

# Función de ILK endotelial en la formación de neoíntima asociada a enfermedades cardiovasculares

Sergio del Olmo Cabrera, Marta Saura

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

En enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis, uno de los principales síntomas patológicos es una remodelación vascular desregulada y la formación de neoíntima en la pared endotelial de los vasos sanguíneos, produciendo de esta manera una disminución de la luz del vaso que puede acarrear problemas mayores. Sabemos que la quinasa ligada a integrinas (ILK) tiene un rol importante en la regulación de este remodelado y formación de neoíntima, así como un papel fundamental en la angiogénesis durante los estados embrionarios, pero su ausencia provoca un incremento de dicha remodelación. Es conocido que durante la aterosclerosis los niveles de ILK van disminuyendo a medida que provoca su enfermedad, aunque la manera por la que ocurre sea desconocida, si sabemos que la ausencia de ILK provoca cambios en la producción de óxido nítrico (NO) y superóxido, que están implicados en la remodelación vascular. Nos planteamos cómo una delección inducida en la capa endotelial de los vasos sanguíneos podría afectar a al remodelado vascular, dependiente de los niveles de NO y superóxido. La delección de ILK en el tejido endotelial de ratones provoca un aumento de liberación de superóxido y un descenso en los niveles de NO, aunque sin afectar a la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) encargada de producirla. Este aumento de superóxido y NO provoca la formación de neoíntima en las aortas de ratones a los que hemos inducido una reducción del flujo sanguíneo mediante una ligadura en el propio vaso. La delección de ILK también aumenta la fosforilación Akt, y el aumento de expresión TGF- $\beta$ , hechos que seguramente estén relacionados, y sean los causantes de una mayor producción de superóxido. En resumen este estudio sugiere que la ausencia de ILK a nivel endotelial provoca una disminución de NO y un aumento de superóxido, probablemente producidas por un aumento en la presencia de TGF- $\beta$ , dando así una remodelación de la pared vascular y la formación de neoíntima, hechos importantes en las patologías cardiovasculares.

**Palabras clave:** óxido nítrico (NO), superóxido, quinasa ligada a integrinas (Integrin Linked Kinase, ILK), remodelación vascular, daño vascular, neoíntima.

**Cita:** Sergio del Olmo Cabrera, Marta Saura (2015) Función de ILK endotelial en la formación de neoíntima asociada a enfermedades cardiovasculares. *Dianas* 4(1): e20150910. ISSN 1886-8746  
journal.dianas.e20150910. 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:** 26 de junio de 2015

**Copyright:** © 2015 Sergio del Olmo Cabrera 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: [marta.saura@uah.es](mailto:marta.saura@uah.es)



## INTRODUCCIÓN

La aterosclerosis es una de las enfermedades cardiovasculares de mayor incidencia en la población, que provoca la rigidez y el endurecimiento de las arterias. En sus estadios iniciales tanto la aterosclerosis como otras enfermedades cardiovasculares se caracterizan por presentar un daño al endotelio vascular [1]. Estas células son las encargadas de controlar la homeostasis vascular, produciendo mediadores vasoactivos, regulando así el tono vascular [2]. Asimismo regulan la transmisión de señales de las fuerzas hemodinámicas del flujo sanguíneo al interior de la pared vascular y lo hacen mediante las integrinas, que reciben estas señales y las propagan a través de su unión a la matriz extracelular (MEC) y el citoesqueleto de actina. Con este último forma una plataforma de señalización que interactúa por asociación del dominio citoplasmático con rutas de señalización, uniéndose a proteínas adaptadoras y señalizadoras como la quinasa de adhesión focal (FAK) o la quinasa ligada a integrinas (ILK) [3]. La proteína multidominio ILK tiene una importante función en el desarrollo embrionario de tejidos vasculares [4], siendo su delección mortal en neonatos y comprometiendo el desarrollo normal de tejidos en adultos [5] ya que es responsable de los cambios producidos en los vasos sanguíneos y la reparación de daños en las celulares tisulares de dichos vasos. La expresión de ILK se encuentra disminuida en enfermedades como la aterosclerosis, que afectan la integridad de las arterias y producen la formación de neoíntima, estrechando así su luz [6] por la formación de neoíntima [7].

En condiciones fisiológicas las arterias se adaptan a variaciones en el estrés de la pared provocado por el flujo sanguíneo. Esto sucede mediante vasodilatación o vasoconstricción, y remodelando el diámetro de la luz en función de las necesidades, pero manteniendo la misma estructura arterial [8]. La arteria puede mantener una capa íntima delgada o sufrir remodelación de sus capas hacia un diámetro menor. En el caso de un periodo mayor de tiempo, semanas o meses, puede llegar a remodelar tanto su íntima como su capa media [9]. El control de este remodelado se lleva a cabo mediante la producción del mediador óxido nítrico (NO) endotelial, que actúa de manera beneficiosa en dosis moderadas y controladas, produciendo relajación vascular. Además, ayuda a la homeostasis vascular y a que el vaso adecúe el diámetro de su luz y su grosor al flujo de sangre que recibe en ese momento. La producción de NO en el endotelio está regulada por la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) regulando así el remodelado vascular. En condiciones de daño vascular o cuando la producción de NO se encuentra comprometida se produce un proceso de remodelado anormal. La formación de neointima en las arterias surge cuando hay una descompensación en el remodelado vascular y se produce como mecanismo regulatorio ante cambios en la homeostasis endotelial [7]. Este proceso compromete a la luz vascular generando patrones anormales de flujo que contribuyen a retroalimentar el proceso. Se ha demostrado que la pérdida de eNOS en el endotelio de ratones promueve la remodelación vascular dependiente del flujo anormal [10]. Esto último tiene como consecuencia la remodelación vascular anormal al reducirse los niveles de producción de NO e incrementarse los niveles de anión superóxido, lo que provoca daños a nivel de las proteínas celulares [6].

Previamente se había descrito que ILK regula el efecto vasomotor del NO mediante la estabilización de eNOS de forma que se mantenga acoplada y produzca cantidades adecuadas de NO en modelos murinos de deleción de ILK vascular. Asimismo, se demostró una disminución de los niveles de ILK en el endotelio de los vasos sanguíneos ateroscleróticos frente a los vasos sanos [6]. Esto señala a ILK como una posible diana terapéutica en enfermedades vasculares como la aterosclerosis.

Relacionando estos dos conceptos, la hipótesis que se mantiene es que el mantenimiento de los niveles de ILK en el endotelio es importante para que se produzca la adecuada remodelación de la pared vascular. Para ello se ha generado un ratón con deleción condicional de ILK específicamente dirigida al endotelio vascular y se ha utilizado el modelo de la ligadura de la carótida, con el fin de estudiar las consecuencias de dicha deleción sobre el remodelado vascular.

## Material y métodos

Los medios de cultivo (DMEM F12 y suero fetal bovino) son de Lonza. Los anticuerpos frente a ILK, actinas, p-eNOS, p-Akt y Akt son Cell Signaling technology (cst), el anticuerpo frente a TGF- $\beta$  es de Santa Cruz technology. El anticuerpo conjugado con HRP frente a conejo Sigma Chemical (MO, USA), la liberasa procede de Roche diagnostics.

### Cultivo primario

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].

### Modelos animales

Se han utilizado dos líneas de ratones modificadas, una VE-Cad Cre<sup>+/+</sup> con el gen cre-endotelial dirigido por el promotor de VE-Cadherina dirigiendo su expresión a las células endoteliales y otra con el gen de ILK floxeado (ILK<sup>f/f</sup>), ambos en fondo C57/BL6, se han cruzado para obtener ratones con el genotipo de cre-endotelial e ILK floxeado para poder realizar la deleción a nivel endotelial por el sistema cre-loxP. La cepa de ratones VE-Cad Cre<sup>+/+</sup> han sido cedidos por el Dr. de la Pompa del CNIC, modificados de los originariamente descritos por Iruela-Arispe, y otra de machos con el gen ILK floxeado, cedidos por el Dr. Fässler [9].

### Genotipado

El genotipado de dichos animales para saber si son aptos a nivel genético se realizó mediante extracción de DNA de una muestra de cola de ratón por el siguiente protocolo: a cada muestra de 0,5 cm se le añaden 0,5 ml de buffer de lysis (Tris 1M Sigma, EDTA 0,5M Sigma, NaCl 5M Sigma, SDS10% Sigma y H<sub>2</sub>O desalada) con 0,25 mg de proteínasa K (sigma), incubando a 55°C una noche. Después se añaden 0,7 ml de fenol:alcohol:cloroformo isoamílico (Sigma) en proporción 25:24:1 en agitación una hora. Centrifugamos 10 min a 11.000 rpm y recogemos la fase intermedia, añadimos 0,8ml de EtOH. Centrifugamos 10 minutos a 11.000 rpm aspiramos sobrenadante, añadimos 0,8 ml de EtOH al 80%. De nuevo centrifugamos la muestra, recogemos el sobrenadante dejamos secar el pellet y añadimos 50  $\mu$ l de agua miliQ, incubamos a 65°C 5 minutos y guardamos a 4°C.

### PCR

Las diluciones de DNA eran cuantificadas por espectrofotometría, en base a sus valores de absorbancia en el espectro de 260, y en función de esos resultados realizar una dilución de concentración 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l. Se

utilizaba el kit de PCR (Invitrogen), consistente en 0,5 µl de Taq polimerasa, 1 µl de primers sense y otro de antisense, 1,5 µl de cloruro de magnesio 50 mM, 0,5 µl de dNTPs 100 M, 5 µl de buffer de PCR 10x, 38,5 µl de agua destilada miliQ y 1,5 µl de muestra.

Primers:

•Cre sense: CTG GGA TGC TGA AGG CAT CAG •Cre antisense: TTG CGA ACC TCA TCA CTC GTT

•ILK sense: GTC TTG CAA ACC CGT CTC TGCG •ILK antisense: CAG AGG TGT CAG TGC TGG GATG

Ciclos de PCR:

ILK	CRE
94°C - 5 min	94°C - 5 min
94°C - 45 sec	94°C - 45 sec
55°C - 1 min	58°C - 45 sec
72°C - 1 min	72°C - 1 min
72°C - 10 min	68°C - 10 min

Ambos ciclos poseen un calentamiento de 110°C durante 10 min. Los programas son de 35 ciclos a excepción del inicio y el final. Después se mantenía a una temperatura de 4°C.

Los geles para la electroforesis eran preparados con una solución de tampón de electroforesis 1x (Tris Base Sigma, ácido acético glacial Sigma, EDTA Sigma y H<sub>2</sub>O destilada miliQ), un 1% de agarosa (Sigma) si queríamos observar cre o un 3% si era ILK y 1 µl de un intercalante de DNA redsafe (intron). Las muestras son preparadas 12 µl de muestra y 2 µl de del loading buffer 10x (250 mM TrisHCL Sigma, Bromophenol Blue al 92% Sigma, Glicerol al 40% Sigma); marcador de peso molecular (invitrogen) y azul, en proporción 5:1:1,5 µl. La cubeta de electroforesis era conectada a una fuente con una potencia de 90 mV y se dejaba llena de tampón de electroforesis y después se revelaba a la luz ultravioleta.

### Delección de ILK e inducción de aterosclerosis

La delección de ILK se realizaba en machos con el genotipo deseado Cre<sup>+/+</sup> -ILK End<sup>f/f</sup> (ILK End cKO) mediante la utilización de dieta con un 40% de tamoxifeno (Harlan laboratorios) para la activación del sistema crelox durante un tiempo mínimo de una semana. Los animales eran intervenidos junto con otro grupo de animales que no han estado tomando tamoxifeno (vehículos, CT) realizándoles un ligadura en la carótida derecha a la altura de la bifurcación por medio de un hilo con el fin de generar una alteración hemodinámica similar a la que encontramos en un proceso de placas de ateroma. La carótida contralateral se deja sin ligar y sirve de control. Tras esperar tres semanas se procedió a aislar ambas carótidas, la aorta, y el esófago [6].

### Western blot

La extracción de proteínas de la aorta se realizaba con la inclusión de esta en 40 ml de 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, b-glicerolfosfato 10mM, PMSF 1Mm y una pastilla de complet mini) previa limpieza de las capas que no nos interesan (grasa y desechos) y digestión manual, tras esto se realiza una sonicación durante 10 segundos de pulsos en intervalo, para después realizando un centrifugado de 10 min a 4°C y 12000 rpm, tras esto retirábamos el sobrenadante.

La extracción de proteínas celulares se hizo según el siguiente protocolo: lavado del cultivo con PBS frío, aspirado y posterior raspado con tampón lisis. Las proteínas (15-30µg) 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 de β-actina. Los resultados fueron analizados mediante el programa de análisis de imagen Image J (NIH, Bethesda, MD, USA).

### Cortes histológicos

Las carótidas fueron incluidas en paraformaldehído al 4% durante 24 horas, después se realizaron lavados de 20 minutos de PBS dos veces, EtOH 70%, 80% y 96% 3 veces cada uno sucesivas veces, 3 lavados de 10 minutos de EtOH puro, y por último se lava 30 minutos con xilol. Las muestras se incluyeron de manera vertical en bloques con parafina a 60° en una estufa durante una noche, después se cambiaron a bloques con parafina nueva también a 60° durante dos horas y por último se incluyeron en otra parafina a

60° fuera de estufa, una vez sólidas se desmoldaron y procedió a hacer cortes seriados de tejido de 6 micras de grosor y depositados en portaobjetos con polilisina.

### **Tricrómico de Masson**

Los cortes desparafinados mediante 2 lavados de 10 minutos de xilol y sucesivos de 5 minutos de EtOH puro, 96%, 80%, 70% y por último agua. Después se realizó el siguiente protocolo: 60 minutos Bownis, 2 lavados de 5 min con agua, 8 minutos de Weiber (50% cloruro férrico al 29% y Hematoxilina al 1%), lavado de 5 minutos con agua corriente, empapado en agua acidificada al 1%, 7 minutos de fucsina ácida, lavado con agua, 6 minutos de ácido forsfomilico, lavado de 2 minutos con agua, 2 minutos de fast Green al 0,1%, 5 minutos de EtOH 96%, 10 de EtOH puro y por último 10 de xilol, tras esto procederemos a cubrir la muestra con un cubreobjetos empapado en DPX.

### **Inmunofluorescencia**

Se desparafina por el mismo proceso que en tinción, se desenmascara en tampón EDTA en ebullición durante dos minutos, se lava dos veces durante 5 minutos en PBS y procedemos a bloquear durante 45 minutos en PBS con BSA al 2%, tras esto incubamos la muestra con el anticuerpo de ILK y TGF-beta en dilución 1-50 en el mismo medio durante toda la noche en cámara fría húmeda en oscuridad, lavamos 2 veces con PBS e incubamos con *Alexa fluor rabbit* dilución 1-500 durante 1 hora. Por último lavamos con BS y montamos con un cubreobjetos humedecido en medio de montaje con anticuerpo fluorescente Hoescht. Las imágenes se adquirieron mediante microscopía confocal (microscopio confocal Leica SP5)

### **Medida de los niveles de anión superóxido**

Para analizar los niveles de anión superóxido que podemos encontrar en los animales con delección de ILK, analizamos fragmentos de aorta con el siguiente tratamiento. Tras lavar con PBS, incubamos 30 minutos con liberasa y tamizamos con un tamiz de 150µm, tras recoger lo que pasa a través del tamiz centrifugamos la muestra a 12000 rpm 10 minutos y resuspendemos el pellet con PBS y sonda DHE durante 30 minutos en oscuridad. Por último medimos al citómetro en el canal FL2H contrastando las muestras con yoduro de propidio.

### **Medida de NO**

Para medir los niveles de NO se aplicó al medio en el que se incubaron los fragmentos de aorta para medir el anión superóxido un kit de medidas de nitratos/nitritos por fluorimetría (Cayman chemical) con el siguiente protocolo: realizar una curva estándar de nitritos con unas muestras pretratadas, alicuotar nuestras muestras, añadir a todos el buffer de nitritos, añadir *DAN reagent* y dejar reaccionar 10 minutos, añadir NaOH, y leer por fluorimetría a una excitación de 360-365 nm y una emisión de 430 nm.

### **Análisis estadístico**

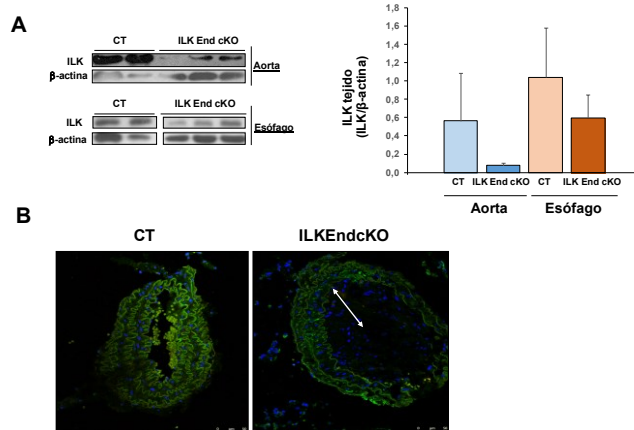
Cada condición experimental fue duplicada dentro de cada experimento y cada experimento repetido al menos 3 veces. Las comparaciones fueron hechas con análisis de la varianza de una vía seguido del test de Scheffe para comparaciones múltiples con control común.

## **Resultados**

### **ILK se deleciona en el endotelio vascular**

Para realizar la delección de ILK a nivel endotelial se procedió a la administración oral con la dieta de tamoxifeno, con el fin de activar el sistema cre-loxP. El 4-hidroxi (OH)-tamoxifeno activa la recombinasa Cre situada que se expresa en el endotelio gracias al promotor de la VE-Cadherina escindiendo el gen ILK flanqueado por secuencias lox [9]. Tras administrar la dieta, realizamos la determinación de los niveles de ILK mediante western blot en aorta tomando la expresión de ILK en el esófago como control de tejido no vascular (Fig 1A). Observamos una disminución de ILK en las aortas que no se produce en el esófago indicándonos el éxito de la delección. Al realizar en estos animales el ligamiento de la carótida derecha se puede observar la expresión en la pared vascular de ILK en los animales control (CT, expresan ILK) y sin embargo en los animales tratados con tamoxifeno (ILKEndcKO) observamos expresión de ILK en la media, pero no se observa tinción significativa de ILK ni en el endotelio ni en la neointima (Fig 1B).

De este modo podemos confirmar que la delección de ILK en los modelos animales se lleva a cabo específicamente en el endotelio.



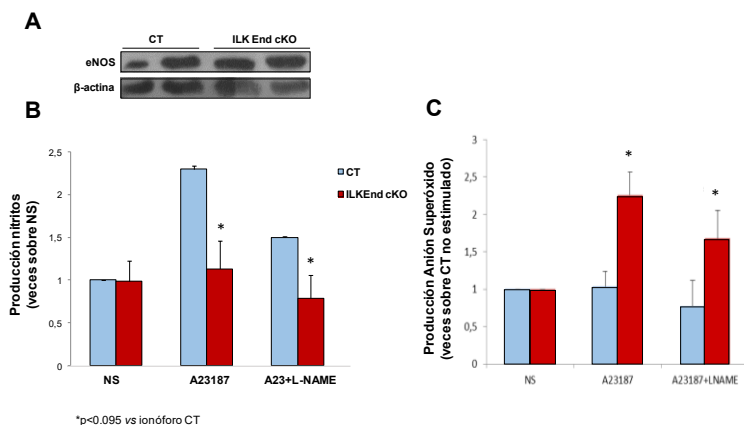
**Figura 1.: Delección de ILK en modelos animales.** A) Se analizó la expresión de ILK en cada tejido mediante WB, el control de carga de β-actina se analizó mediante el mismo procedimiento y la representación gráfica del análisis densitométrico se presenta debajo (n=5). B) En azul observamos los núcleos celulares y en verde ILK, la zona correspondiente a la neoíntima se encuentra señalada con una flecha en el animal ILKEndcKO, además de no presentar presencia de ILK. Se muestra un corte representativo similar a 5 analizados.

**La actividad de eNOS se encuentra desacoplada en el endotelio de los animales que no expresan ILK en el endotelio.**

Después de observar que la delección se realizaba correctamente en el tejido endotelial, procedimos a comprobar de qué manera podía afectar la disminución de la proteína a los niveles del NO implicado en el proceso de remodelado.

Comenzamos estudiando los niveles de eNOS en los animales delecionados, para ver si un descenso de ILK afectaba a su expresión y nos encontramos con que no había diferencias de expresión entre los dos tipos de animales (Fig 2A), por lo que pasamos a observar la actividad de eNOS. Sobre tejido aórtico estimulamos la activación de eNOS con un ionóforo de calcio (A23187 [10<sup>-6</sup>M]) con el fin de observar la producción de NO. Vimos una diferencia clara en cuanto a los niveles de producción de NO entre los animales control y los delecionados (Fig 2B), con unos niveles más altos de producción por parte de aquellos ratones que poseían niveles normales de ILK, que eran claramente inhibidos por el L-NAME, un inhibidor de la NOS. En contraste, los animales que no expresan ILK, no producían una cantidad adicional de NO en respuesta al ionóforo indicando un problema en la activación de eNOS. Ya que un descenso en la actividad de eNOS puede ser indicativo de un desacoplamiento enzimático donde el enzima comienza a producir radical superóxido en lugar de NO exploramos si la delección producía un incremento de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en estos animales mediante la oxidación de DHE cuantificado mediante citometría de flujo. Observamos que la delección endotelial de ILK incrementaba la producción de superóxido en respuesta al ionóforo. El L-NAME evitó la oxidación en ambos grupos indicando que eNOS contribuye a la formación de anión superóxido. En estos experimentos se realizó un pretratamiento con apocinina (10<sup>-7</sup>M), un inhibidor específico de la NADPH oxidasa (la mayor fuente de superóxido a nivel endotelial) con el fin de poder cuantificar la producción de superóxido de otras fuentes celulares.

Aunando la información obtenida respecto a los niveles de proteína y los de actividad de eNOS, podemos afirmar que la disminución de los niveles de la proteína de ILK en el endotelio produce desacoplamiento enzimático de eNOS.



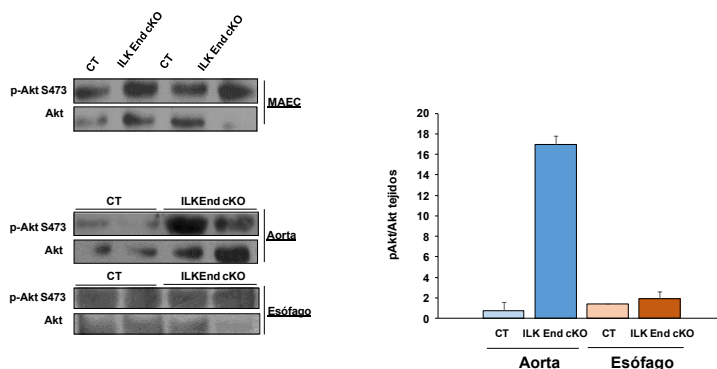
**Figura 2.: Expresión y actividad de eNOS.** A) Se analizó la expresión de eNOS en cada tejido mediante WB, lo mismo que el control de carga de β-actina. B) La producción de nitritos nos da los niveles de NO producidos por los distintos tejidos, recogidos del medio exterior en el que se encuentra el tejido. C) Los niveles de superóxido se observaron directamente en las células del tejido por citometría de flujo. Las células de la pared vascular fueron aisladas mediante digestión con liberasa y posterior tamizado, se recogieron en DMEM F12 al 0,5% suero de ternera fetal y se incubaron con DHE durante 1h. Se muestra la media±SE de tres experimentos realizados por duplicado.

### La delección de ILK incrementa la fosforilación de Akt

Con el fin de conocer como la disminución de ILK afecta a la actividad de eNOS, decidimos estudiar los niveles de Akt y su actividad mediante la medida de su fosforilación en la Ser473, proteína que se encuentra en la ruta de señalización entre ILK y eNOS, siendo activada por la primera.

Realizamos un cultivo de células MAEC procedente de nuestros animales en los que se indujo la delección con la administración al cultivo de t4-OH tamoxifeno durante dos días, además de estudiar los niveles en la aorta y esófago de los ratones tratados con dieta normal o suplementada con tamoxifeno. En ambos casos encontramos un aumento de la fosforilación de Akt en el tejido o células endoteliales que habían sufrido la delección de ILK, en contraste con los controles o el esófago donde la administración de tamoxifeno no alteró la fosforilación de Akt

(Fig 3).

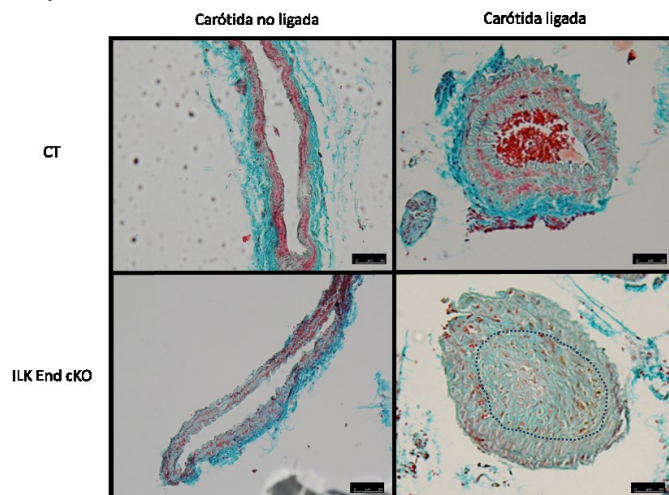


**Figura 3.: Niveles de fosforilación de Akt.** Las células endoteliales de aorta murina (MAEC) fueron tratadas con tamoxifeno durante dos días. La expresión de p-Akt frente a Akt se analizó mediante WB y la representación gráfica del análisis densitométrico se presenta debajo de cada WB representativo del experimento (n=3).

### La delección genera formación de neointima.

Una vez confirmada la importancia de ILK en cuanto a la producción de NO y superóxido a nivel endotelial, decidimos observar los efectos directos sobre el vaso a nivel de remodelación, con el fin de poder confirmar los efectos que tiene la producción de los dos compuestos mencionados sobre la estructura arterial en condiciones de estrés. Para ello realizamos cortes histológicos de las carótidas procedentes de los animales con los que habíamos estado trabajando, y les realizamos una tinción tricrómica de Masson.

Encontramos una estructura muy parecida tanto en controles como en ILKendcKO sin ligadura (Fig 4), pero en el control con ligadura vemos una clara reestructuración del vaso sanguíneo con una disminución de la luz. En ILKendcKO con ligadura vemos una remodelación aún mayor que en el vehículo, estando la luz del vaso prácticamente cerrada debido a la presencia de células y matriz extracelular. Esto nos confirma como los bajos niveles de NO y altos de superóxido que vienen como consecuencia de una disminución en la expresión de ILK llevan a un remodelado vascular desregulado y a la formación de neointima que ocluye la luz del vaso.

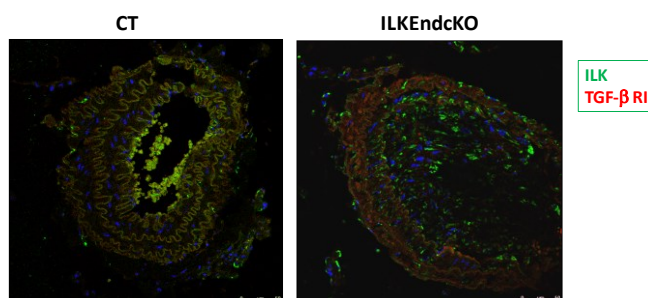


**Figura 4.:La carótida genera neointima.** Las estructuras citoplasmáticas se tiñen en rojo, las fibras de colágeno en verde y los núcleos celulares en marrón. La parte marcada con línea discontinua corresponde a la lámina elástica interna que delimita la media con la íntima en nuestro caso con la neointima. Dicha formación se caracteriza por tener también

presencia de núcleos celulares. Los eritrocitos presentes en el vehículo ligado no presentan núcleos y se tiñen en rojo más intenso. Se muestra una imagen representativa de los 6 animales analizados.

### ILK regula el proceso de remodelado mediante la expresión y señalización de TGF- $\beta$ .

La actividad de ILK y TGF- $\beta$  se encuentran relacionadas. Para estudiar la contribución de de ILK a nivel del endotelio en el proceso de remodelación analizamos la expresión del receptor de TGF- $\beta$ . De nuevo utilizamos la técnica de inmunofluorescencia usada para situar ILK en el vaso, pero esta vez se marcó ILK en rojo y además observamos la presencia de TGF- $\beta$  RI marcado en verde. Podemos apreciar una expresión de TGF- $\beta$  RI incrementada en la media de ambos animales como consecuencia del proceso de remodelación sin embargo la zona de neointima que no presenta expresión de ILK tiene una La expresión de TGF- $\beta$  RI mayor, lo que indica una clara relación entre la ausencia de ILK, los niveles del receptor de TGF- $\beta$  y el remodelado anormal que presentan estas carótidas como consecuencia de la alteración del flujo sanguíneo.



**Figura 5.- La ausencia de ILK incrementa TGF- $\beta$  RI.** La expresión de ILK (rojo) está claramente disminuida mientras que la de TGF- $\beta$  (verde) se ve aumentada. Además podemos observar remodelación en el animal deleciónado (n=5).

## Discusión

La aterosclerosis es una enfermedad multifactorial que se desarrolla de forma progresiva por la incidencia de numerosos factores de riesgo y datos previos de nuestro grupo demuestran que ILK está disminuida según avanza la enfermedad [6]. Las fuerzas hemodinámicas que operan en la pared vascular contribuyen al mantenimiento de la homeostasis del vaso. Así, uno de los primeros eventos que se produce en las enfermedades vasculares como consecuencia de la incidencia de los factores de riesgo es la disfunción del endotelio de forma que no puede acoplar las señales hemodinámicas a la producción adecuada de NO y otros mediadores para y autocrinos. Así, las zonas donde se producen regímenes de flujo sanguíneo turbulento y por tanto expuesto a mayor *shear stress* son más proclives a desarrollar placas de ateroma, como la raíz aórtica y el cayado de la aorta y las bifurcaciones arteriales. Las zonas con bajo *shear* y un régimen de flujo laminar están protegidas del desarrollo de lesiones [18]. A partir de los datos que hemos obtenido en este trabajo de investigación podemos afirmar que, en un modelo murino de que reproduce los cambios hemodinámicos que promueven desarrollo de placa, ILK posee un papel muy importante en la formación de la capa neointima y la acumulación de matriz extracelular. Además se trata de un proceso que se acompaña de un aumento en los niveles del anión superóxido debido al desacoplamiento de la enzima eNOS, así como un descenso en los niveles de NO. Se ha descrito que el NO es necesario para iniciar la remodelación vascular adaptando los vasos al flujo sanguíneo [12]. En este contexto, nuestros resultados muestran una disminución en sus niveles acompañado de aumento de los niveles de superóxido que puede promover la aparición de especies reactivas más oxidantes como el peroxinitrito que amplifiquen y perpetúen el daño. Este resultado se obtuvo anteriormente en el modelo de deleción completa de ILK tanto en músculo liso vascular como en endotelio. Hasta el momento en la formación de neointima se había otorgado un papel clave a la regulación de la migración y proliferación de las células musculares lisas donde se ha demostrado un papel clave de ILK en estos procesos, especialmente en modelos que conllevan daño mecánico al endotelio [11]. Sin embargo nuestros datos demuestran por primera vez que la presencia de ILK en el endotelio juega un papel crucial regulando la producción de NO y la formación de neointima en respuesta a fuerzas hemodinámicas. Este hecho aparece reflejado en modelos murinos de deleción completa de ILK, demostrando que sin su presencia este proceso no se resuelve adecuadamente.

La remodelación de la pared vascular conlleva la reorganización de las células del vaso y la remodelación de la matriz. En este proceso interviene el TGF- $\beta$ , que regula la expresión depósito y degradación de las proteínas de matriz extracelular. En nuestro modelo, la neointima expresa de manera abundante el receptor del TGF- $\beta$  indicando un aumento de su ruta de señalización ya que tanto la expresión del propio factor de crecimiento como del receptor se encuentran autorreguladas por TGF- $\beta$  [18]. El TGF- $\beta$  produce un efecto dual en la vasculatura ya que en condiciones fisiológicas presenta un efecto antiaterogénico pero cuando se expresión y/o acciones no está bien regulada su efecto es profibrótico [15]. Por otra parte,

antecedentes del grupo demuestran que el NO endotelial regula los niveles de TGF- $\beta$  y su señalización a través de Smad2/3 [14], lo sugiere que el desacoplamiento enzimático de eNOS que provoca la ausencia de ILK podría aumentando los niveles de TGF- $\beta$  y promoviendo la producción y depósito de matriz. Por otro lado se ha descrito que ILK fosforila Akt en la serina 473 y sin embargo en nuestros resultados se observa un incremento en la fosforilación de esta proteína. Además de ILK existen varios candidatos a fosforilar Akt en este residuo y es posible que la ausencia de ILK esté compensada por otra ruta. Sin embargo, se ha demostrado un *crossstalk* entre las rutas de señalización de TGF- $\beta$  vía Smad y la de Akt y esta sobreestimulación podría contribuir a sus efectos [16]. A la vista de nuestros resultados podemos pensar que la fosforilación de Akt sería la responsable del aumento de la señalización de TGF- $\beta$ .

Además, el estrés oxidativo producido por el aumento de los niveles de superóxido pueden también contribuir a la sobreexpresión de la ruta de TGF- $\beta$  y la remodelación observada [17] Harán falta más estudios para delinear el mecanismo y las proteínas implicadas.

Con esta información podemos entonces asignar a la ILK endotelial un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis vascular y una posible diana para enfermedades cardiovasculares, tanto de manera directa, ya que su ausencia provoca el desacoplamiento de eNOS y la consecuente disminución de producción de NO, como de manera indirecta ya que su ausencia provoca una mayor presencia de TGIF aumentando los niveles de superóxido, confirmando nuestra hipótesis sobre el importante papel que posee la ILK endotelial en el proceso de la remodelación vascular a nivel patológico.

## Bibliografía

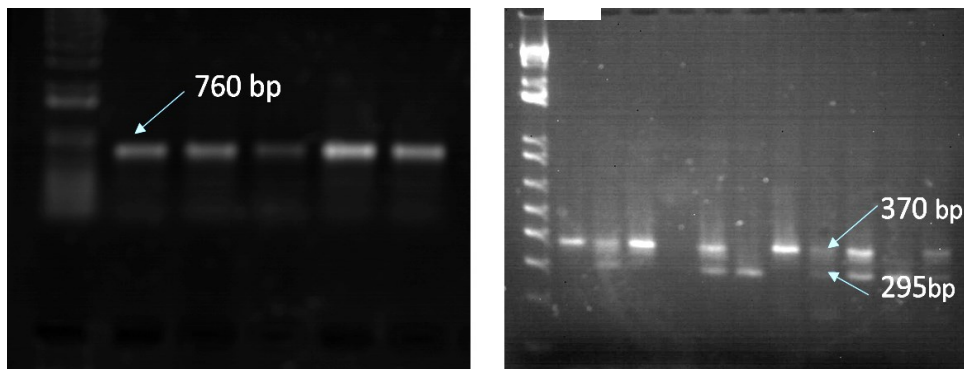
1. Alenghat, F.J., and D.E. Ingber. 2002. Mechanotransduction: all signals point to cytoskeleton, matrix and integrins. *Science's STKE*, 119:1-4.
2. Legate K.R., E. Montañez., et al. 2006. ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7: 20-31
3. Zaragoza C., S. Márquez., 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. Glagov S., C. Zarins., et al. 1988. Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med*. 112:1018-31
9. Brakebusch C., R. Fässler. 2003. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J*, 22: 2234-33
10. Di Lorenzo A., M.I. Lin., et al. 2013. eNOS-derived nitric oxide regulates endothelial barrier function through VE-cadherin and Rho GTPases. *J cell Sci*, 126: 5541-52.
11. Hou G. J.G. Pickering et al. 2008. Integrin-linked kinase in the vascular smooth muscle cell response to injury. *Am J Pathol*. 173(1): 278-88
12. Tang P.C., L. Quin., et al. 2008. MyD88-dependent, superoxide-initiated inflammation is necessary for flow-mediated inward remodeling of conduit arteries. *J Exp Med*. 205: 3159-71
13. Vi L., S. Boo., et al. 2015. Modulation of type II TGF- $\beta$  receptor degradation by integrin-linked kinase. *J Invest Dermatol*, 135:885-94.
14. Krishnan S., E. Szabo., et al. 2015. Modulation of cerebral endothelial cell function by TGF- $\beta$  in glioblastoma: VEGF-dependent angiogenesis versus endothelial mesenchymal transition. *Oncotarget*, Epub.



15. Liu Z.M., H.Y. Tseng., et al. 2015 Transforming growth factor  $\beta$ -interacting factor-induced malignant progression of hepatocellular carcinoma cells depends on superoxide production from Nox4. *Free Radical Biology and Medicine*, doi:10.1016
16. Xiao L., X. Peng., et al. 2015. Akt regulation of mesothelial-to-mesenchymal transition in peritoneal dialysis is modulated by Smurf2 and deubiquitinating enzyme USP4. *Cell Biol.* 6;16:7
17. Piera-Velazquez S., A. Markul., et al. 2015. Increased Expression of NAPDH Oxidase 4 (NOX4) in Systemic Sclerosis Dermal Fibroblasts: Regulation by Transforming Growth Factor  $\beta$ . *Arthritis Rheumatol.* doi: 10.1002
18. Kamato D., M.L. Burch., et al. 2013. Transforming growth factor- $\beta$  signalling: role and consequences of Smad linker región phosphorylation. *Cell signal.* 25(10): 2017-24
19. Zaragoza C., S. Márquez., et al. 2012 Endothelial mechanosensors of shear stress as regulators of atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 23(5):446-52

## Anexo 1

Fotografía de los geles de agarosa que confirman el genotipo de cre end<sup>+/+</sup> y ILK f/f utilizados en los experimentos.



**Figura de Anexo.:** Genotipos de los ratones utilizados. A) Cre endotelial muestra una banda tras la amplificación por PCR de 760 pares de bases. B) ILK puede mostrarse de dos maneras, a 370 pares de bases si posee floxeado, o a 295 si no lo posee, los individuos con solo un floxeado mostrarán ambas bandas, nosotros queremos los individuos con doble floxeado.