

Papel del óxido nítrico sobre la regulación de ILK durante la remodelación vascular.

Paula Reventún Torralba¹, Marta Saura Redondo¹

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

La remodelación vascular es, junto con la disfunción endotelio, uno de los principales fenómenos de la aterosclerosis. En estas situaciones la matriz extracelular cambia y sus señales son transmitidas a las células de la pared vascular a través de su interacción con las integrinas. La quinasa ligada a integrinas (ILK) juega un papel de vital importancia en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular, participa en la formación de vasos en estadios embrionarios y en angiogénesis y alteraciones en sus niveles producen diferentes patologías a nivel cardíaco. Recientes han desvelado que en aterosclerosis sus niveles están disminuidos según progresa la enfermedad. Nos planteamos estudiar si el NO que se puede producir ante estos primeros estadios de lesión al vaso, en los que se generan estados proinflamatorios, estarían afectado a proteínas cercanas como ILK, provocando como vemos en aterosclerosis una disminución en su expresión. El tratamiento de la células endoteliales de aortas murina (MAEC) con donadores de NO como DETA-NO produce una reducción significativa de los niveles proteicos de ILK. Esta reducción no es debido a una disminución de la expresión del mRNA. Sin embargo, estudios de estabilidad de la proteína revelan que el NO disminuye la vida media de ILK considerablemente. El NO aumenta la ubiquitinación de ILK aunque su degradación no parece estar mediada por la vía del proteasoma ya que no se revierte por un inhibidor del mismo. La regulación de los niveles de ILK por NO reduce el cierre de una herida endotelial. En resumen, nuestros resultados sugieren que el NO, a través de este mecanismo, podría afectar al avance de la enfermedad cardiovascular, modulando los procesos de adhesión, proliferación y migración celular, imprescindibles para llevar a cabo una correcta reparación ante un daño endotelial.

Palabras clave: óxido nítrico (NO), quinasa ligada a integrinas (Integrin Linked Kinase, ILK), inflamación, daño vascular, óxido nítrico sintasa inducible.

Cita: Paula Reventún, Marta Saura (2014) Papel del óxido nítrico sobre la regulación de ILK durante la remodelación vascular. *Dianas* 3(1):e20140905. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20140905 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: 27 de junio de 2014

Copyright: © 2014 Paula Reventun Torralba et al.

Este es un artículo open-access distribuido bajo licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

*E-mail: reventuntorralba@gmail.com



Introducción

Durante la remodelación vascular se producen cambios morfológicos en la pared de los vasos como consecuencia de estímulos nocivos que inducen la reorganización de las estructuras vasculares, tanto celulares como de matriz extracelular (MEC). Junto con la formación de la placa, el remodelado arterial es el principal responsable del estrechamiento de la luz vascular en la enfermedad aterosclerótica [1]. Los cambios en las fuerzas hemodinámicas que se producen durante estos procesos, son detectados y transmitidos a través de la pared vascular gracias a las integrinas situadas en células endoteliales. Las integrinas actúan como sensores de las fuerzas hemodinámicas que se generan en los vasos sanguíneos y las transforman en señales bioquímicas. Las integrinas forman parte de una plataforma de señalización celular que contacta con el citoesqueleto de actina y, activan diferentes rutas de señalización uniendo proteínas adaptadoras y señalizadoras como la quinasa de adhesión focal (FAK) o la quinasa ligada a integrinas (ILK) [2]. En el sistema cardiovascular ILK juega un papel clave en la integridad de los vasos sanguíneos y en angiogénesis, participa en el reclutamiento y la supervivencia de células progenitoras endoteliales y en la formación de la pared vascular en el desarrollo embrionario [3]. ILK participa también en la patogénesis de enfermedades cardíacas así como en la reparación tisular ante un infarto de miocardio. ILK ha sido implicada en los cambios que se producen en la remodelación del vaso. Así, los niveles de ILK se encuentran alterados en varios modelos de daño arterial que conducen a la formación de neointima incluyendo aterosclerosis, restenosis y en la formación de aneurismas de aorta [3].

Para el correcto funcionamiento del vaso, el endotelio vascular ajusta la producción de NO endotelial producido por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) a los eventos remodeladores que tienen lugar en

respuesta a cambios del flujo [4]. El NO endotelial tiene efecto beneficioso para el sistema vascular y es imprescindible para su correcto funcionamiento; juega un papel protector en la aterogénesis a través de un incremento de la relajación vascular, junto con la inhibición de la agregación plaquetaria, la apoptosis y la adhesión de monocitos al endotelio [5], mientras que grandes cantidades de NO, generados principalmente por óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) puede tener efecto tóxico y proinflamatorio. La disfunción endotelial que conlleva una falta de respuesta o liberación de NO endotelial, se encuentra como factor iniciador de la mayoría de las enfermedades cardiovasculares [3]. El endotelio dañado inicia una reacción inflamatoria liberando grandes cantidades de NO, radicales libres de oxígeno y prostanoïdes que producen cambios inflamatorios en la pared vascular [3].

Recientemente hemos demostrado la relevancia de ILK para la funcionalidad del vaso. ILK participa en la respuesta vasomotora dependiente de endotelio a través de estabilización de eNOS [6]. El complejo que forman eNOS e ILK se rompe durante el proceso ateroesclerótico sugiriendo que ILK puede ser una diana terapéutica en los cambios que inician o aceleran la progresión de la aterosclerosis. Además, se observó que la expresión endotelial de ILK, tanto en arterias ateroescleróticas humanas como murinas, se encuentran disminuida comparado con vasos sanos. Con el fin de intentar explicar la disminución de ILK en endotelio durante el proceso de aterosclerosis, hipotetizamos que concentraciones elevadas de NO como el que se produce como consecuencia de la estimulación de iNOS durante las primeras etapas inflamatorias, estuviesen afectando a los niveles de esta proteína de forma directa.

Material y métodos

Los medios de cultivo (DMEM F12, suero fetal bovino, anfotericina y penicilina-estreptomicina) son de Lonza. Cicloheximida (CHX), Diethylenetriamina NONOato (DETA-NO), Espermina NONOato (Sp-NO) el anticuerpo conjugado con HRP frente a conejo, los anticuerpos frente a Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y ACTINA se obtuvieron de Sigma Chemical (MO, USA). El anticuerpo conjugado frente a ratón fue de DAKO cytomatrixB (CO, USA). El anticuerpo frente a ILK que se usa en los Western Blot (WB) fue de BD bioscience (CA, USA).

Cultivos primarios

Las células endoteliales de aorta de los ratones (MAEC) de ratones wild type se cultivaron a partir de aortas extraídas de animales anestesiados y crecidas sobre matrigel [7]. Las MAEC se seleccionaron por cell sorting frente a anticuerpos para PECAM-1 y ICAM-2. Además la pureza de dicho cultivo se comprobó a través de microscopía confocal de MAEC teñidas con Von Willebrand factor.

Western blot

La extracción de las proteínas para llevar a cabo el proceso de WB se hizo según el siguiente protocolo: - lavado del cultivo con PBS frío, aspirado y posterior raspado con tampón lisis (tris HCL PH 7.5, 20mM, 1% tritonX-100, EGTA1mM, EDTA1mM, NaCl 150mM, Deoxycolato sódico 0.1%, pirofosfato sódico 10mM, Ortovanadato 0.2mM, β -glicerolfosfato 10mM, PMSF 1Mm y una pastilla de complet mini). Las proteínas (15-30 μ g) se separaron mediante geles de SDS-poliacrilamida al 10% y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas se bloquean el tampón leche 5% durante 1h a temperatura ambiente. Tras lavar la membrana con TTBS (tris HCl, NaCl, tween20, agua destilada) se incuban los anticuerpos primarios específicos durante toda la noche a 4°C, al día siguiente las membranas se lavan de nuevo y se incuban con su correspondiente anticuerpo secundario conjugado con HRP durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente las bandas pueden ser visualizadas por quimioluminiscencia de acuerdo a las condiciones del fabricante (Pierce, Rockford, IL, USA). Los controles de carga utilizados fueron; actina y GAPDH. Los resultados fueron analizados mediante el programa de análisis de imagen Image J (NIH, Bethesda, MD, USA).

Inmunoprecipitación

Se extrajeron proteínas y 150 μ g de proteína fueron incubados con 20 μ g de proteína A/G agarosa (Santa Cruz Biotech, CA, USA) y con anticuerpo para ILK (Cell Signaling, Beberly, MA, USA) durante toda la noche a 4°C en un agitador orbital. El pellet con las proteínas precipitadas se obtuvo por centrifugación y tras sucesivos lavados con tampón lisis y PBS se resuspendió en tampón de carga de electroforesis.

RT-qPCR

El RNA se extrajo siguiendo el protocolo del TRIzol, aproximadamente 1 μ g de RNA se utilizó para la reacción de retrotranscripción usando SYBR Premix Ex Taq kit Perfect Real-Time (Takara Bio, Inc., Shiga, Japan) para la qPCR se utilizó ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y SYBR Premix Ex Taq Perfect Real-Time kit y se utilizaron los siguientes primers: ILK sense, 5' GAC GCT CAG CAG ACA TGT GGA 3' y anti-sense, 5' GGA AAT ACC TGG TGG GAC GGT AG 3'; GAPDH sense, 5' AAA TGG TGA AGG TCG GTG TGA AC 3' y anti-sense, 5'

CAA CAA TCT CCA CTT TGC CAC TG 3'. Las muestras fueron sometidas al siguiente ciclo: 95°C durante 4min, luego a 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C en 10 segundos, el anillamiento fue a 56°C 15 segundos y el periodo de extensión 72°C 20seg. La abundancia de mRNA de GAPDH fue usada como referencia interna y para determinar la expresión del gen en este estudio se calculó como $2^{-(\text{GAPDH ct})}$ siendo ct el primer ciclo de la muestra cuya señal excede la señal de referencia.

RT-PCR

En primer lugar se aplicó el protocolo de extracción de RNA mediante TRIzol según las instrucciones del fabricante (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), el proceso de retrotranscripción se realizó usando el kit de RT-PCR (Roche, Switzerland). Los primers utilizados fueron ILK sense 5'-TCG ATG AAG ATA TGA CTG CC-3' e ILK antisense 5'-CAG TGC CAC CTT CAT CCC-3'. Como control se utilizó GAPDH cuyos primers son sense 5'-GTA AAG GGT CGG TGT CAA CGC ATT -3' y antisense 5'-CAC AGT CTT CTG AGT GGC AGT GAT-3'. Finalmente las muestras obtenidas se cargaron en un gel de agarosa al 1% que por quimioluminiscencia nos permitieron observar las bandas correspondientes a la amplificación de mRNA de ILK (239pb) y GAPDH (525pb).

Ensayo de cierre de herida

Para evaluar la capacidad migratoria de las células endoteliales, se cultivaron estas en placas de 6 pocillos y se cuando se hubo formado una monocapa densa (24-48h), se pretrataron con NO como se describe más adelante. Con la ayuda de una punta para micropipeta 20-200 y una regla, se hizo una herida recta, se fijó un cuadrante y se tomaron fotos a distintos tiempos para medir la progresión del cierre de la herida, mediante un programa de análisis de imagen (image J).

Análisis estadístico

Cada condición experimental fue duplicada dentro de cada experimento y cada experimento repetido al menos 3 veces. Las comparaciones fueron hechas con análisis de la varianza de una vía seguido del test de Scheffe para comparaciones múltiples con control común.

Resultados

A continuación se exponen los resultados obtenidos en el desarrollo de este trabajo.

NO disminuye la expresión de ILK en el endotelio

Para determinar el efecto del NO sobre ILK, se procedió a tratar células endoteliales de aorta murinas (MAEC) con distintas concentraciones del donador de NO, DETA-NO (10^{-4} a 10^{-8} M durante 24h) para simular el efecto que puede estar produciéndose en el período inflamatorio en respuesta a un daño vascular. El DETA-NO es un donador que libera NO de forma continua con una vida media de 20h con lo que las concentraciones permanecen elevadas durante toda la duración del experimento. En este modelo en cultivo se obtuvo una disminución de los niveles proteicos basales de ILK en respuesta a NO de forma concentración y tiempo dependientes. Se observó que los niveles de ILK se reducen de forma significativa a 10^{-5} M que será la concentración utilizada en el resto del estudio (Fig 1A). En esta segunda figura observamos que ya a las 4 horas de tratamiento ILK ha disminuido considerablemente y continúa disminuyendo según aumenta el tiempo de exposición (Fig 1B). Por lo tanto podemos afirmar que el NO reduce los niveles basales proteicos de ILK de forma dependiente de la concentración y del tiempo.

El NO no modifica la expresión del mRNA de ILK

Tras el efecto observado del NO sobre ILK, nos dispusimos a buscar el posible mecanismo de acción mediante el cual está actuando. En primer lugar nos planteamos la posibilidad de que NO estuviese regulando de algún modo la expresión del gen que codifica ILK, puesto que ya se había descrito que NO es capaz de disminuir la expresión del mRNA de ILK en células mesangiales (8). Para ello se aisló RNA de MAEC tratadas a diferentes tiempos con DETA-NO 10^{-5} M y la expresión del mRNA de ILK se cuantificó por RT-PCR con oligonucleótidos específicos para ILK observándose que no había cambios significativos en el mRNA de ILK en las MAEC tratadas con DETA-NO (datos no mostrados). Para corroborar estos resultados realizamos el mismo tratamiento y analizamos los niveles de mRNA de ILK mediante PCR cuantitativa en tiempo real, obteniéndose los mismos resultados (Fig 2). De este modo podemos asegurar que el efecto que NO lleva a cabo sobre ILK no es a nivel de modificación en la transcripción génica.

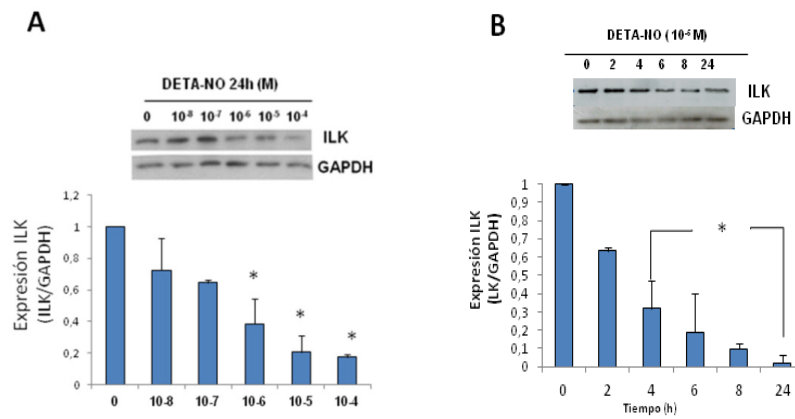


Figura 1.-Efecto de NO a distintas concentraciones y tiempos sobre la expresión de ILK. A) Dosis-respuesta. Las células endoteliales de aorta murina (MAEC) se privaron con medio DMEM F12 al 0.5% de suero y se añadieron distintas concentraciones de DETA-NO (10^{-8} M- 10^{-4} M) durante 24h. Se analizó la expresión de ILK mediante WB. B) Tiempo-respuesta. Las MAEC se privaron con medio DMEM F12 al 0.5% de suero y se trataron a distintos tiempos (0-24h) con una concentración de DETA-NO de 10^{-5} M. La expresión de ILK frente a GAPDH utilizado como control de carga, se analizó mediante WB y la representación gráfica del análisis densitométrico se presenta debajo de cada WB representativo del experimento. n=3 *p<0,05 vs t=0, concentración DETA NO=0.

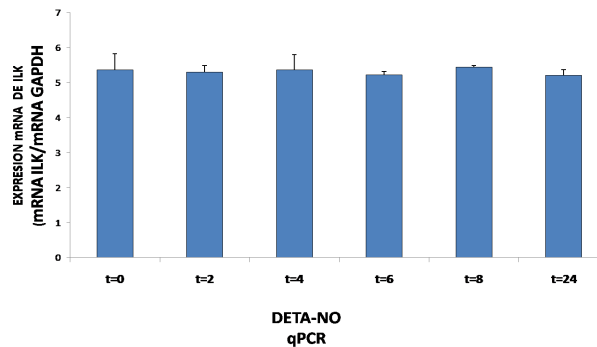


Figura 2. Efecto del NO sobre mRNA de ILK. Gráfica obtenida a partir de los datos de PCR cuantitativa en tiempo real en la que se estimó la expresión génica de ILK tras tratamiento con DETA-NO 10^{-5} M a diferentes tiempos. Estos valores fueron referenciados frente a un mRNA control, en este caso GAPDH. n=3.

NO disminuye la estabilidad de ILK en el endotelio

Nos planteamos observar si por el contrario se estaba viendo afectada la estabilidad de la proteína. Las MAEC fueron pretratadas durante 2h con cicloheximida (CHX), para parar la síntesis proteica (tiempo =0), y, posteriormente se analizaron los niveles de ILK remanentes en las células tratadas con DETA-NO o dimetilsulfóxido (DMSO) solvente del donador, a diferentes tiempos. La figura 3 muestra que la estabilidad de ILK disminuye de forma significativa tras la adición de NO. A las 4 h tras añadir NO, los niveles de ILK se encuentran significativamente disminuidos en comparación con las MAEC tratadas sólo con CHX. A las 8h queda menos de la mitad de los niveles iniciales de proteína en las células tratadas con NO. Comprobamos la vida media de ILK en presencia de NO, obteniendo que la vida media de ILK de células e tratadas con CHX es de aproximadamente 40h, mientras que para las células a las que además del pretratamiento con CHX han recibido NO, su vida media ha descendido hasta 18h.

Al analizar los mecanismos que podrían estar detrás de esta disminución de la estabilidad exploramos primero la ruta del proteasoma. Para explorar esta, se trataron las MAEC con DETA NO y/o con un inhibidor del proteasoma (MG-132, 10^{-5} M). En la Figura 4A se puede observar que NO produce la disminución de ILK tanto con el DETA-NO como con Sp-NO (donador de NO con vida media 2h) mientras que el cotratamiento de MAEC con MG132 y NO, no sólo no revierte los efectos del NO sino que parece acentuarlos. Se exploró la ubiquitinación de ILK mediante inmunoprecipitación de ILK seguido de WB anti-ubiquitina. En la figura 4B se puede observar que NO incrementa la ubiquitinación de ILK. Colectivamente, estos resultados sugieren que el NO disminuye la vida media de ILK e incrementa su ubiquitinación. Sin embargo estimula su degradación por una ruta que resulta potenciada por la inhibición del proteasoma.

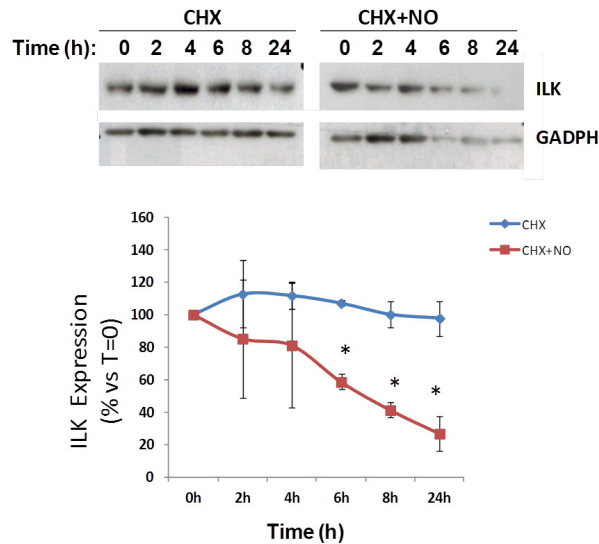


Figura 3: Estabilidad de ILK. Las MAEC fueron deprivadas con DMEM F12 al 0.5% de suero y tratadas con CHX (10^{-5} M) 2h inhibiendo la síntesis proteica. Las células fueron entonces tratadas con DETA-NO (10^{-5} M) o con DMSO a distintos tiempos (0-24h). La expresión de ILK se analizó mediante WB y la representación gráfica del análisis densitométrico se representa debajo de cada WB representativo del experimento. Se usó GAPDH como control de carga. n=3 *p<0,05 vs t=0.

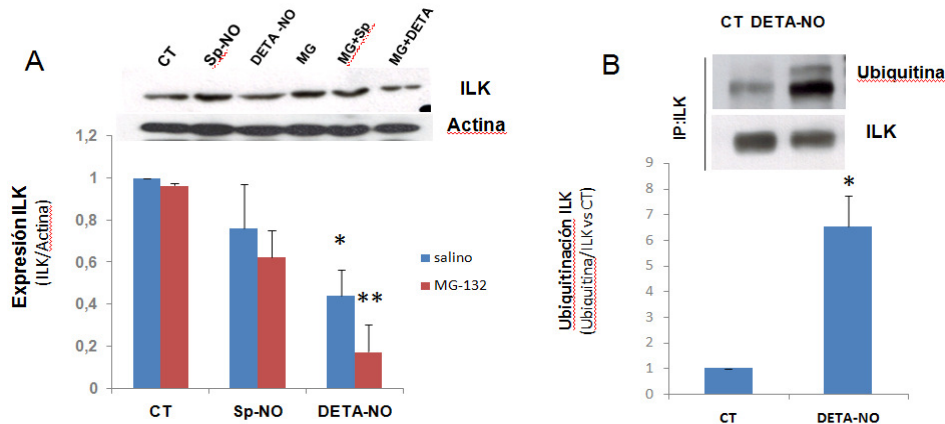


Figura 4: Papel de la ruta ubiquitina/proteasoma en la degradación de ILK estimulada por NO. **A)** Las MAEC fueron deprivadas y tratadas con SP-NO o DETA-NO (10^{-5} M) 24h, a continuación se adicionó un inhibidor de la actividad del proteasoma MG-132 o salino como control. La expresión de ILK frente a actina utilizado como control de carga se analizó mediante WB y el análisis densitométrico aparece debajo n=3 *p<0,05 vs CT; **p<0,05 vs DETA-NO. **B)** Las MAEC se deprivan y tratan con DETA-NO (10^{-5} M) 24h como en A, a continuación se inmunoprecipitó ILK y por WB se determinó la ubiquitinación de ILK. La representación gráfica del análisis densitométrico se representa debajo del WB representativo del experimento. n=3 *p<0,05 vs CT.

El efecto del NO sobre ILK repercute en la funcionalidad del endotelio

Para determinar los efectos biológicos que el tratamiento con elevadas concentraciones de NO de forma sostenida pueden tener sobre la funcionalidad endotelial se llevó a cabo un experimento de reparación de herida. Se realizó una herida endotelial utilizando una punta de pipeta sobre una monocapa de MAEC que habían sido pretratadas durante 24h con DETA-NO 10^{-5} M o con Sp-NO a la misma concentración. Se realizaron fotografías de la herida a tiempo 0 y posteriormente tras 1, 3, 6, 8 y 24 horas, se determinó el área de la herida, observando que las MAEC que no habían recibido tratamiento son capaces de cerrar la herida a las 24h (Figura 5A). De forma similar, las MAEC pretratadas con Sp-NO cierran completamente a las 24h. Sin embargo las MAEC pretratadas con DETA-NO muestran un retraso en la reparación de la herida y la herida no se aprecia totalmente cerrada a las 24h a las 32h a pesar de que las células han cubierto la zona de la herida se puede apreciar huecos entre ellas. Al analizar el contenido celular en ILK al finalizar el experimento se observa que las células que presentan menor capacidad para cerrar la herida son las que presentan menor contenido en ILK (Fig5C).

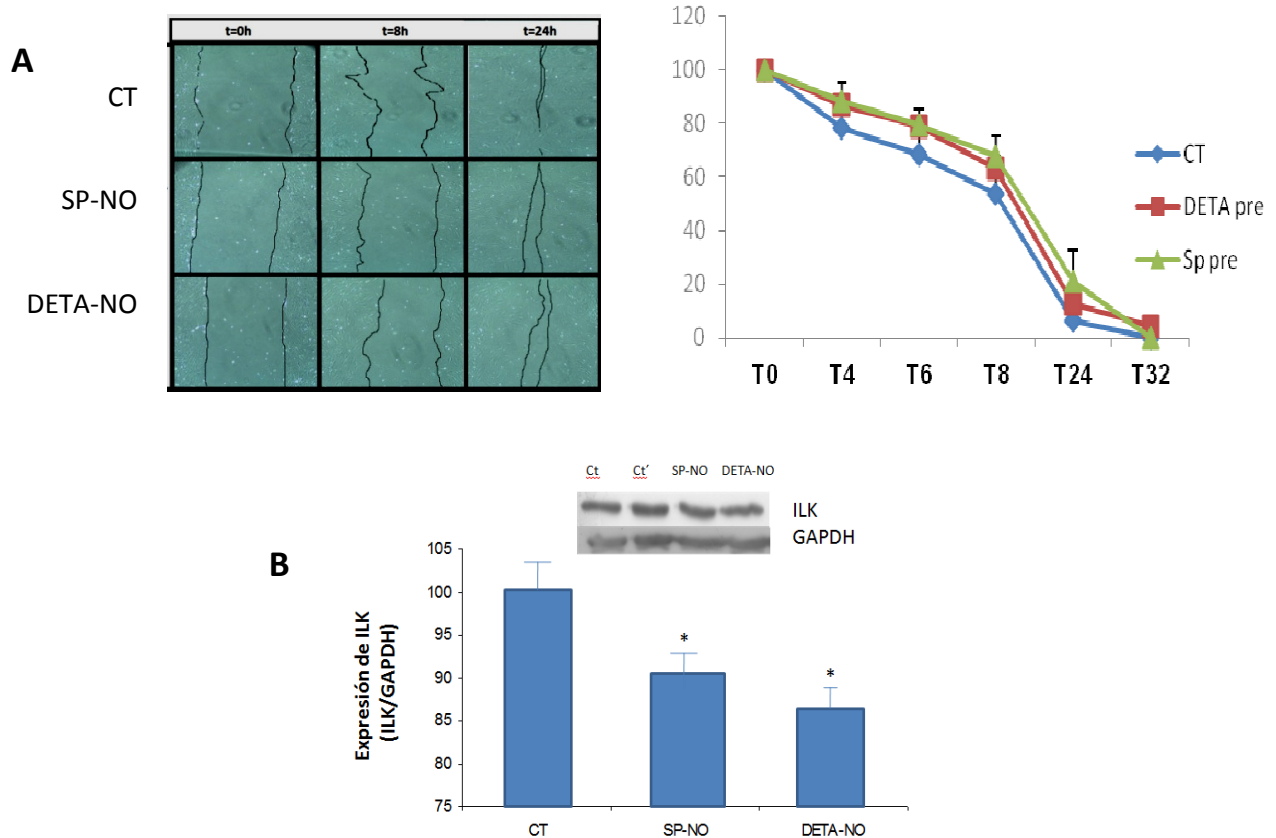


Figura 5. Efecto del NO sobre el cierre de la herida endotelial. **A)** las MAEC confluentes fueron deprivadas y tratadas durante 24h con DETA NO o Sp-No, a continuación se realizó una herida (t=0) tomándose microfotografías a diferentes tiempos. El área de la herida se analizó mediante un programa de imagen y se representa a la derecha de la figura. A la izquierda se muestran las imágenes tomadas a distinto tiempos con microscopio en el lugar donde se realizó la incisión. **B)** Tras la realización del experimento de cierre de herida se extrajeron las proteínas de dichas células y se analizó la expresión de ILK en cada una de ellas obteniendo los resultados que se observan en la representación gráfica. . n=3 *p<0,05 vs CT.

Discusión

Los datos presentados en este trabajo muestran que NO es un importante modulador de la expresión de ILK y por tanto podría estar mediando en los múltiples procesos en los que ILK está implicada, en especial para nuestro interés, en aquellos que afectan al desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis.

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial que se desarrolla progresivamente por la incidencia de numerosos factores de riesgo. Entre ellos, los niveles elevados de colesterol en plasma, en particular de lipoproteínas de baja densidad (LDL) constituyen el mayor factor de riesgo, así como la hipertensión, la diabetes o el tabaquismo. Nuestros datos previos demuestran que ILK se encuentra disminuida según progresa la enfermedad [6]. Hasta el momento se desconoce el mecanismo por el que ILK está disminuida en pacientes con arterosclerosis, pero si existen evidencias que muestran como ILK se regula en células musculares lisas vasculares en respuesta a distintos estímulos proaterogénicos e incluso por estatinas [9]. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que en el endotelio vascular ILK se encuentra disminuida por NO. La incidencia de los factores de riesgo sobre el endotelio condicionan una disfunción de esta capa vascular que progresivamente deja de producir NO lo que conduce a la inducción de citoquinas y enzimas proinflamatorias como iNOS que en este contexto produce altas concentraciones de NO de forma continua. Se ha demostrado que ILK protege frente a la apoptosis de células endoteliales provocada por LDL oxidadas, es posible especular que la apoptosis de estas células que perpetua la disfunción endotelial se debiese a la disminución del contenido de ILK inducido por el NO derivado de iNOS [10].

Estudios recientes hablan de que la activación de la iNOS podría estar mediada por la vía ILK/AKT/Mtor [11] en mioblastos y a través de la activación de ILK de NF- κ B en musculares lisas [8] por tanto conociendo que ambos sistemas están íntimamente relacionados, es de esperar que alteraciones en uno de ellos condicionen al otro. Aunque varios trabajos han apuntado la posibilidad de que el NO regule la expresión génica de ILK [8] nosotros no encontramos ninguna variación por los dos métodos utilizados. Sin embargo nuestros resultados demuestran que el NO disminuye la estabilidad de ILK, aumentando la ubiquitinación de esta proteína. Se ha demostrado que ILK se degrada vía proteasoma [12]. Sin embargo la estimulación de la degradación de esta proteína por NO no parece depender de la acción del

proteasoma, puesto que al utilizar un inhibidor de este todavía se ve más degradada. Se ha demostrado que en ciertas situaciones donde existe una disfuncionalidad el proteasoma o se ha inhibido farmacológicamente, las proteínas ubiquitinadas que no se pueden degradar forman agregados estimulando la vía de la autofagia siendo entonces atacadas por los lisosomas [13]. Este coincidiría de forma clara con los resultados obtenidos en este trabajo puesto que cuando utilizamos el inhibidor del proteasoma vemos aun más acentuada la degradación de ILK, por ello es más que probable que cuando NO actué sobre ILK provoque la ubiquitinación de dicha proteína y que esta se degrade a través de esta vía, aunque se necesitarán más experimentos para explorar esta posibilidad.

Se ha demostrado que el NO es capaz de modificar de forma directa determinados residuos proteicos por reacciones de nitración o nitrosilación alterando su función. Esta capacidad que tiene el NO para realizar reacciones de nitración y nitrosilación también pueden ser las causantes de la desestabilización de la proteína, puesto que ILK presenta varios residuos de tirosina susceptibles de ser nitrados, tanto en su dominio quinasa como en su dominio N-terminal. A través de estos dominios ILK interacciona con distintas proteínas que la estabilizan, como PINCH en el extremo N-terminal y Hsp90 en el dominio quinasa [14]. Esta posibilidad es perfectamente compatible con la posible degradación vía lisosomas y por tanto merecen una exploración en mayor profundidad en futuros experimentos.

Para comprobar cuál era el efecto funcional que la modulación de ILK por NO tiene sobre las células endoteliales se llevó a cabo el estudio del cierre de una herida endotelial. Nuestros datos muestran que el NO retarda el cierre de la herida coincidiendo con la desestabilización de ILK. Se ha descrito que la disminución de ILK conduce a un aumento de la proliferación y migración de las células [15], al contrario de nuestros resultados, pero este experimento fue realizado en células musculares lisas, por lo tanto es difícil comparar dada la importancia del contexto la hora de producir diferentes acciones.

El NO también parece tener una acción dual pero esta vez parece que es concentración dependiente, provocando un aumento de la migración y de la proliferación valores bajos de NO y el efecto contrario altas concentraciones [16]. Estos datos se asemejarían a los obtenidos en este trabajo y además reforzarían la idea de que a nivel fisiológico las altas concentraciones de NO producidas por la iNOS serían las responsables en esta disminución de la función de ILK.

Debemos mencionar que en un artículo [17] se muestra como animales KO para la iNOS presenta una mejora significativa en el proceso de cierre de herida en la piel, una vez más este proceso es difícilmente comparable con los datos obtenidos por nosotros, sin embargo nos hizo pensar en otra posible vía de producción de altas concentraciones de NO que pudiesen generar nuestros resultados por tanto no podemos olvidar que además de la síntesis enzimática, se ha sugerido la posibilidad de una síntesis no enzimática de NO ya que, durante la isquemia experimental, las concentraciones de NO aumentan aún cuando se ha inhibido previamente la NOS [18]. La xantina oxidasa del endotelio vascular también puede reducir los nitritos/nitratos a NO, los nitritos pueden reaccionar con la desoxihemoglobina para constituir una forma nitrosilada, la S-nitrosohemoglobina, generándose en esta reacción NO [19] pudiendo estar este proceso activado por los factores de riesgo.

En resumen, nuestros datos sugieren que el NO es capaz de regular, por un mecanismo que incluye la degradación de ILK, los procesos migración y proliferación que tienen lugar durante la reparación tras un daño vascular.

Bibliografía

1. Alenghat, F.J., and D.E. Ingber. 2002. Mechanotransduction: all signals point to cytoskeleton, matrix and integrins. *Science's STKE*, 119:1-4.
2. Legate K.R., E. Montañez., et al. 2006. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7: 20-31
3. Zaragoza C., S. Márquez., et al. 2012. Endothelial mechanosensors of shear stress as regulators of atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*, 23(5):446-52.
4. Balligand J.L., O. Feron., et al. 2009. eNOS Activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *physiol rev*, 89: 481-534.
5. Freedman J.E., R. Sauter., et al. 1999. Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ Res*, 84 :1416-1421.
6. Herranz B., S. Marquez., et al. 2011. Integrin-Linked Kinase Regulates Vasomotor Function by Preventing Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling: Role in Atherosclerosis. *Circ Res*, 22:441-449.
7. López-Rivera E., T.R. Lizarbe., et al. 2005. Matrix metalloproteinase 13 mediates nitric oxide activation of endothelial cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 3685-90.

8. Beck K.F., S. Walpen.,et al. 2001.Downregulation of integrin linked kinase mRNA expresión by nitric oxide in rat glomerular mesangial cells.Life Sci, 69: 2945-55.
9. Friedrich E.B., Y.P. Clever.,et al. 2006. Role of integrin-linked kinase in vascular smooth muscle cells: regulation by statins and angiotensin II. Biochem Biophys Res Commun, 27:883-9.
10. Guzik T.J., R Korbut.,et al. 2003.Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation.J Physiol Pharmacol, 54: 469-487.
11. Tsou H.K.,C.M. Su.,et al.2010. Integrin-linked kinase is involved in TNF- α -induced inducible nitric-oxide synthase expression in myoblasts. Journal of Cellular Biochemistry, 109: 1244–1253.
12. Radovanac K., J. Morgner., et al. 2013. Stabilization of integrin-linked kinase by the Hsp90-CHIP axis impacts cellular force generation, migration and the fibrotic response. EMBO J, 32: 1409-24.
13. Zaarur N., A.B Meriin.,et al. 2014. Proteasome failure promotes positioning of lysosomes around the aggresome via local block of microtubule-dependent transport. Mol Cell Biol, 34: 1336-48.
14. Aoyagi Y., N. Fujita.,et al. 2005. Stabilization of integrin-linked kinase by binding to Hsp90. Biochem Biophys Res Commun, 331: 1061-8.
15. Ho B., G. Hou.,et al. 2008.Integrin-linked kinase in the vascular smooth muscle cell response to injury.Am J Pathol, 173: 278-88.
16. Jones M.K.,et al. 2004. Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: possible roles of PKC, ERK and AP-1. Biochem Biophys Res Commun, 28: 520-528.
17. Lizarbe T.R, C. García-Rama.,et al. 2008. Nitric oxide elicits functional MMP-13 protein-tyrosine nitration during wound repair. FASEB J, May 21.
18. Wei G., V.L Dawson., et al. 1999. Role of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in nitric oxide generation in the brain following cerebral ischemia. Biochim Biophys Acta, 20: 145523-34.
19. Núñez L., M. Vaquero.,et al. 2006.Nitric oxide blocks hKv1.5 channels by Snitrosylation and by a cyclic GMP-dependent mechanism. Cardiovasc Res, 72: 80-89.