

# Avances en investigación renal y vascular: Talleres de discusión.

Cursos de Verano de la Universidad de Alcalá 2013, 52-01.

---

## Papel de ILK en la activación y daño endotelial producido por la Uremia

---

**Andrea García Jerez**  
(Técnico de Laboratorio)  
Departamento Biología de Sistemas (UAH)

# OBJETIVOS:

Determinar el efecto del suero urémico o toxinas urémicas, asociados a la ERC, sobre los cambios en la activación y/o expresión de la proteína ILK, analizando los mecanismos implicados en la activación o daño endotelial.

## •Objetivos específicos:

- Analizar si el suero urémico o las toxinas urémicas modifican la expresión y/o activación de la proteína ILK en células endoteliales en cultivo y estudiar los mecanismos de señalización celular implicados.

- Determinar la implicación de la proteína ILK en el efecto del suero urémico o toxinas urémicas sobre el endotelio mediante ensayos *in vitro* de daño endotelial.

# Materiales y Métodos:

## Cultivo in vitro :

Células endoteliales de aorta humanas hibridadas con tejido somático EA.hy926 (CRL-2922)

Células de cultivo primario de vena umbilical/endotelio vascular humano HUVEC (CRL-1730).

## Materiales:

Toxinas Urémicas Comerciales

Suero Humano Comercial

Suero Urémico obtenido de pacientes con ERC en estadio 4-5

## Métodos:

Determinación de Apoptosis y niveles de ROS por Citometría de Flujo

Ensayo cierre de herida en células endoteliales de aorta in vitro

Ensayo de viabilidad

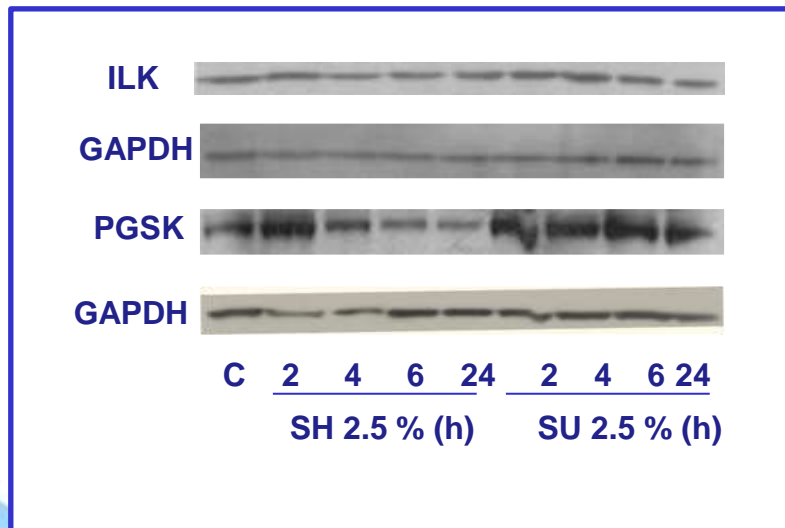
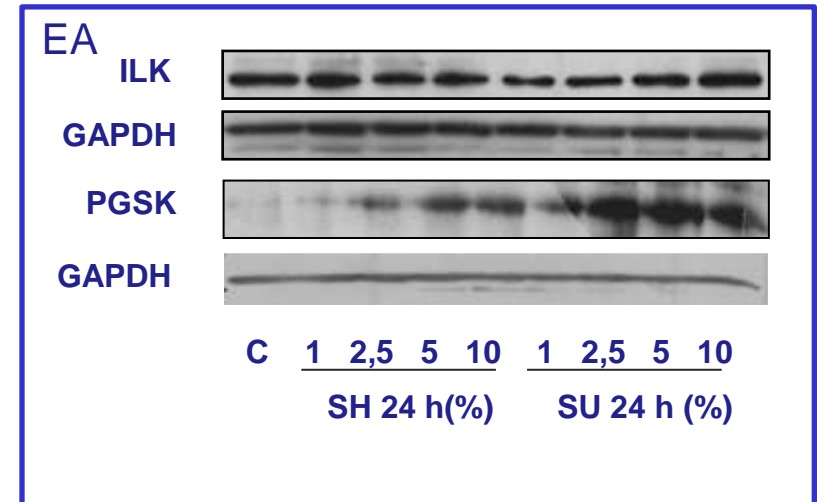
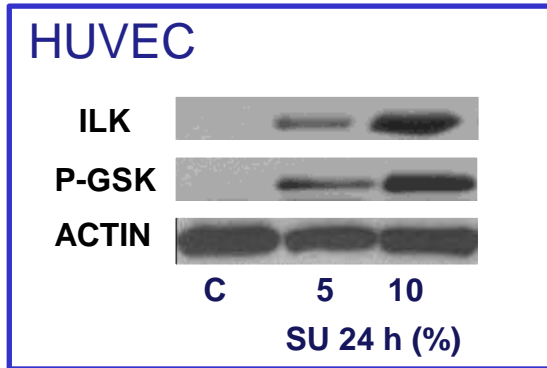
Ensayo quinasa de ILK

Silenciamiento de expresión de ILK por RNAi

WB

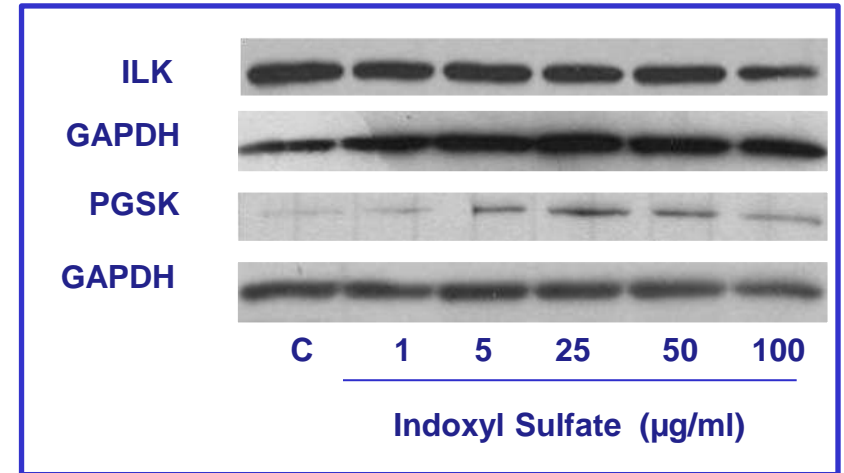
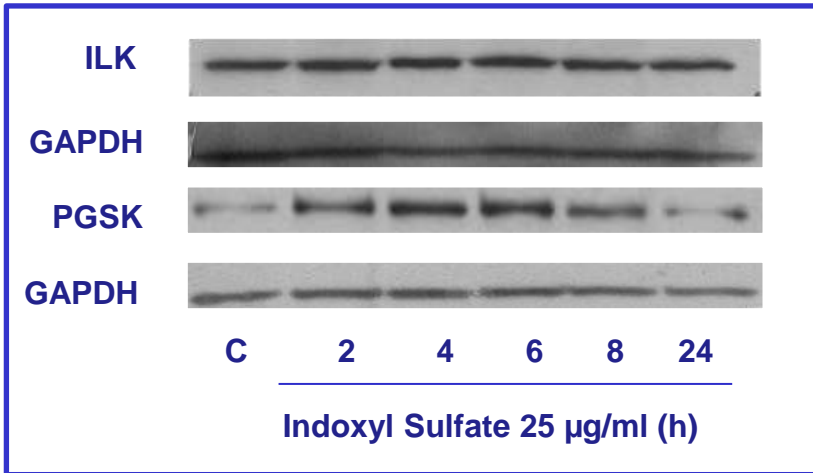
# Resultados:

1. El Suero Urémico induce la expresión de ILK en células HUVEC y aumenta su actividad en células HUVEC y EA.



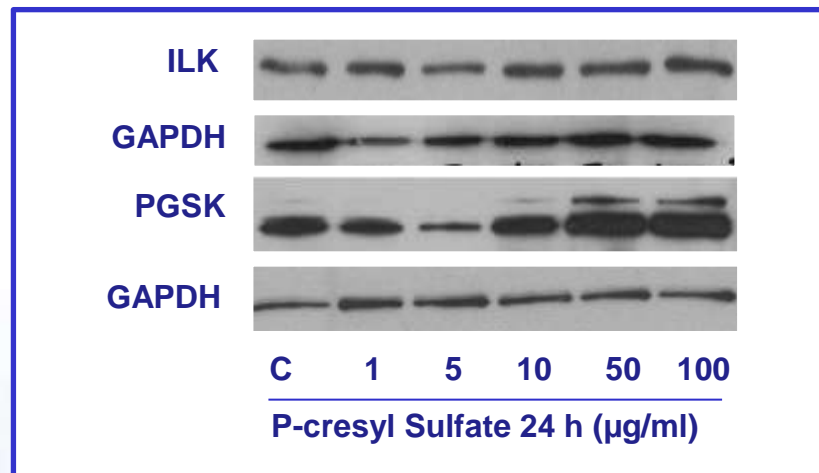
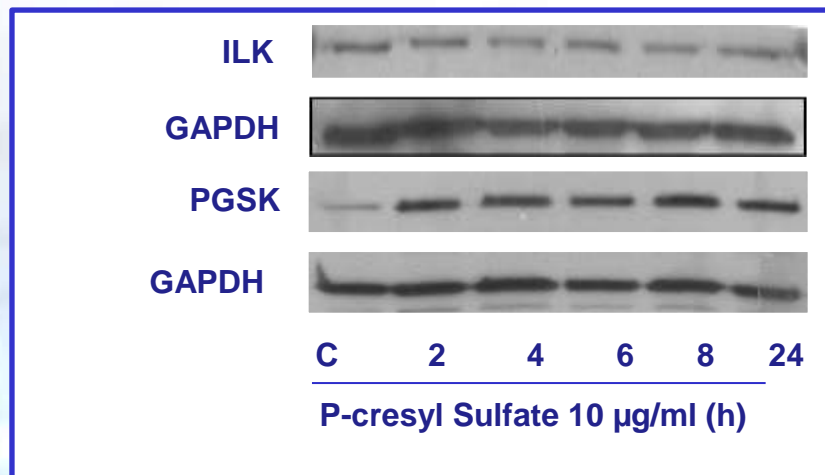
## 2. Efecto de las Toxinas Urémicas sobre la expresión y actividad de ILK.

INDOXYL SULFATO



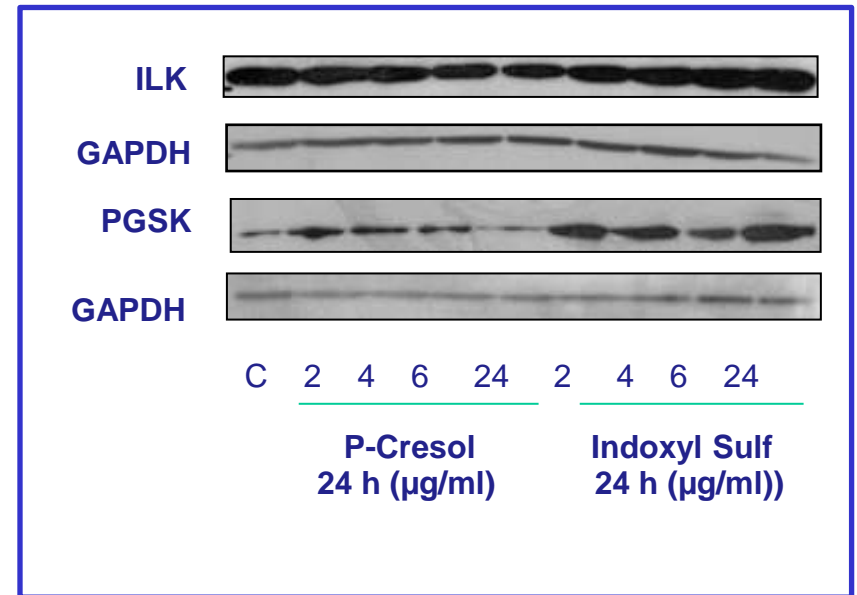
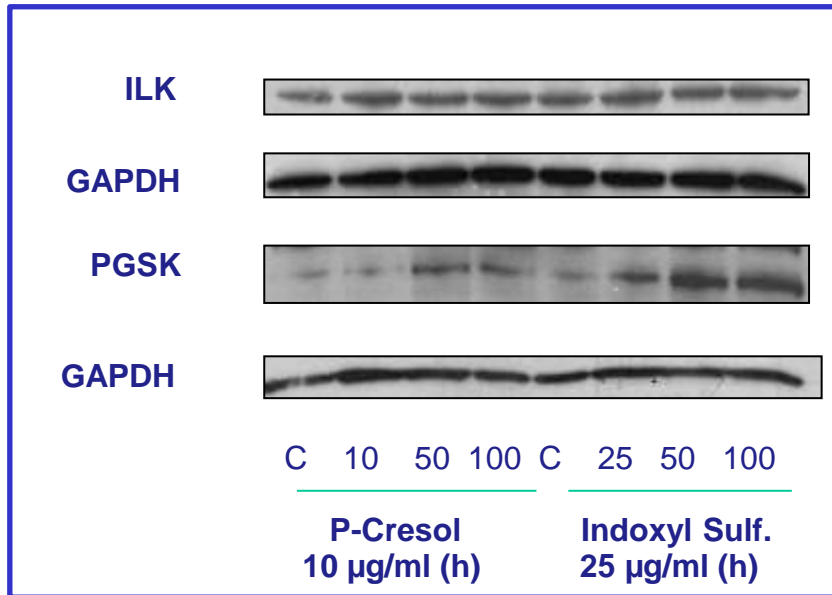
## 2. Efecto de las Toxinas Urémicas sobre la expresión y actividad de ILK.

P-CRESOL

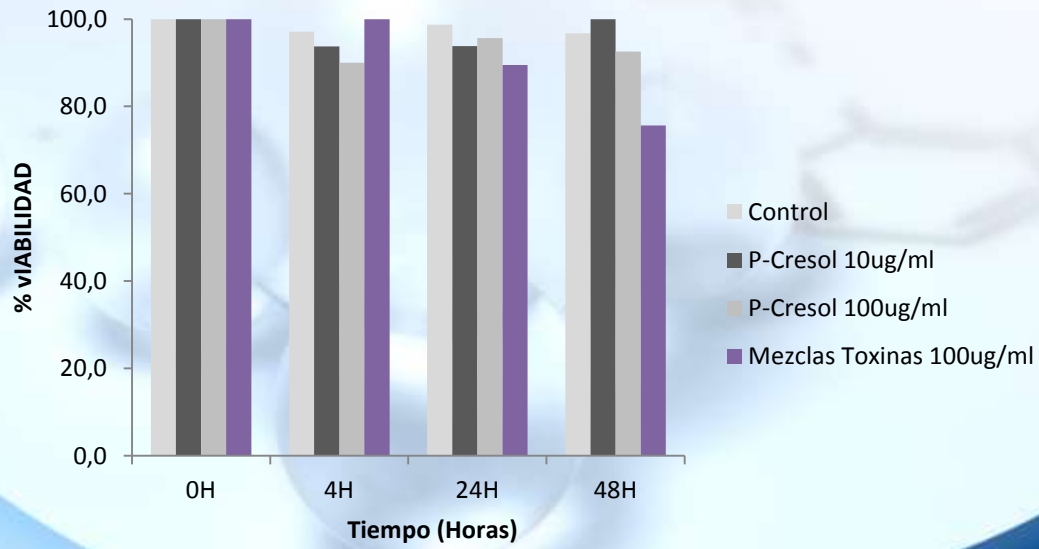
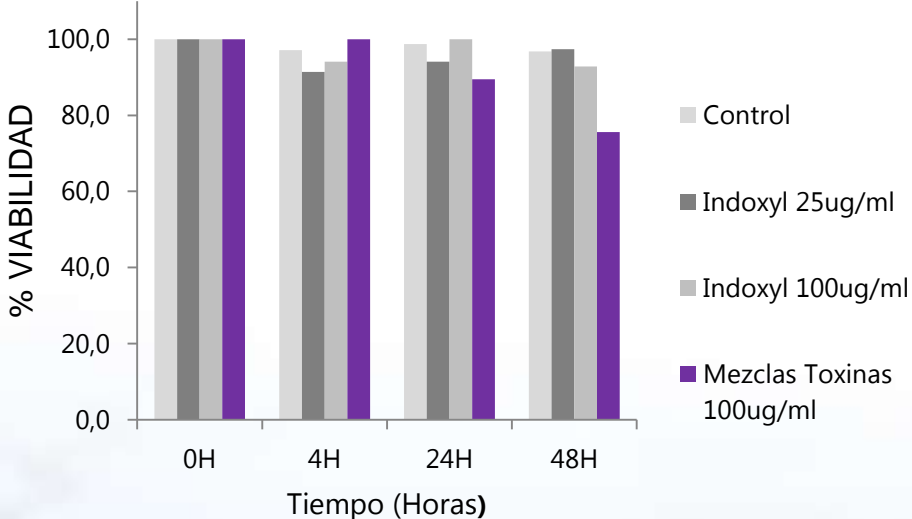
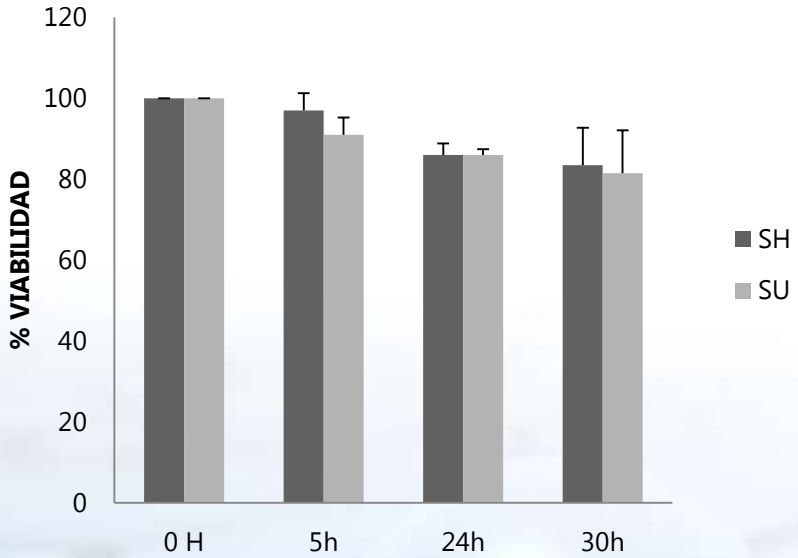


Condiciones definitivas:  
P-Cresol :10µg/ml  
Indoxyl Sulfato: 25 µg/ml  
Tiempo: 24h.

### 3. Efecto de las Toxinas Urémicas en Suero Humano :

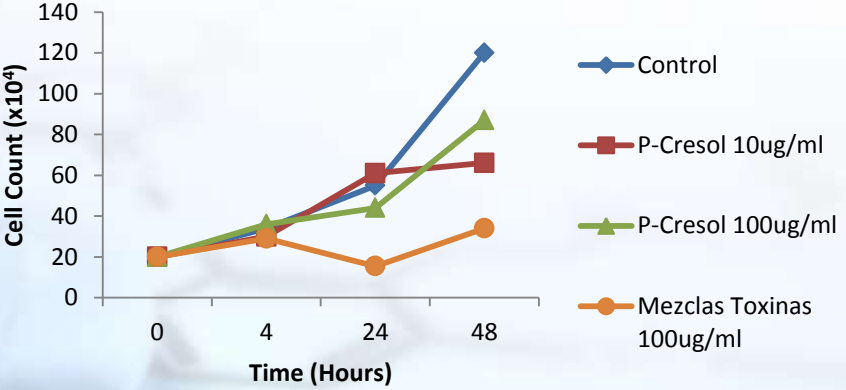
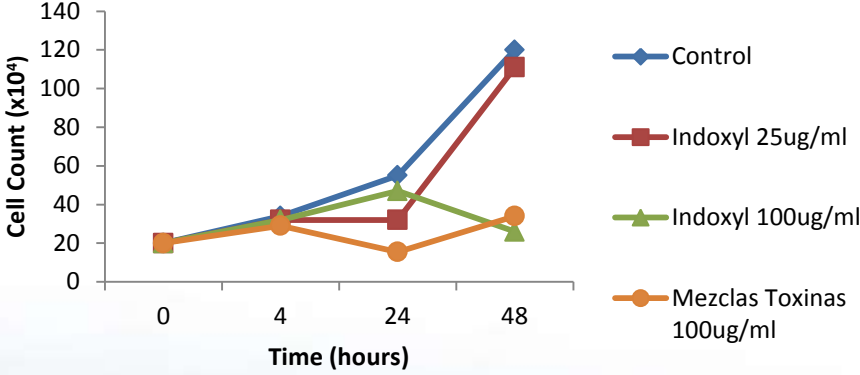


# 4. Ensayo de Viabilidad y Proliferación



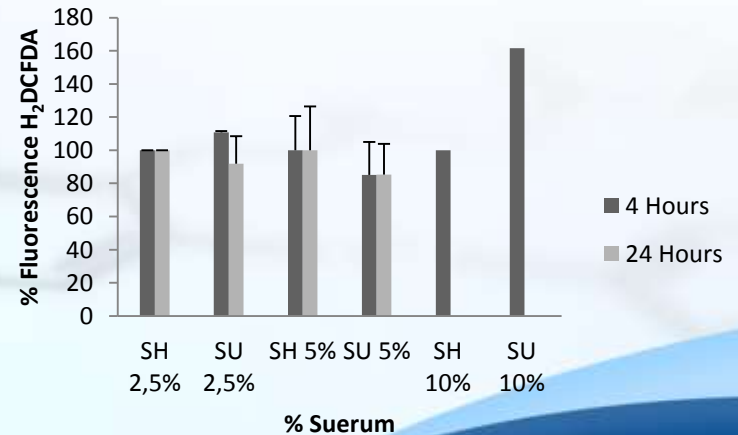
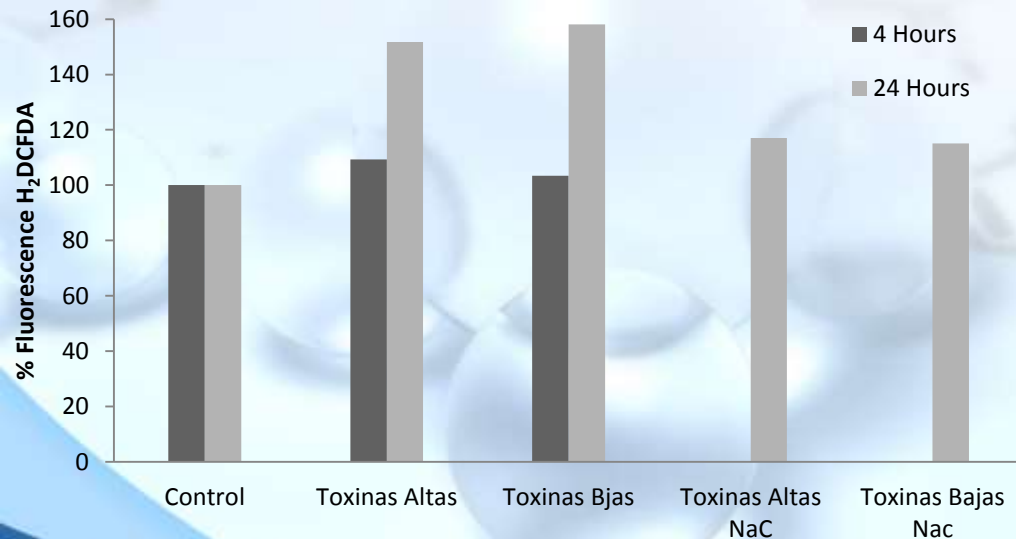
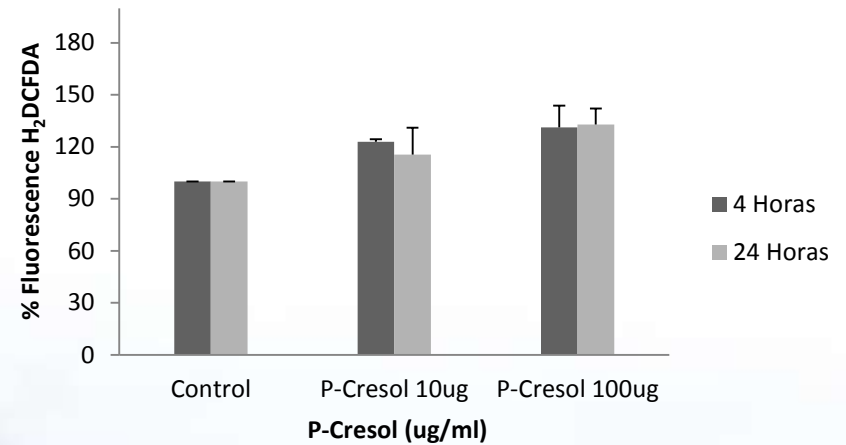
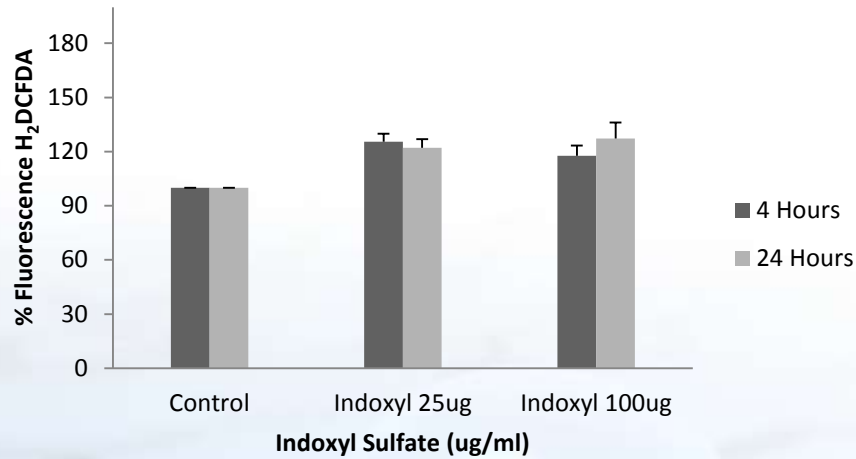


# Proliferación

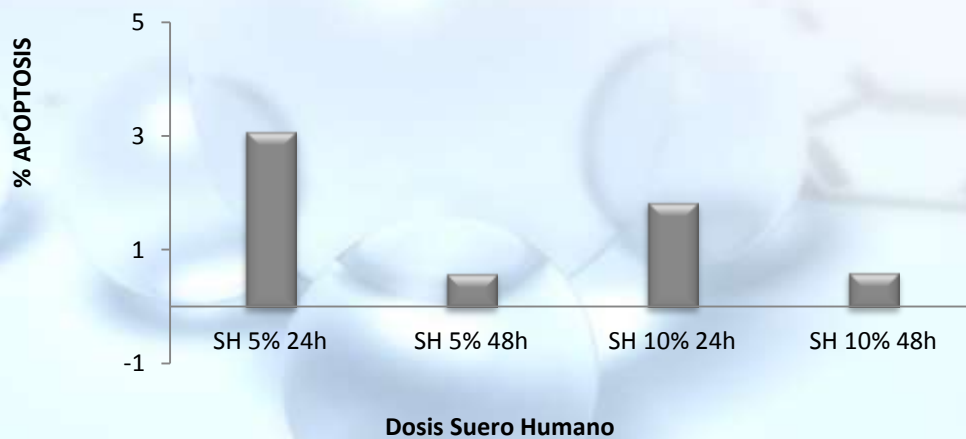
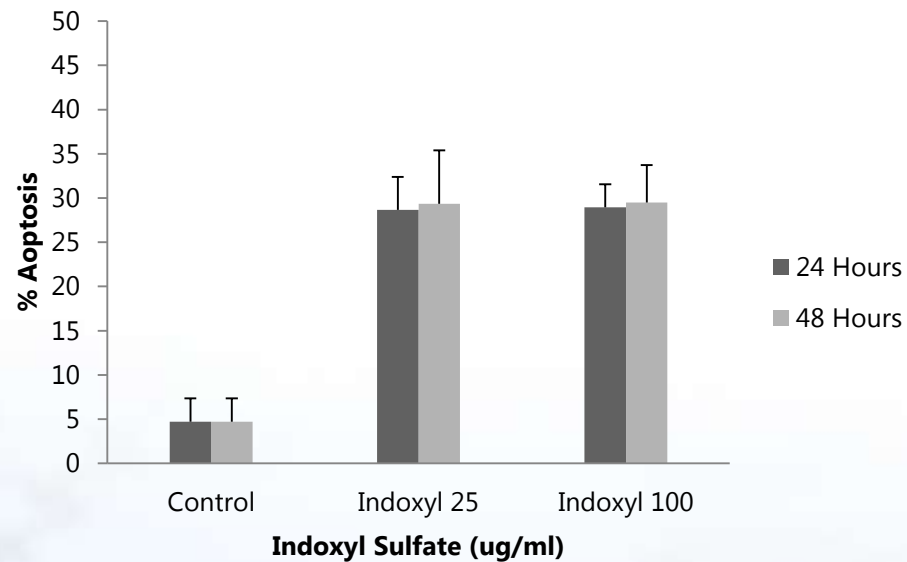
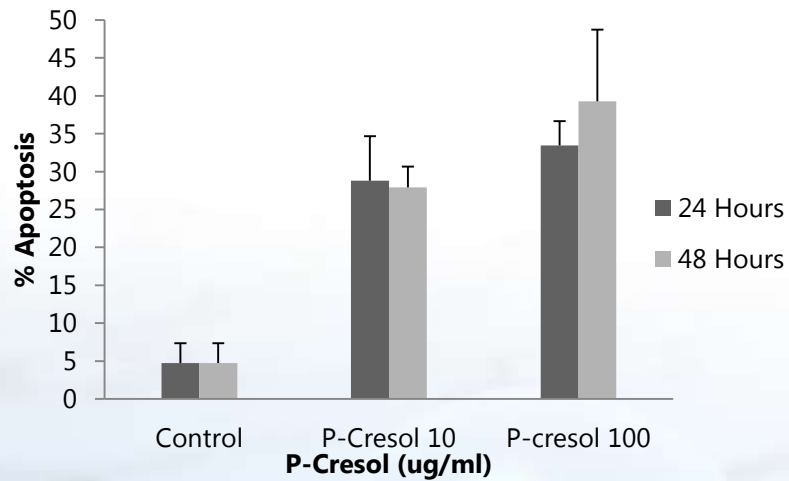


# Activación Endotelial

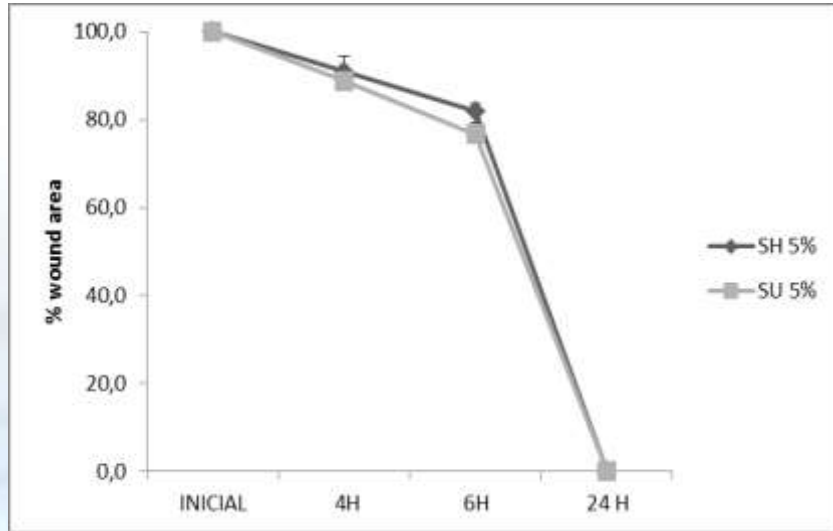
## 5. Producción de las ROS mediante suero y toxinas urémicas.



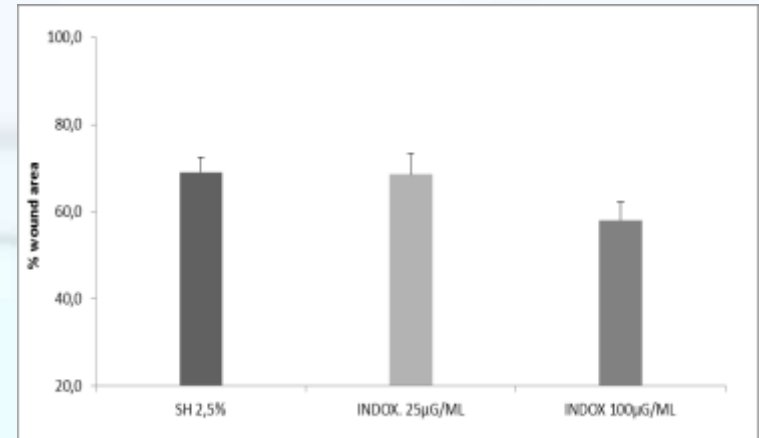
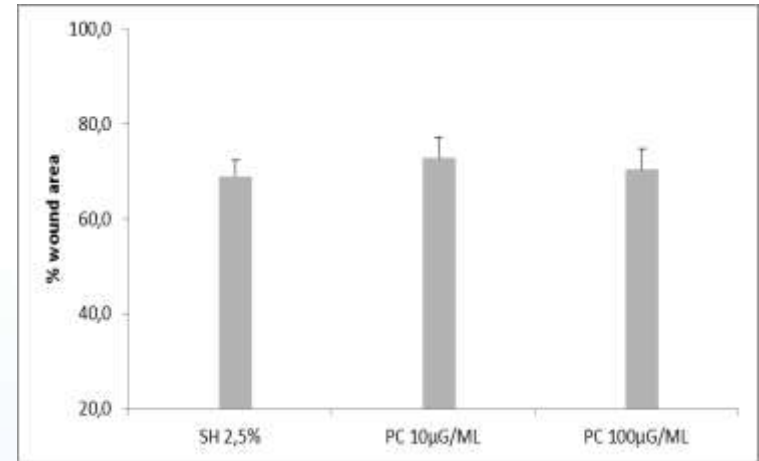
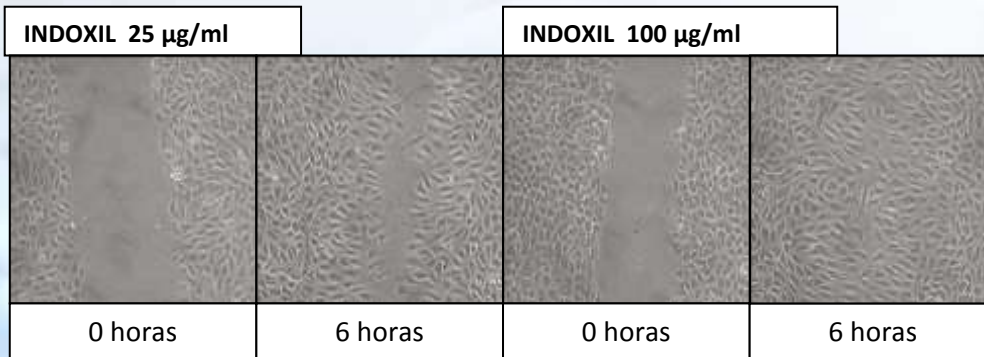
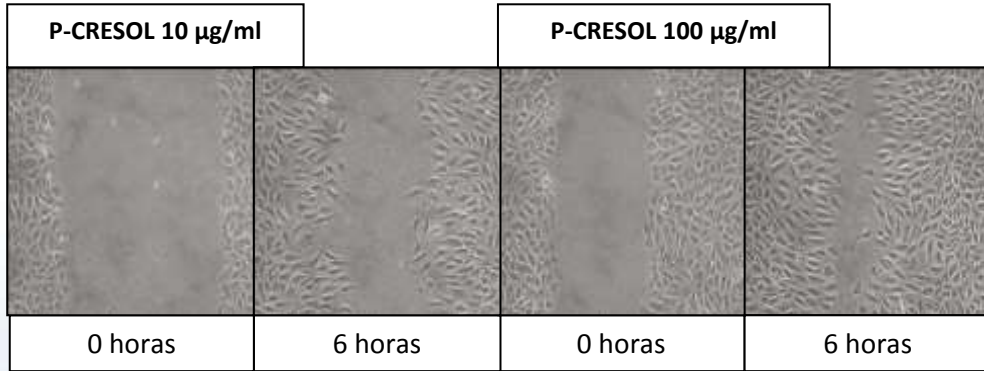
## 6. Producción de Apoptosis:



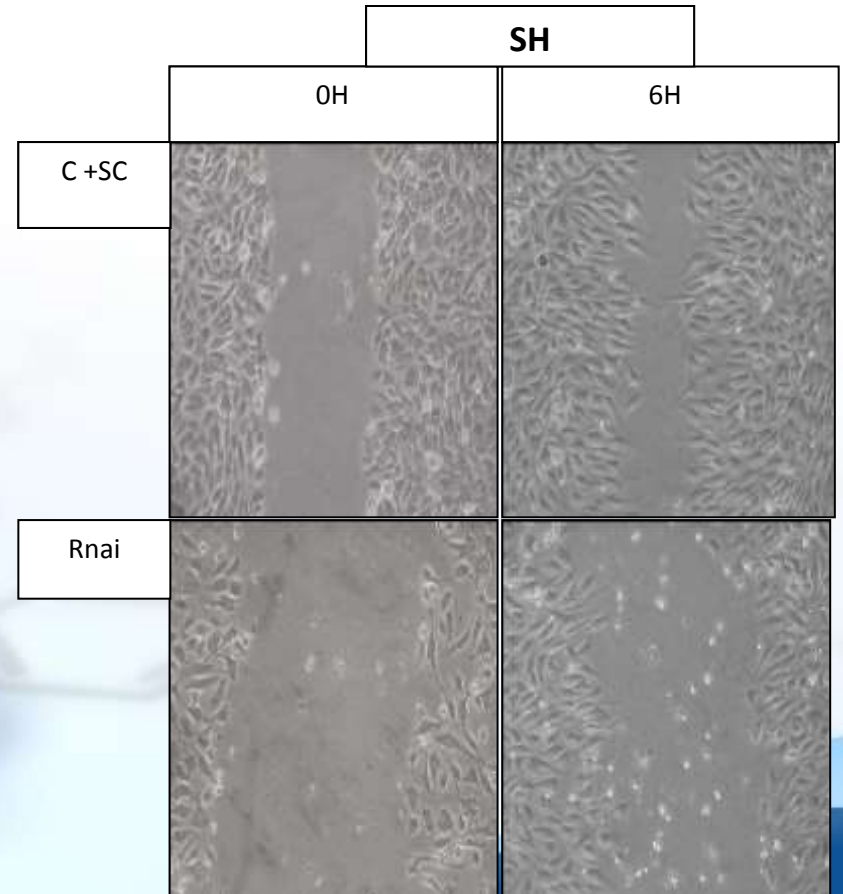
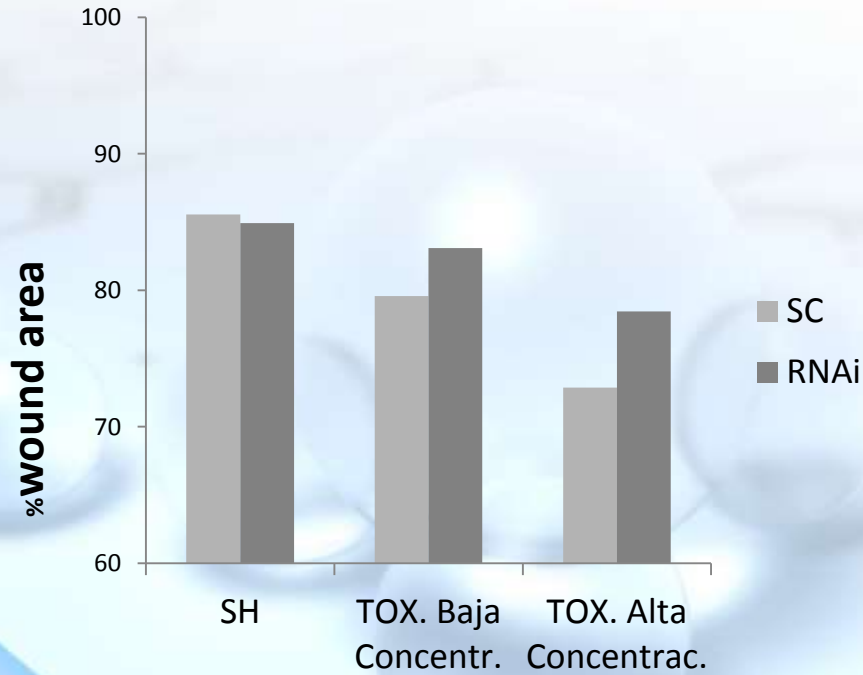
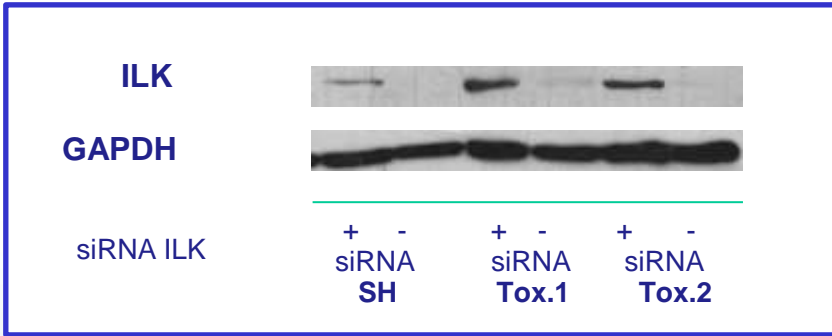
## Capacidad de Reparación del Daño endotelial



# Toxinas Urémicas en Suero Humano:



# Silenciamiento de ILk en la reparación del daño endotelial:



	Toxinas Dosis Bajas		Toxinas Dosis Altas	
C +SC	0H	6H	0H	6H
Rnai				

# RESUMEN

	SUERO UREMICO	TOXINAS UREMICAS
ACTIVIDAD ILK	↑ Dosis entre 1%-10%	↑ P-Cresol (1-100µg/ml) ↑ Indoxyl Sulfato (1-100µg/ml)
PROLIFERACION	No cambia	↓ dosis altas y mezcladas
VIABILIDAD	No hay una disminución significativa	↓ dosis altas y mezcladas
ROS	↑ 60% (En 10% S.U.)	↑ 30% en dosis bajas y altas. ¿Mezclas?
APOPTOSIS	No produce	↑ 30-35% en ambas dosis
HERIDA	No se modifica velocidad de cierre	No se modifica velocidad de cierre
<b>HERIDA</b>		Mezcla de toxinas: ↑ velocidad de cierre
		<b>RNAi ILK: REVIERTE</b>



## Conclusiones:

1. *Analizar si el suero urémico o las toxinas urémicas modifican la expresión y/o activación de la proteína ILK en células endoteliales en cultivo y estudiar los mecanismos de señalización celular implicados.*

- No hay dosis ni tiempo dependencia con respecto a la expresión de ILK en SH ni en SU, aunque si en su actividad, aumentando considerablemente el SU respecto al SH, en EA.

- En el caso de el P-Cresol queda demostrado una variación dosis y tiempo dependiente de la actividad de ILK y en el caso de su expresión no hay variación.

Con respecto al Indoxyl Sulfato no hay una variación de la expresión de ILK pero si de su actividad aunque no es dosis ni tiempo dependiente.

- En SH la actividad mostrada por el Indoxyl es mayor que la mostrada por el P-Cresol.

- Observamos un aumento de las ROS no significativo en las toxinas urémicas y mayor con los sueros, sobre todo a dosis altas lo que indicaría una activación de ILK, aunque es necesario seguir explorando esa vía.

- El SH y el Su no producen apoptosis pero si las toxinas urémicas.

2. *Determinar la implicación de la proteína ILK en el efecto del suero urémico o toxinas urémicas sobre el endotelio mediante ensayos in vitro de daño endotelial.*

-Tanto el Sh como el SU producen un cierre de la herida similar a una dosis del 5%.

- La diferencia de cierre de las Toxinas Urémicas con el Sh es apenas significativa.

-Sin embargo cuando probamos las toxinas juntas en Sh si se ven diferencias con respecto al control.

Además al deleccionar ILK conseguimos peor cierre de la herida, revertiendo e efecto visto.

## Trabajo Futuro:

- Aumentar la dosis de Sueros a partir 20% para ver el efecto producido sobre las ROS y Apoptosis.
- Deleccionar ILK con el fin de comprobar una reversión en los mecanismos planteados.
- Observar el efecto en la expresión y actividad de ILK producido por la mezcla de toxinas en el Suero Humano.
- Continuar mejorando el modelo de disfunción endotelial.



[www.uah.es](http://www.uah.es)

## **Avances en investigación renal y vascular: talleres de discusión.**

**CURSO DE VERANO UNIVERSIDAD DE ALCALÁ 2013, 52-01**  
**Directoras: Laura Calleros Basilio y Gemma Olmos Centenera.**

11 y 12 de julio de 2013. Aula 14 Facultad de Farmacia.  
Universidad de Alcalá.

