

Estrategias moleculares de protección del daño vascular inducido por la uremia en pacientes con Enfermedad Renal Crónica

Paloma Blanco Béjar¹, Laura Calleros Basilio¹

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

Resumen

La enfermedad renal crónica (ERC) puede afectar en sus diferentes estadios a cerca del 14% de la población y supone una elevada morbilidad y mortalidad. Los pacientes con enfermedad renal crónica sufren una acumulación de toxinas urémicas en sangre que interaccionan negativamente con las funciones biológicas desencadenando inflamación y mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Un fenómeno común a la disfunción renal progresiva y al daño vascular asociado a la aterosclerosis es la acumulación de proteínas de matriz en las estructuras renales o vasculares. Las proteínas de matriz extracelular condicionan cambios fenotípicos celulares a través de la interacción con determinadas proteínas de membrana como las integrinas produciendo la activación de la quinasa de adhesión focal (FAK) y la quinasa ligada a integrinas (ILK). La ILK interacciona con la subunidad β de las integrinas formando un complejo con otras proteínas implicadas en el mantenimiento de la necesaria rigidez celular, que tiene como sustrato de fosforilación a las proteínas GSK3 β y AKT, y que es indispensable en la regulación de la supervivencia, la proliferación y la migración celular. Se ha demostrado recientemente que ILK también puede estar activada por factores solubles como peróxido de hidrógeno. Por todo ello el objetivo de este estudio es analizar las consecuencias funcionales de las principales toxinas urémicas responsables del daño endotelial y vascular, Indoxil sulfato y p-cresol sobre las células humanas del músculo liso vascular de aorta (HAOSMC) y su relación con el contenido y/o la actividad de la quinasa ligada a integrinas (ILK). Nuestros resultados indican que al tratar con las toxinas urémicas a las células se produce un aumento de la actividad de ILK, sin modificaciones en su expresión, un aumento en la producción de la citoquina TGF- β 1, y consecuencias en la función celular determinada por un aumento de producción de ROS y un aumento de apoptosis.

Palabras clave: enfermedad renal crónica (ERC); toxinas urémicas; ILK; GSK3 β ; TGF- β 1, especies reactivas del oxígeno (ROS).

Cita: Paloma Blanco Béjar, Otros Autores, Laura Calleros Basilio (2015) Estrategias moleculares de protección del daño vascular inducido por la uremia en pacientes con Enfermedad Renal Crónica . *Dianas* 4(1): e20150903. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20150903. 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: 24 de junio de 2015

Copyright: © 2015 Paloma Blanco Béjar 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: laura.calleros@uah.es



Introducción

La enfermedad renal crónica (ERC) es un importante problema de salud pública que puede afectar en sus diferentes estadios a cerca del 14% de la población española y que supone una elevada morbilidad y mortalidad, así como un importante consumo de recursos al Sistema Nacional de Salud [1]. Los pacientes con enfermedad renal crónica sufren una acumulación de toxinas urémicas en sangre que en situaciones normales serían eliminadas por el riñón. Estas toxinas interaccionan negativamente con las funciones biológicas desencadenando distintos acontecimientos como inflamación y mayor riesgo de enfermedad cardiovascular [2].

Debido a que las toxinas urémicas no son eliminadas totalmente de la sangre mediante los métodos convencionales de hemodiálisis el riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular en pacientes en hemodiálisis es mucho mayor que el de la población general, incluso mayor que en grupos de pacientes que tienen un riesgo cardiovascular elevado [3]. Las toxinas urémicas se dividen en 3 grupos atendiendo a su peso molecular y habilidad para unir proteínas: compuestos de alto peso molecular, compuestos de bajo peso molecular (compuestos solubles en agua) y compuestos unidos a proteínas [4]. Las toxinas urémicas unidas a proteínas no son eliminadas totalmente por las técnicas convencionales de diálisis debido a que su tamaño es mayor que el poro de las membranas de diálisis y debido a que tienen una gran

afinidad de unión a la albúmina [2]. Las toxinas representativas del grupo de unión a proteínas son Indoxil sulfato y p-cresol [4]. Diversos estudios han demostrado que la acumulación en sangre de las toxinas urémicas unidas a proteínas induce aterosclerosis, rigidez arterial, calcificación vascular y anomalías en la reparación vascular e hiperplasia de la neointima debido a la proliferación de las células del músculo liso, lo que lleva a una reducción severa del lumen vascular. Todo esto puede explicar el pronóstico relativamente pobre de los pacientes con enfermedad renal crónica en hemodiálisis [5].

Un fenómeno común a la disfunción renal progresiva y al daño vascular asociado a la aterosclerosis es la acumulación de proteínas de matriz, en mayores cantidades y de forma anormal en las estructuras renales o vasculares. Esto producirá hiperplasia de la neointima, y pérdida de la reparación vascular, como consecuencia del aumento de la proliferación y la migración de las células de músculo liso vascular y de la excesiva síntesis de matriz extracelular. Las proteínas de matriz extracelular condicionan cambios fenotípicos celulares a través de la interacción con determinadas proteínas de membrana como las integrinas [6]. La unión de estas integrinas a secuencias peptídicas de las proteínas de matriz extracelular induce la activación de proteínas citoplasmáticas como la quinasa de adhesión focal (FAK) y la quinasa ligada a integrinas (ILK), responsables de muchos de los cambios fenotípicos celulares inducidos por la matriz extracelular [7]. La ILK interacciona con la subunidad β de las integrinas, que forma un complejo con otras proteínas implicadas en el mantenimiento de la necesaria rigidez celular, que tiene como sustrato de fosforilación a proteínas como GSK3 β y AKT, y que es indispensable en la regulación de la supervivencia, la proliferación y la migración celular [8]. Por otro lado, nuestro grupo ha publicado recientemente estudios *in vitro* en células mesangiales humanas en los que se ha demostrado que ILK puede estar activada por factores solubles como peróxido de hidrógeno, produciéndose la activación de una cascada de señalización que tuvo como consecuencias un aumento de la expresión de la citoquina pro-inflamatoria y pro-fibrótica TGF- β 1, y de la producción de matriz extracelular [9].

Por todo ello, el objetivo de este estudio es analizar las consecuencias funcionales de las toxinas Indoxil sulfato y p-cresol sobre las células humanas del músculo liso vascular de aorta (HAOSMC) y su relación con el contenido y/o la actividad de la quinasa ligada a integrinas (ILK).

Materiales y métodos

Los solutos urémicos p-cresol e Indoxil sulfato fueron obtenidos de Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA). DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) fue adquirido de Lonza (Basel, Switserland). Tripsina, L-glutamina y anfotericina B fueron obtenidos de Lonza (Basel, Switserland), calf serum y penicilina estreptomycin fueron obtenidos de Gibco. HuS (human serum) fue obtenido de Human autologous serum (AB serum; BioWhittaker, Walkersville, MD, USA), que fue utilizado como control (suero normal). Anticuerpos primarios contra ILK (quinasa ligada a integrinas), p-GSK-3 β (glucógeno sintasa quinasa 3 β), TGF- β , actina y GAPDH fueron adquiridos de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Anticuerpos secundarios contra conejo y ratón fueron adquiridos de Dako (Barcelona, Spain). Todas las diluciones de anticuerpos fueron 1:1000 o 1:5000. El agente quimioluminiscente fue adquirido de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). La sonda fluorogénica dihidrocloro fluoresceína (H₂DCFDA) fue adquirida de Molecular Probes (Life Technologies, Paisley, UK).

Toxinas urémicas

Las toxinas urémicas fueron probadas en las concentraciones del rango urémico. P-cresol fue diluida en medio DMEM al 0% de una solución stock preparada en metanol e Indoxil sulfato fue diluida en medio DMEM al 0% de una solución stock preparada en medio DMEM al 0%. Indoxil sulfato fue utilizada a concentraciones 25 mM y 100 mM y p-cresol a 10 mM y 100 mM. También fueron utilizadas de manera simultánea en las concentraciones bajas y en las altas (IS + pc).

Cultivo celular y tratamientos

Las células humanas de músculo liso vascular (HAOSMC) fueron mantenidas en medio de cultivo DMEM suplementado con calf serum al 10%, L-glutamina, anfotericina B, y penicilina + estreptomycin. Fueron utilizados cultivos celulares con pases de 12-25. Para los experimentos, las células HAOSMC confluentes fueron cultivadas con suero humano al 2.5% durante 24 horas e incubadas con los diferentes tratamientos a concentraciones y tiempos variables (mirar las leyendas de las figuras).

Western blot

Después de los tratamientos las células fueron lavadas con PBS y lisadas en una solución (pH 7.6) que contiene 10 mM de Trizma base, 1% Triton X-100, Desoxicolato sódico al 0.1%, 1mM de EDTA, 500 ml de agua destilada c.s.p. e inhibidores de proteasas 100 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1 mg ml⁻¹ de aprotinina, 1 mg ml⁻¹ de leupeptina y 1 mM de pepstanina e inhibidores de fosfatasa 10 mM de Molibdato sódico, 50 mM de Fluoruro sódico, 1 mM de Ortovanadato sódico y 10 mM de β - glicerol

fosfato. Las proteínas celulares fueron corridas en geles SDS-poliacrilamida al 10-12% y transferidas a una membrana de PVDF (Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad, CA, USA) que fue bloqueada con BSA al 5% en TBS-T (50 mM Trizma, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20). Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4 °C con los correspondientes anticuerpos primarios primarios como se ha descrito previamente [10]. Esta incubación fue seguida de una incubación de 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa. Los productos inmunoreactivos fueron detectados por quimioluminiscencia utilizando los reactivos de detección de quimioluminiscencia para Western blot (Amersham Biosciences, Amersham, UK) siguiendo el protocolo del fabricante. Los análisis de densitometría de los resultados de los Western blot fueron hechos utilizando el software Image J.

Cuantificación del contenido de DNA sub-G1 por citometría de flujo

La cuantificación de las células apoptóticas fue llevada a cabo mediante la medida del porcentaje de células con contenido de DNA sub-G1 por citometría de flujo en las células marcadas mediante tinción con yoduro de propidio (IP) [11]. Las células adheridas y las levantadas fueron recogidas después del tratamiento, lavadas con PBS frío y fijadas con etanol frío al 70% (30 min, 4°C). Las células fueron lavadas dos veces con PBS y tratadas con RNAsa (1 mg ml⁻¹; 30 min, 37°C). Después de teñir el DNA celular con 5 ng ml⁻¹ de IP disuelto en PBS, las células fueron analizadas en el citómetro de flujo FACSCalibur. Los porcentajes de células en las diferentes fases del ciclo celular fueron calculadas por histogramas de DNA. Las células con contenido en DNA sub-G1 fueron consideradas apoptóticas.

Transfección con siRNA

Para eliminar la expresión de la proteína ILK con un siRNA específico las células fueron sembradas 24 horas antes de la transfección. Las células fueron transfectadas en 1 ml de optiMEM con 100 nM de siRNA o un control negativo (RNA scrambled) utilizando lipofectAMINA. Después de la incubación de 24 horas con el complejo de RNA, fue añadido 1 ml de medio conteniendo calf serum y 48 horas después las células fueron tratadas como se indica.

Detección de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Después de los tratamientos las células fueron levantadas mediante tripsinización y fueron cargadas con la sonda fluorogénica dihidrocloro fluoresceína H₂DCFDA (5 mM) [10]. La intensidad fluorescente celular fue medida en el citómetro de flujo FACSCalibur con un láser argón 488 nm. Para cada análisis 8000 eventos fueron guardados y la viabilidad celular fue controlada con tinción con IP. La producción de ROS fue estimada utilizando una media de la intensidad fluorescente de la población celular. Los datos fueron analizados con el software WinMDI (Scripps Research Institute).

Detección de TGF-β1 mediante inmunofluorescencia

Después del tratamiento las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS, permeabilizadas con Triton X-100 al 0.5% en PBS, bloqueadas durante 1 hora en BSA al 5% en PBS y posteriormente incubadas 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-TGF-β1 (1:100). Finalmente fueron incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con fluorescencia (1:1000) y montadas con DAPI. La detección del color fue llevada a cabo con el microscopio confocal Leica. Las imágenes fueron obtenidas y la intensidad fluorescente fue medida por densitometría utilizando el software Image J.

Análisis de los datos y procedimientos estadísticos

Todos los valores son presentados como media ± error estándar de la media (SEM). Los experimentos fueron repetidos un mínimo de 3 veces. Las comparaciones entre los grupos fueron llevadas a cabo utilizando estadísticas no paramétricas. Un valor de P < 0.05 fue considerado significativo.

Resultados

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

Las toxinas urémicas no modifican la expresión de ILK

Para determinar el nivel de expresión de ILK en las células HAOSMC se utilizó la técnica de Western blot. Para simular la presencia de las toxinas urémicas en sangre de los pacientes con enfermedad renal crónica se trató a las células con las dosis bajas y altas de Indoxil sulfato y p-cresol, así como con las dosis bajas o altas de manera simultánea durante 2, 4, 6 y 24 horas. En ninguna de las dosis o tiempos analizados se producen cambios significativos en el contenido celular de ILK. En la figura 1 se puede observar que no se modifica la expresión de ILK respecto del control con del tratamiento entre 2 a 24 horas, con ambas toxinas combinadas a las dosis altas.

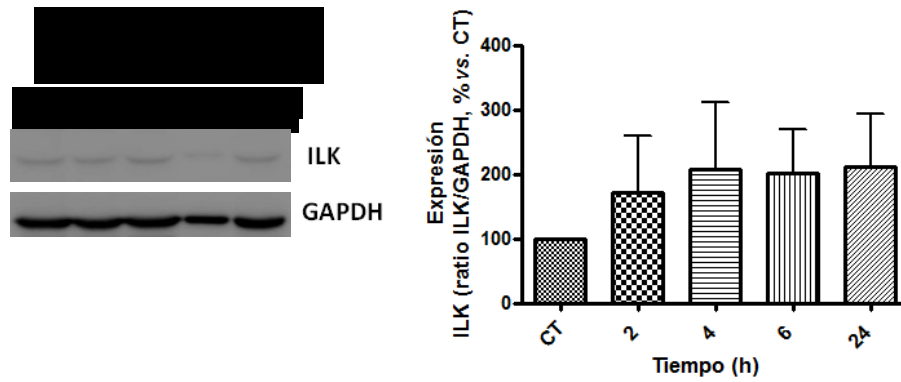


Figura 1.- Las toxinas urémicas no modifican la expresión de ILK. Las células fueron cultivadas con suero humano al 2.5% y posteriormente tratadas con las dosis altas (100mM) de Indoxil sulfato más p-cresol durante 2, 4, 6 y 24 horas. La expresión de ILK frente a GAPDH utilizado como control de carga se analizó mediante WB. La representación gráfica del análisis densitométrico se presenta a la derecha del WB representativo del experimento. n=3 *p<0,05% vs control (CT).

Las toxinas urémicas aumentan la actividad de ILK

A continuación analizamos la actividad de ILK medida a través de la fosforilación de GSK3β. Inicialmente se trató a las células HAOSMC con las dosis bajas y altas de Indoxil sulfato y p-cresol y una mezcla de las dosis bajas y una mezcla de las dosis altas durante 24 horas. Como se observa en la figura 2A se produce un incremento significativo de la fosforilación de GSK3β con las toxinas a dosis altas y la mezcla de las toxinas a dosis altas, a las 24 horas. Debido a la obtención de estos resultados se trató a las células HAOSMC con una mezcla de las dosis altas de las toxinas urémicas durante 2, 4, 6 y 24 horas. En la figura 2B se puede observar un aumento significativo de la fosforilación de GSK3β a las 6 y 24 horas. Con estos resultados se demuestra un aumento de la actividad de la proteína ILK que podemos observar en la fosforilación de GSK3β a partir de las 6 horas de tratamiento de las células con las toxinas a concentraciones altas.

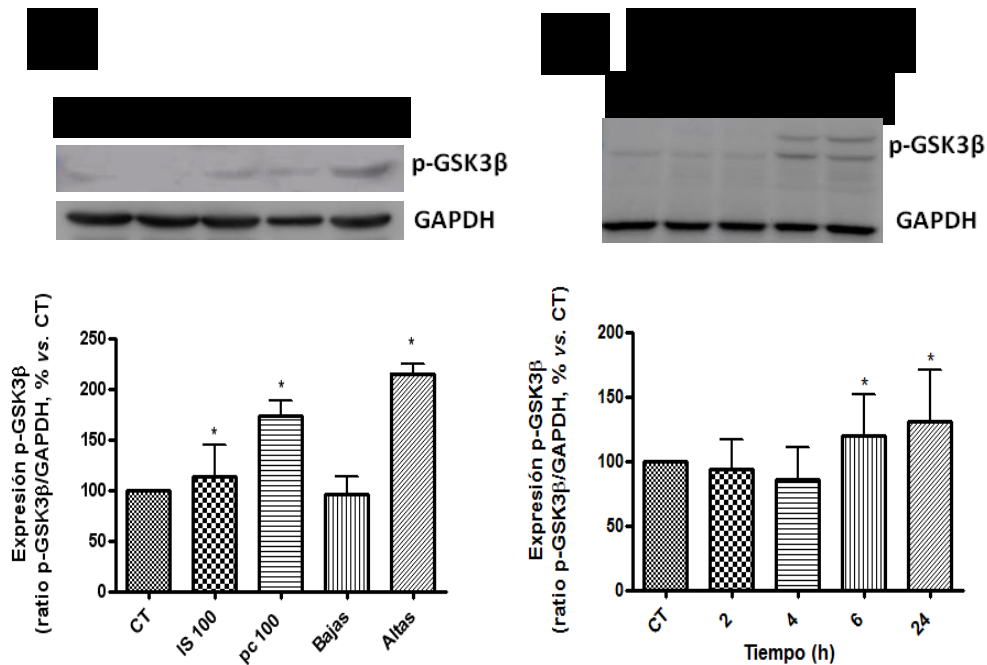


Figura 2.- Las toxinas urémicas aumentan la actividad de ILK a las 6 y 24 horas. A) Dosis-respuesta. Las células HAOSMC se incubadas con medio suplementado con suero humano al 2.5% y posteriormente fueron tratadas con las dosis altas de Indoxil sulfato y p-cresol (100 mM), la mezcla de las dosis bajas (25 y 10 mM) y la mezcla de las dosis altas (100 mM), durante 24 horas. La fosforilación de GSK3β fue analizada por WB utilizando GAPDH como control de carga. B) Tiempo-respuesta. Las células HAOSMC fueron incubadas con medio suplementado con suero humano al 2.5% y posteriormente fueron tratadas con la mezcla de las dosis altas (100 mM) durante 2, 4, 6 y 24 horas. La fosforilación de GSK3β fue analizada por WB utilizando GAPDH como control de carga.

La representación gráfica del análisis densitométrico se presenta debajo de cada WB representativo del experimento. n=3 *p<0,05 vs t=0.

El tratamiento con las toxinas urémicas causa un aumento en la producción de TGF-β1

Estudiamos la producción de TGF-β1 al tratar las células HAOSMC con la mezcla de las dosis bajas y la mezcla de las dosis altas de Indoxil sulfato y p-cresol durante 2, 4, 6 y 24 horas. Como se observa en la figura 3A no hay cambios significativos en la producción de TGF-β1 en ninguno de los tiempos respecto al tiempo 0 cuando tratamos a las células con la mezcla de las dosis bajas de Indoxil sulfato y p-cresol. Por otro lado, en la figura 3B sí se observa un aumento significativo en la producción de TGF-β1 a las 6 y 24 horas cuando tratamos a las células con una mezcla de las dosis altas de Indoxil sulfato y p-cresol. La producción de TGF-β1 también se analizó mediante inmunofluorescencia con el microscopio confocal. En la figura 3C se observa que la producción de TGF-β1 es significativa respecto del control con todas las dosis analizadas de Indoxil sulfato y p-cresol.

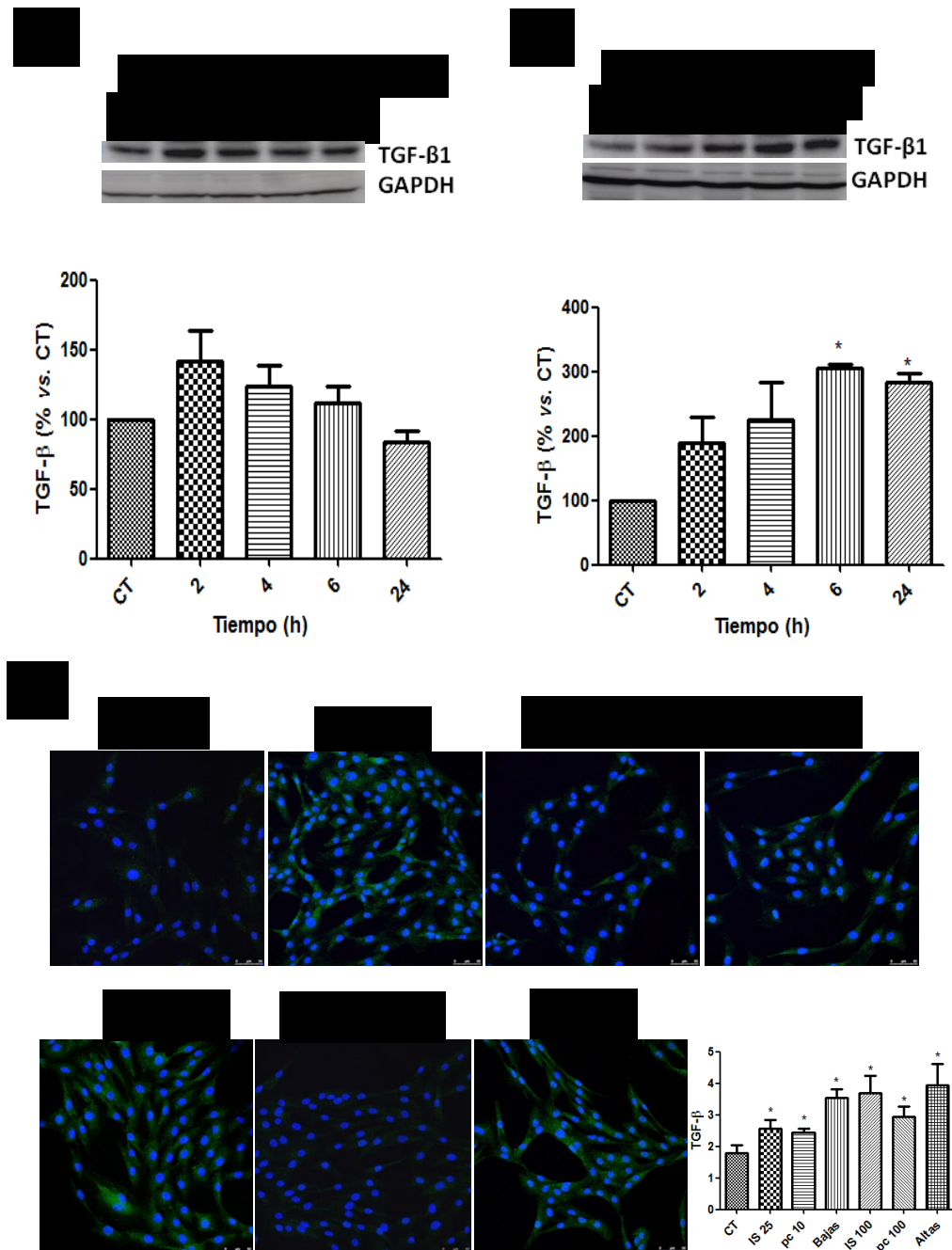


Figura 3.- Las toxinas urémicas aumentan la producción de TGF-β1. A) Las células HAOSMC fueron incubadas con medio suplementado con suero humano al 2.5%. Posteriormente fueron tratadas con la mezcla de dosis altas de Indoxil sulfato y p-cresol (100 mM). Se analizó la producción de TGF-β1 mediante WB utilizando como control de carga GAPDH. B) Las células HAOSMC fueron incubadas con medio suplementado con suero humano al 2.5%. Posteriormente fueron tratadas con la mezcla de dosis bajas de Indoxil sulfato y p-cresol (25 y 10 mM). Se analizó la producción de TGF-β1 por WB utilizando como control de carga GAPDH. La representación gráfica del análisis

densitométrico se presenta debajo de cada WB representativo del experimento. n=3 *p<0,05 vs t=0. C) Las células HAOSMC fueron incubadas con medio suplementado con suero humano al 2.5%. Posteriormente fueron tratadas con las dosis bajas (25 y 10 mM) y altas (100 mM) de Indoxil sulfato y p-cresol, y la mezcla de las dosis bajas (25 y 10 mM) y altas (100 mM), durante 24 horas. La expresión de TGF-β1 se analizó mediante inmunofluorescencia. La representación gráfica de la cuantificación de las imágenes se presenta a la derecha de las fotografías obtenidas con el microscopio confocal. n=3 *p<0,05 vs CT (control).

Las toxinas urémicas aumentan la producción de ROS

Estudiamos como consecuencia funcional la producción de ROS ya que puede estar relacionada con el aumento de la actividad de ILK como ya se ha demostrado en estudios previos. Debido a esto analizamos la producción de ROS por citometría de flujo. Las células HAOSMC fueron tratadas con las dosis bajas y altas de cada toxina por separado, y con la mezcla de las dosis bajas y altas, durante 24 horas. En las figuras 4A y 4C se observa un aumento significativo de la producción de ROS con el tratamiento de Indoxil sulfato a dosis bajas y la mezcla de las dosis bajas. En las figuras 4B y 4C se observa también un aumento significativo de la producción de ROS con el tratamiento de Indoxil sulfato a dosis altas y la mezcla de dosis altas.

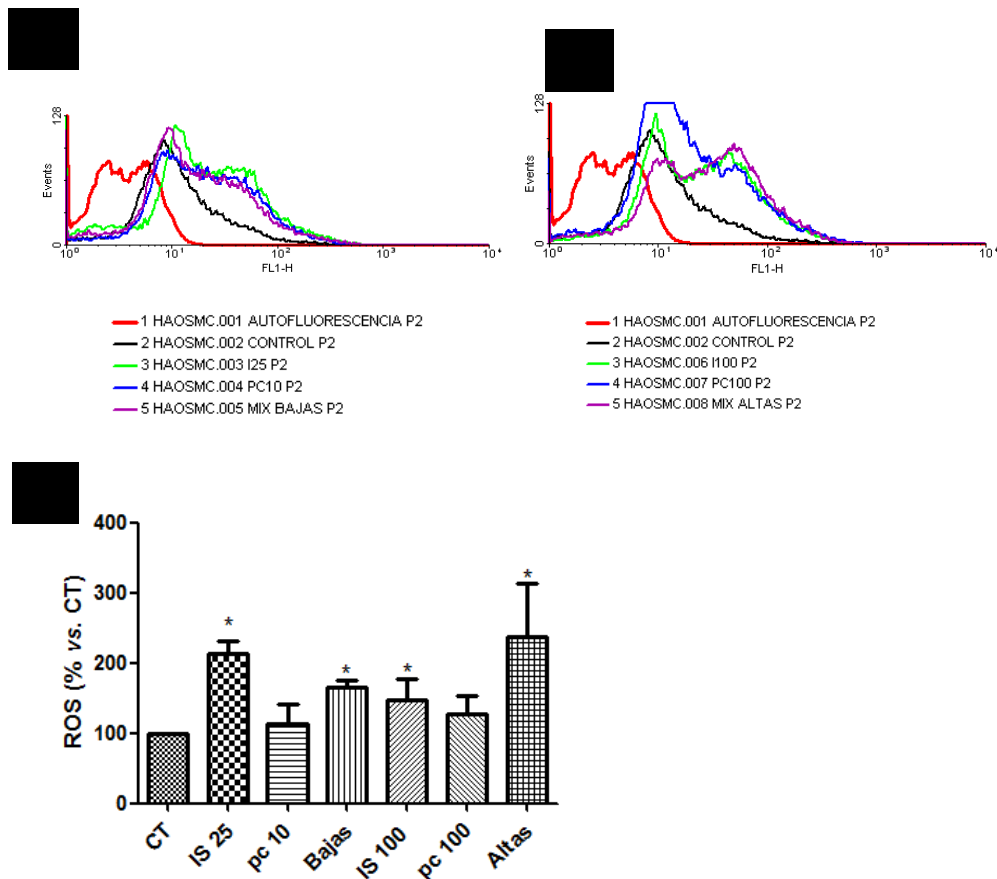


Figura 4.- Las toxinas urémicas aumentan la producción de las especies reactivas del oxígeno (ROS). A) Las células HAOSMC fueron incubadas con medio suplementado con suero humano al 2.5%. Posteriormente fueron tratadas con las dosis bajas de Indoxil sulfato y p-cresol (25 y 10 mM) y con la mezcla de las dosis bajas (25 y 10 mM) durante 24 horas. Se analizó la producción de ROS mediante citometría de flujo. B) Las células HAOSMC fueron incubadas con medio suplementado con suero humano al 2.5%. Posteriormente fueron tratadas Indoxil sulfato y p-cresol a dosis altas (100 mM) y con la mezcla de las dosis altas (100 mM) durante 24 horas. Se analizó la producción de ROS mediante citometría de flujo con citómetro FACSCalibur. C) Se muestra la representación gráfica del porcentaje de ROS respecto del control del experimento. n=3 *p<0,05 vs CT (control).

El tratamiento con las toxinas urémicas produce un aumento de apoptosis

También se analizó como consecuencia funcional la apoptosis mediante citometría de flujo. Las células HAOSMC fueron tratadas con Indoxil sulfato y p-cresol a dosis altas, dosis bajas, y con la mezcla de las dosis bajas y la mezcla de las dosis altas, durante 24 horas. En la figura 5 se observa un incremento significativo de apoptosis en las células HAOSMC con el tratamiento de las toxinas urémicas, a todas las dosis analizadas.

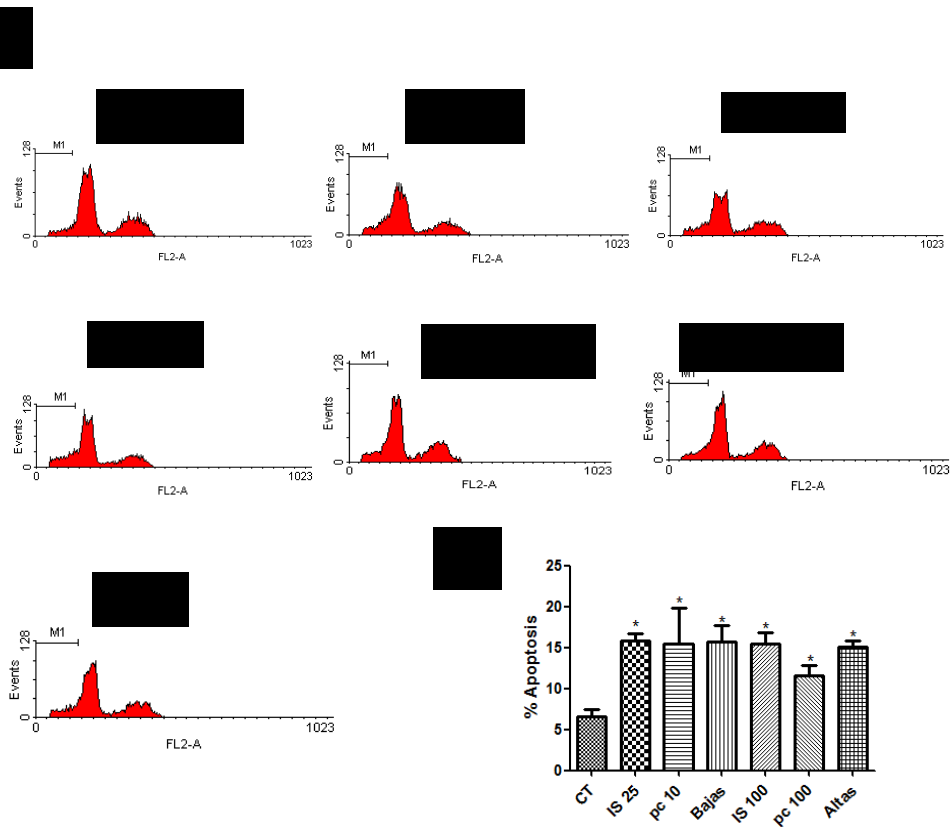


Figura 5.- Las toxinas urémicas aumentan la apoptosis. A) Las células HAOSMC fueron incubadas con medio suplementado con suero humano al 2.5%. Posteriormente fueron tratadas con las dosis bajas de Indoxil sulfato y p-cresol (25 y 10 mM), las dosis altas (100 mM), la mezcla de las dosis bajas (25 y 10 mM) y la mezcla de las dosis altas (100 mM). Se analizó la apoptosis mediante citometría de flujo con citómetro FACSCalibur. B) Se muestra la representación gráfica del porcentaje de apoptosis del experimento. n=3 *p<0,05.

Discusión

Los resultados de este trabajo muestran que cuando tratamos a las células HAOSMC con las toxinas urémicas hay un aumento en la producción de ROS, un aumento de la actividad de ILK, un aumento de la producción de TGF- β 1, y un aumento de apoptosis. El aumento de la actividad de ILK ha sido estudiado mediante la fosforilación de GSK3 β , aunque también podía haber sido estudiado mediante la fosforilación de AKT en la serina 473. Nuestro interés en mirar si aumentaba la producción de ROS y de apoptosis en estas células cuando son tratadas con Indoxil sulfato y p-cresol es debido a que ya se han descrito por nuestro grupo estos aumentos en las células endoteliales [12]. El siguiente paso en la investigación sería confirmar que la activación de ILK está directamente implicada en la producción de TGF- β 1 y ROS. Para ello hemos deleciónado ILK con el siRNA específico, y posteriormente analizamos cada uno de estos mecanismos (datos preliminares no mostrados). En caso de que siguieran aumentando, su aumento no sería dependiente de ILK, mientras que si ya no aumentaran el aumento inicial sería dependiente de ILK. Esto ya se ha realizado en células mesangiales humanas, consiguiendo describir la ruta completa de señalización, en la que están implicadas la proteína MAPK ERK 44/42 y el factor de transcripción AP-1 [9].

Por otro lado, el aumento de ROS puede estar relacionado con ILK a través de PI3K [9]. En nuestro sistema celular, ILK también podría estar implicada en la producción de TGF- β 1 a través de la fosforilación de AKT y que ésta fosforilara a una MAPK que fuera al núcleo y actuara sobre el factor de transcripción AP-1 induciendo la expresión de TGF- β 1 [9]. TGF- β 1 es una citoquina implicada tanto en fibrosis como en inflamación [13-14]; en particular durante la fibrosis renal característica de la progresión de la ERC [15]. Por último el aumento de ROS podría ser el responsable del aumento de apoptosis, cómo se ha descrito anteriormente [16]. Para comprobarlo se podrían utilizar antioxidantes como N-acetilcisteína y así estudiar si sigue aumentando la apoptosis. En este contexto, también la activación de la proteína ILK puede estar jugando un papel protector frente al daño vascular producido por las toxinas urémicas, como ha sido descrito previamente [12].

De este modo se puede concluir que al tratar con las toxinas urémicas a las células HAOSMC con las dosis altas, que se corresponden con los niveles séricos en los estados más avanzados de la ERC, se produce un aumento de la actividad de ILK a partir de las 6 horas. Las dosis altas de toxinas urémicas aumentan la producción de TGF- β 1. Las toxinas urémicas aumentan la producción de ROS en todas las dosis analizadas. Y por último las toxinas urémicas aumentan la apoptosis en todas las dosis analizadas. Se requiere más investigación futura para determinar la ruta de señalización y así poder encontrar una posible diana terapéutica para evitar que progrese la ERC y/o sus consecuencias a nivel cardiovascular.

Referencias

1. Martínez-Castelao. A. et al. 2014. Documento de consenso para la detección y manejo de la enfermedad renal crónica. *Revista de Nefrología*, 34:243-262.
2. Liabeuf. S, Drüeke. Tilman. B., and Massy. Ziad. A. 2011. Protein-Bound Uremic Toxins: New Insight from Clinical Studies. *Toxins*, 3(7):911-919.
3. S.Collado et al. 2010. Prevalence of cardiovascular disease in uraemia and relevance of cardiovascular risk factors. *Revista Nefrología. Official Publication of the Spanish Nephrology Society*. 30(3):342-348.
4. Ito. S., and Yoshida. M. 2014. Protein-bound uremic toxins: New culprits of cardiovascular events in Chronic Kidney Disease Patients. *Toxins*, 6(2):665-678.
5. Brunet. P et al. 2011. Does Uremia Cause Vascular Dysfunction? *Kidney Blood Press Res*, 34(4):284-290.
6. Giancotti. F.G, Ruoslahti. E. 1999. Integrin signaling. *Science*, 285(5430):1028 -1033.
7. Xia. H. et al. 2004. Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via beta1 integrin viability signaling pathway. *J Biol Chem*, 279(31):33024-33034.
8. Wu. C., Dedhar. S. 2001. Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *J Cell Biol*, 155(4):505-510.
9. Gonzalez-Ramos. M. et al. 2013. Integrin-linked kinase mediates the hydrogen peroxide-dependent transforming growth factor- β 1 up-regulation. *Elsevier*, 61:416-427.
10. González-Ramos M. et al. 2012. Intracellular redox equilibrium is essential for the constitutive expression of AP-1 dependent genes in resting cells: studies on TGF- β 1 regulation. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(6):963-971.
11. Del Nogal. M. et al. 2012. Balance between apoptosis or survival induced by changes in extracellular-matrix composition in human mesangial cells: a key role for ILK-NF κ B pathway. *Apoptosis*, 17(12):1261-1274.
12. García-Jérez. A. et al. 2015. Effect of uraemia on endothelial cell damage is mediated by the integrin linked kinase pathway. *J Physiol*, 593(3):601-618.
13. Leask. A., Abraham. DJ. 2004. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal*, 18(7):816-827.
14. Couser. W. G. 1994. New insights into mechanisms of immune glomerular injury. *Western Journal of Medicine*, 160(5):440-446.
15. López-Hernández. F. J., López-Novoa. J. M. 2012. Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell and Tissue Research*. 347(1):141-154.
16. Sowers. K. M., and Hayden. M. R. 2010. Calcific uremic arteriolopathy. *Pathophysiology, reactive oxygen species and therapeutic approaches. Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 3(2):109-121.