tritón 1%, desoxicolato sódico 0,1%, leupeptina 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pepstatina 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, aprotinina 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 500 $\mu\text{mol}/\text{L}$). 30 μg de los extractos obtenidos de proteína total fueron separados en geles de SDS-poliacrilamida al 8% y transferidos a membranas de PVDF. 5 μL de marcador de peso molecular fue pinchado en un carril adyacente a las muestras. Las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% (peso/volumen) en TTBS (50 mmol/L Tris-HCL, pH 7,5, 150 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, 0,1% Tween) y luego incubadas con los anticuerpos PKG-I- β , GCs- β 1 y actina durante 24h a 4°C . Tras 3 lavados en TTBS de 10 min, las membranas fueron incubadas 1h con anticuerpo secundario de cabra conjugado a peroxidasa anti-rabbit IgG. Tras 3 lavados en TTBS de 10 min, las bandas de las membranas fueron visualizadas con Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) y posteriormente expuestas a películas fotográficas CL-XPosure Films (Thermo Scientific). Finalmente las películas fueron escaneadas para su posterior análisis densitométrico.

Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como el porcentaje de la media \pm SEM con respecto a los valores obtenidos de los animales WT (que son considerados como el 100%), de al menos seis animales distintos. La diferencia significativa se considera superior al 95% (* = $p < 0.05$ vs WT). Todos los resultados fueron analizados con el software GraphPad Prism 5.03 mediante un One-Way ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples Newman-Keuls.

Resultados

El grupo cKO-ILK produjo un mayor volumen de orina que aumentó de manera sinérgica con la activación de la vía NO/GMPc

Para evaluar el grado de activación de la vía NO/GMPc, ésta se indujo mediante la administración de IDN como donador de NO. Entonces se midió el volumen de orina producido tras 24h por los grupos WT y

cKO-ILK en situación basal o tratados con IDN. Basalmente, el grupo cKO-ILK mostró unos volúmenes de orina significativamente mayores que los del grupo WT.

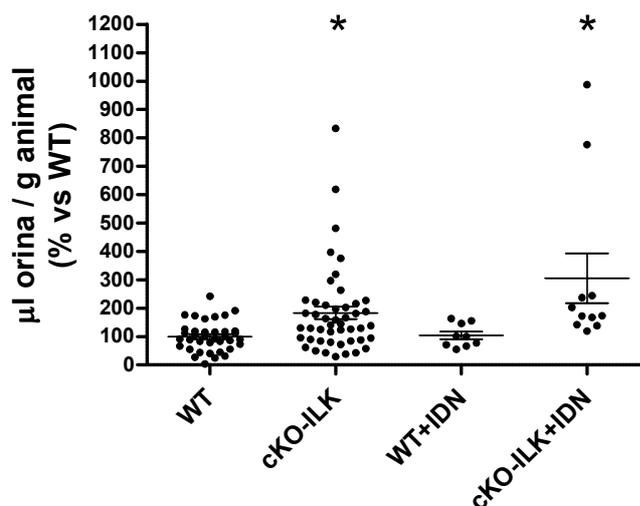


Figura 1: Volúmenes de orina a las 24h de ratones WT y cKO-ILK, en condiciones basales o tratados con IDN

El grupo WT tratado con IDN presentó una ligera tendencia a aumentar sus niveles de orina con respecto a de los WT basales, no obstante la diferencia no fue significativa. Por otro lado, el grupo cKO-ILK tratado con IDN mostró unos volúmenes de orina mayores que los grupos basales. Este último resultado sugiere que los efectos derivados de la inhibición de la ILK y la activación de la vía NO/GMPc se suman consiguiendo una poliuria mayor, por lo que la vía de NO/GMPc podría estar regulada por la delección de la ILK.

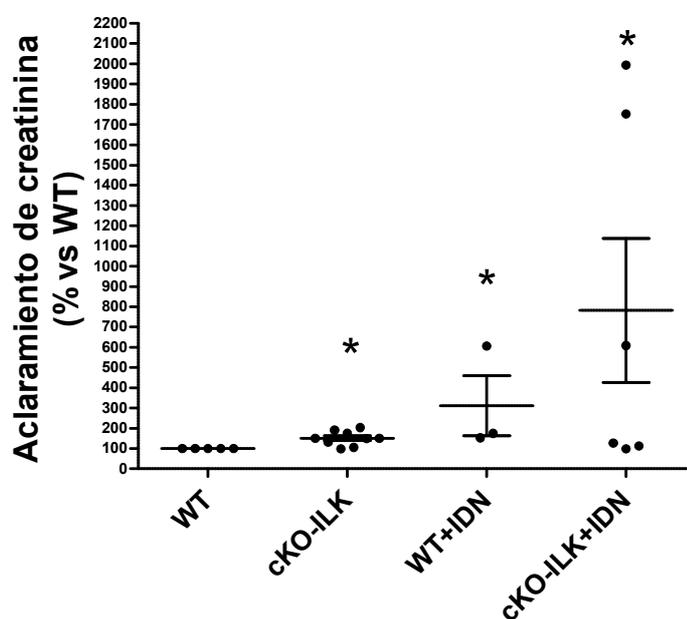


Figura 2: Aclaramiento de creatinina en ratones WT y cKO-ILK, en condiciones basales o tratados con IDN

La FG mejoró en el grupo cKO-ILK, que aumentó de manera sinérgica tras activar la vía de NO/GMPc

La FG se evaluó midiendo el aclaramiento de creatinina de los distintos grupos. A nivel basal, el grupo cKO-ILK presentó mayores valores que los WT. Al tratar a los animales con IDN, tanto los WT como los cKO-ILK aumentaron sus niveles de aclaramiento de creatinina con respecto a la situación basal. El grupo cKO-ILK presentó unos niveles mucho mayores sugiriendo que la inhibición de la ILK y la

activación de la vía NO/GMPc actúan sinérgicamente mejorando la FG, de manera que la vía NO/GMPc podría estar regulada por la delección de ILK.

La delección de ILK produjo un aumento en la expresión de la GCs en la corteza renal y mejoró parcialmente el proceso de taquifilaxia observado tras el tratamiento prolongado con donadores de NO

Puesto que la vía del NO/GMPc parecía estar mediando los efectos observados en los ratones con la ILK delecionada, decidimos analizar los niveles de expresión de las proteínas implicadas en este eje. Para ello estudiamos mediante Western-blot los niveles de la GCs en los diferentes grupos experimentales. El grupo cKO-ILK presentó niveles de expresión de esta proteína significativamente mayores. Estos resultados demuestran que la delección de la ILK aumenta la capacidad vasodilatadora en riñón basalmente mediante el aumento de la expresión de una proteína mediadora en el eje NO/GMPc como es la GCs.

Ambos grupos sufrieron un efecto de taquifilaxia previsible tras el tratamiento con donadores de NO durante 24h, sin embargo en el grupo cKO-ILK tratado, los niveles superaron los observados en los WT tratados, restaurándose en parte la pérdida de expresión. Estos resultados demostraron que la delección de la ILK compensa el efecto de desensibilización producido por el IDN.

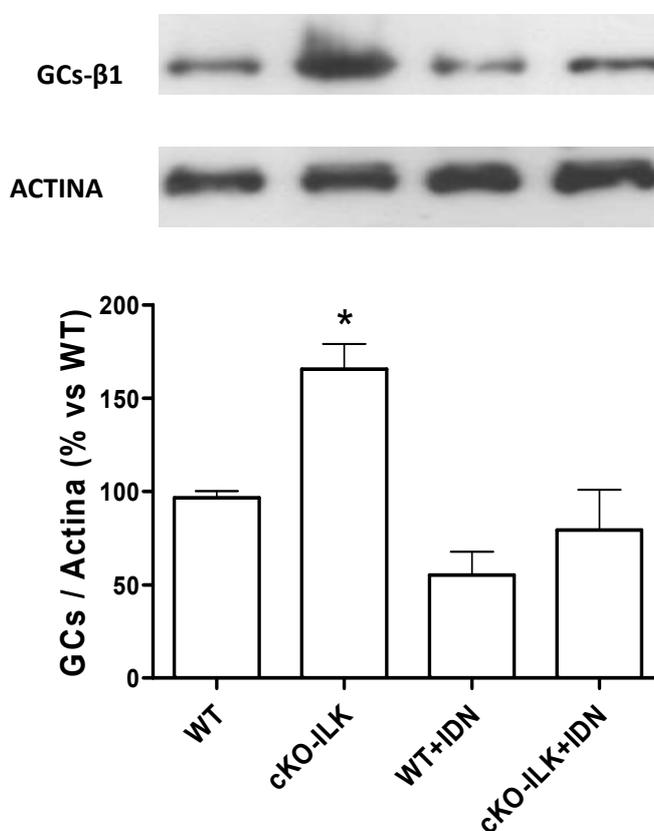


Figura 3: Niveles de expresión de GCs en ratones WT y cKO-ILK, en condiciones basales o tratados con IDN y Western-blot representativos de la GCs y la actina como control de carga

La PKG expresada en la corteza renal aumentó con la delección de la ILK y compensó en parte la taquifilaxia que sucede por el empleo de donadores de NO.

Puesto que la delección de la ILK estaba ejerciendo los cambios observados en los animales knock-out a través del eje NO/GMPc, analizamos por Western-blot los niveles de otra proteína implicada en dicha vía, en este caso la PKG. El grupo cKO-ILK mostró mayores niveles basales de expresión de esta proteína. Estos resultados demuestran que la delección de ILK aumenta la capacidad vasodilatadora en riñón basalmente mediante el aumento de la expresión de una proteína mediadora en el eje NO/GMPc como es la PKG.

El tratamiento con el donador de NO durante 24h produjo taquifilaxia en ambos grupos, pero en el grupo cKO-ILK los niveles se acercaron mucho a los del grupo WT basal. Estos resultados evidencian que la

delección de la ILK ayuda a restituir los niveles de expresión afectados por el efecto de tolerancia que causa el tratamiento con IDN.

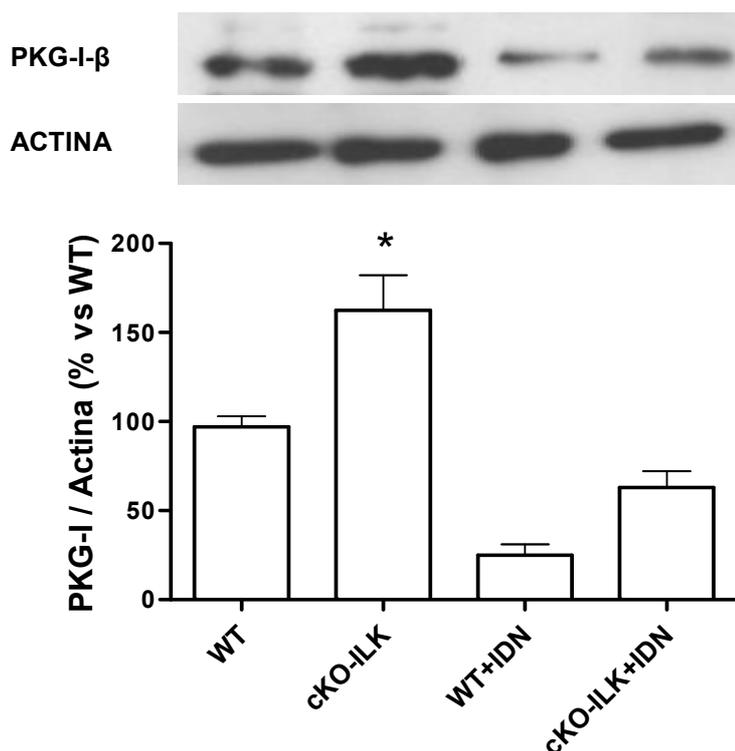


Figura 4: Niveles de expresión de la PKG en ratones control y cKO-ILK, en condiciones WT o tratados con IDN y Western-blot representativos de la PKG y la actina como control de carga

Discusión

La delección de la ILK produce un aumento en los niveles de expresión de la PKG y la GCs, mejorando la vasodilatación glomerular dependiente de la vía del NO/GMPc y por lo tanto una mejora en la FG.

Estos resultados demuestran por primera vez en un modelo in vivo el papel regulador de la ILK en la vía del NO/GMPc a nivel renal, que ya había sido insinuado en modelos de células vasculares [7-8]. La regulación de la vasodilatación mediada por la delección de la ILK afecta al funcionamiento del riñón e implica una serie de consecuencias que se pueden observar en los resultados obtenidos. La primera consecuencia es un aumento en el volumen final de la orina, la segunda consecuencia es una mejora en el aclaramiento de creatinina. Un aumento en la formación de la orina no es una ventaja que se pueda aprovechar clínicamente en la mejora de una nefropatía. Sin embargo, cualquier proceso que lleve a un aumento en el aclaramiento de creatinina podría resultar beneficioso en toda nefropatía que implique o progrese a una insuficiencia renal. Por lo tanto, de estos resultados se puede deducir que la delección de ILK puede suponer una estrategia beneficiosa en el tratamiento de las patologías renales. Por otro lado, se demostró que la activación de la vía vasodilatadora del NO/GMPc mediante la administración de un donador de NO a los animales mejoró aún más las dos consecuencias anteriores, sobre todo en los animales con la ILK delecionada. Esto implica que la delección de la ILK produce una mejora en el sistema vasodilatador mediado por GMPc del riñón.

Como ya hemos comentado, la ILK media la expresión de los elementos del eje NO/GMPc. Para profundizar en los mecanismos que llevan a la mejora de la vasodilatación glomerular observada en los cKO-ILK, estudiamos los niveles de expresión de las proteínas GCs y PKG. Los niveles de estas proteínas son mayores en los animales cKO-ILK, lo que confirma que la delección de ILK lleva a un aumento de expresión y por lo tanto de actividad de la vía de NO/GMPc.

Los donadores de NO se usan actualmente en clínica para el tratamiento de la cardiomiopatía isquémica y otras enfermedades cardiovasculares [10]. Uno de los principales problemas que plantea su uso es la aparición de taquifilaxia: tras un tratamiento continuado con este tipo de fármacos, sus efectos empiezan a disminuir, siendo necesario aumentar progresivamente la dosis o sustituirlos por otros. Este proceso de desensibilización ha sido descrito exhaustivamente por autores de este grupo y otros en la literatura [11] y es debido en parte a una disminución en la expresión de las proteínas que intervienen en el eje NO/GMPc.

En nuestros experimentos, el tratamiento con IDN durante 24 horas produjo la previsible taquifilaxia sobre la GCs y la PKG. Sin embargo, el grupo cKO-ILK tratado con IDN, mostró una restauración en la expresión hasta niveles parecidos a los WT basales, demostrando que el aumento de la expresión de estas proteínas mediado por la delección de la ILK compensa en parte la taquifilaxia que provoca el tratamiento prolongado con donadores de NO.

Analizando todos estos resultados de manera conjunta, llegamos a la conclusión de que la MEC juega un papel fundamental en la regulación la FG y pensamos que el tratamiento combinado con donadores de NO y terapias que bloqueen o inhiban la expresión de la ILK podría ser eficaz ante una nefropatía renal. Para profundizar en esta observación sería interesante estudiar el papel la delección de la ILK sobre la vía de vasodilatación del NO/GMPc y la FG en nuestro modelo animal tras inducir fracaso renal.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad de España (Plan nacional I+D) (SAF2010-16198). Cano-Peñalver JL. tiene una beca del Programa de Formación de Personal Investigador asociada al citado proyecto (FPI-MICINN) (BES-2011-045069).

Referencias

1. Lange A., Wickström SA., Jakobson M., Zent R., Sainio K. and Fässler R. 2009. Integrin linked kinase is an adaptor with essential functions during mouse development. *Nature*. 461(7266):1002-1006
2. Shimizu M., Kondo S., Urshihara M., Takamatsu M., Kanemoto K., Nagata M. and Kagami S. 2006. Role of integrin-linked kinase in epithelial-mesenchymal transition in crescent formation of experimental glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant*. 9021(9):2380-2390
3. Guo L., Sanders PW., Woods A. and Wu C. 2001. The distribution and regulation of integrin-linked kinase in normal and diabetic kidneys. *J. Am. Pathol.* 159(5):1735-1742
4. Li Y., Tan X., Dai C., Stolz DB., Wang D. and Liu Y. 2009. Inhibition of integrin-linked kinase attenuates renal interstitial fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20(9):1907-1918
5. Stockand JD. and Sansom SC. 1998. Glomerular mesangial cells: Electrophysiology and regulation of contraction. *Physiol. Rev.* 78(3):723-744
6. Lucas KA., Pitari GM., Kazerounian S., Ruiz-Stewart I., Park J., Schulz S., Chepenik KP. and Waldman S. 1998. Guanylyl cyclases and signalling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.* 52(3):375-414
7. González-Santiago L., López-Ongil M., Rodríguez-Puyol M. and Rodríguez-Puyol D. 2002. Decreased nitric oxide synthesis in human endothelial cells cultured on type I collagen. *Circ. Res.* 90(5):539-545
8. De Frutos S., Saura M., Griera M., Rivero-Vilches F., Zaragoza C., Rodríguez-Puyol D. and Rodríguez-Puyol M. 2005. Differential Regulation of Soluble Guanylyl Cyclase Expression and Signaling by Collagens: Involvement of Integrin-Linked Kinase. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16(9):2626-2635
9. Terpstra L., Prud'homme J., Arabian A., Takeda S., Karsenty G., Dedhar S. and St-Arnaud R. 2003. *J. Cell Biol.* 162(1):139-148
10. Rossoni G., Manfredi B., Del Soldato P. and Berti F. 2004. The nitric oxide-releasing naproxen derivative displays cardioprotection in perfused rabbit heart submitted to ischemia-reperfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 310(2):555-562
11. Ruiz-Torres MP., Griera M., Chamarro A., Díez-Marqués ML., Rodríguez-Puyol D. and Rodríguez-Puyol M. 2009. Tirofiban increases soluble guanylate cyclase in rat vascular walls: pharmacological and pathophysiological consequences. *Cardiovasc. Res.* 82(1):125-13