

CURSO DE VERANO – 2012 – 20847/UAH
“AVANCES EN FISIOLOGÍA RENAL Y VASCULAR”

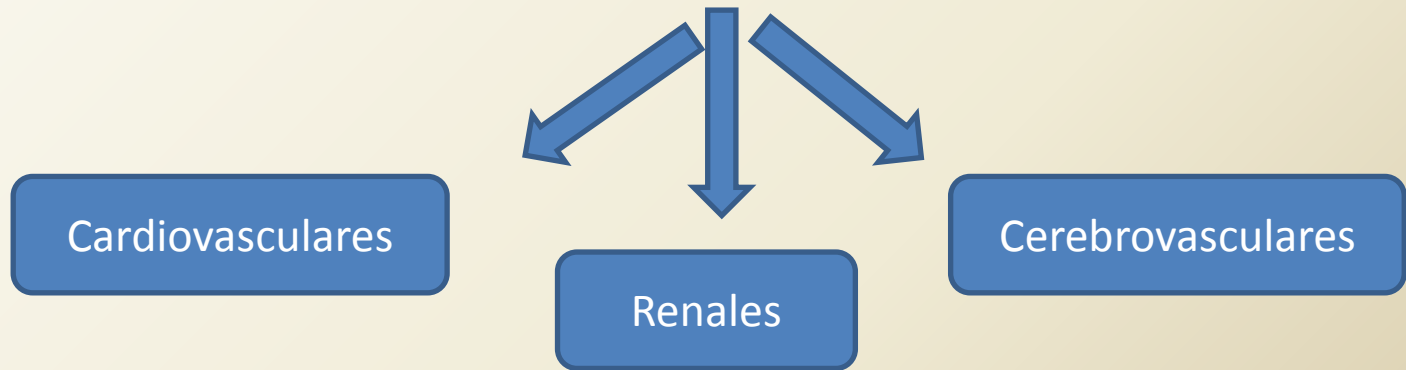
“Papel de los oncogenes en el control de la presión arterial”

RESPONSABLE : Dra Maria Alicia Cortés. Contratado Doctor.
Paloma Martin Sánchez. Becaria
Lourdes Bohorquez Magro. Técnico de laboratorio
Dpto. Fisiología. Universidad de Alcalá

INTRODUCCIÓN

- La Hipertensión Arterial afecta a más del 30 % de la población adulta .

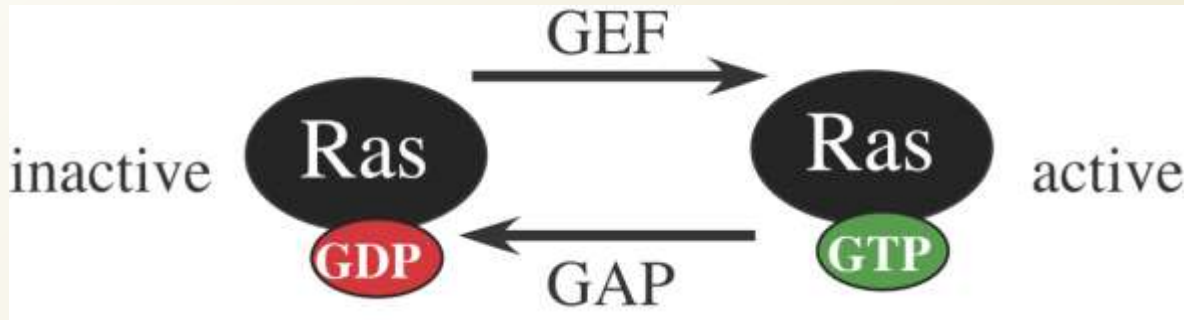
Enfermedad asintomática y fácil de detectar; si no se trata a tiempo → Hipertensión crónica : factor de riesgo para desarrollar enfermedades



- H-Ras está implicada en la modulación de la presión arterial.

Proteínas RAS:

GTPasas de bajo P.M que actúan como interruptores celulares


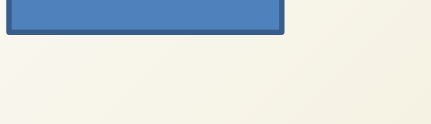




Los genes codificantes de estas proteínas Ras están muy conservados evolutivamente y se expresan en todos los tipos celulares y órganos.



INTRODUCCIÓN

Se han descrito 4 *isoformas*:

- **H-Ras**  **Knock-out viable**
- **N-Ras** 
- **K-Ras 4A**  **Knock-out letal**
- **K-Ras 4B** 

H-ras : en cerebro, músculo y piel

N-ras: en testículos y timo

K-ras: estómago, pulmón y timo.

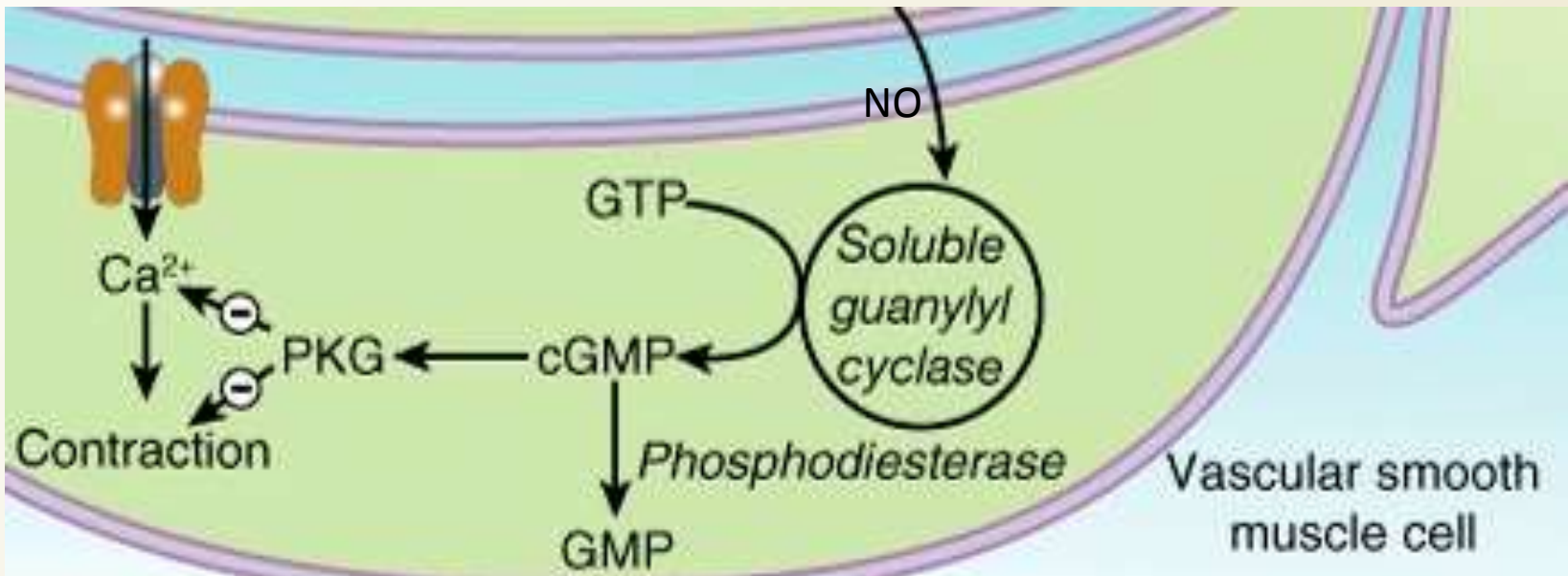
INTRODUCCIÓN

Sobreexpresión de Oxido Nítrico Sintasa Endotelial y proteínas intracelulares implicadas en la respuesta celular al óxido nítrico: GCs y PKG.



Ratones H-Ras $-/-$ son hipotensos

VIA DEL NO/GCs/PKG



PKG → inhibe contracción muscular → hipotensión

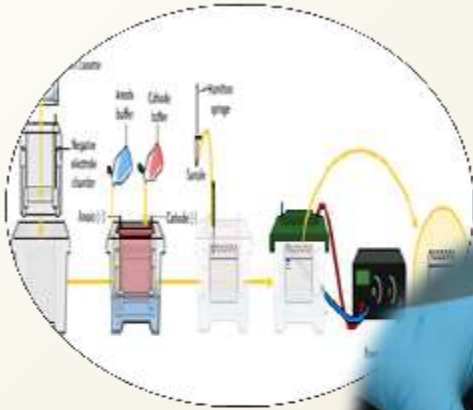
OBJETIVOS

- 1. Analizar los mecanismos responsables de la sobreexpresión de GCs / PKG tras la delección de Hras.
- 2. Evaluar el papel de la delección de Hras en:
 - Fracaso renal agudo inducido por aminoglucósidos.
 - Hipertensión arterial inducida por angiotensina II.
 - Hipertensión pulmonar inducida por hipoxia.

OBJETIVOS

- 1. Analizar los mecanismos responsables de la sobreexpresión de GCs / PKG tras la delección de Hras.

MATERIALES Y MÉTODOS



WESTERN BLOT

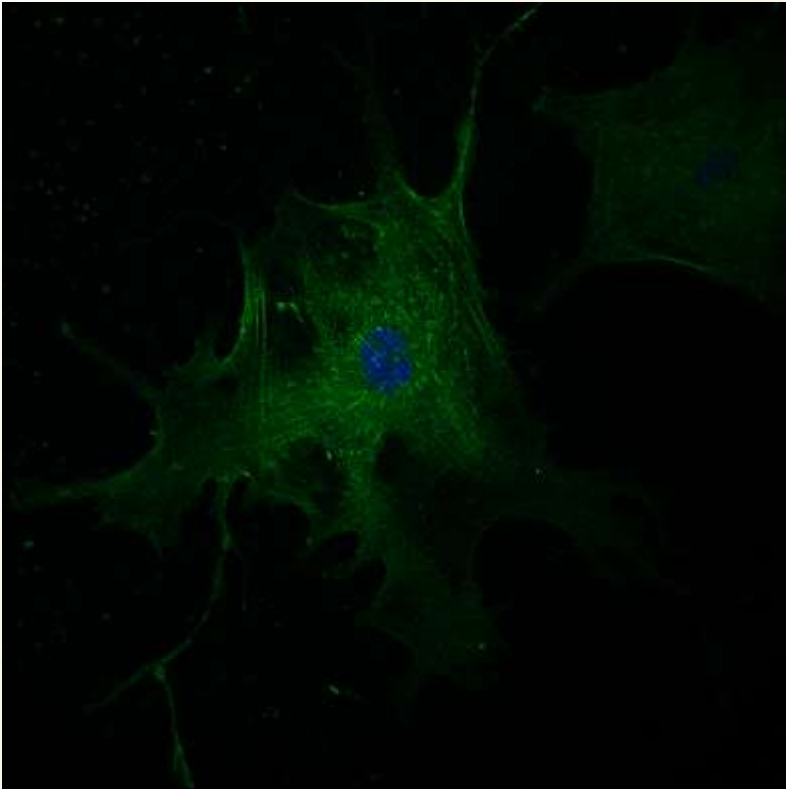
TRANSFECCIÓN DE siRNA



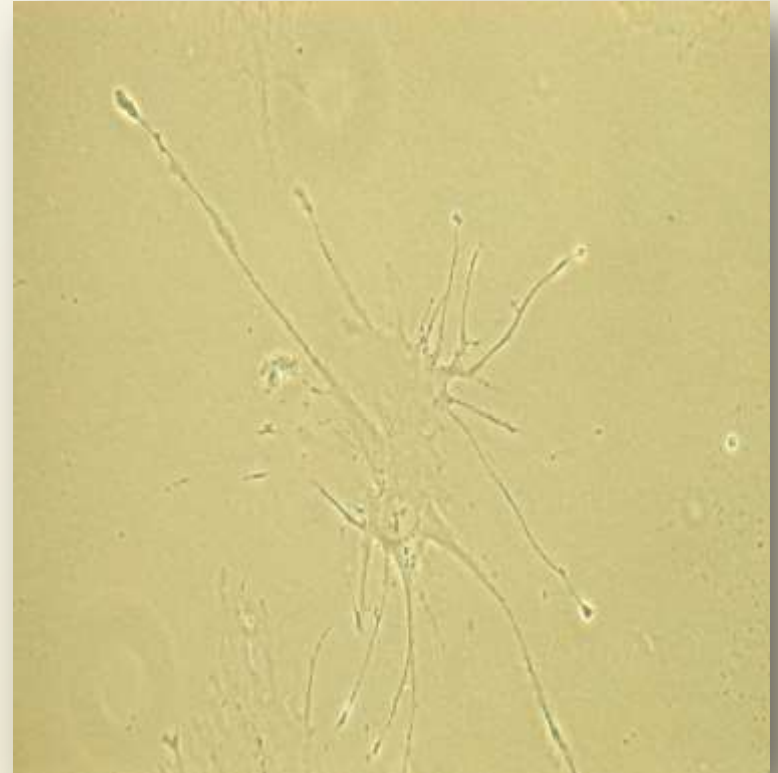
INMUNOFLORESCENCIA



CÉLULAS CRL-1999



CONFOCAL

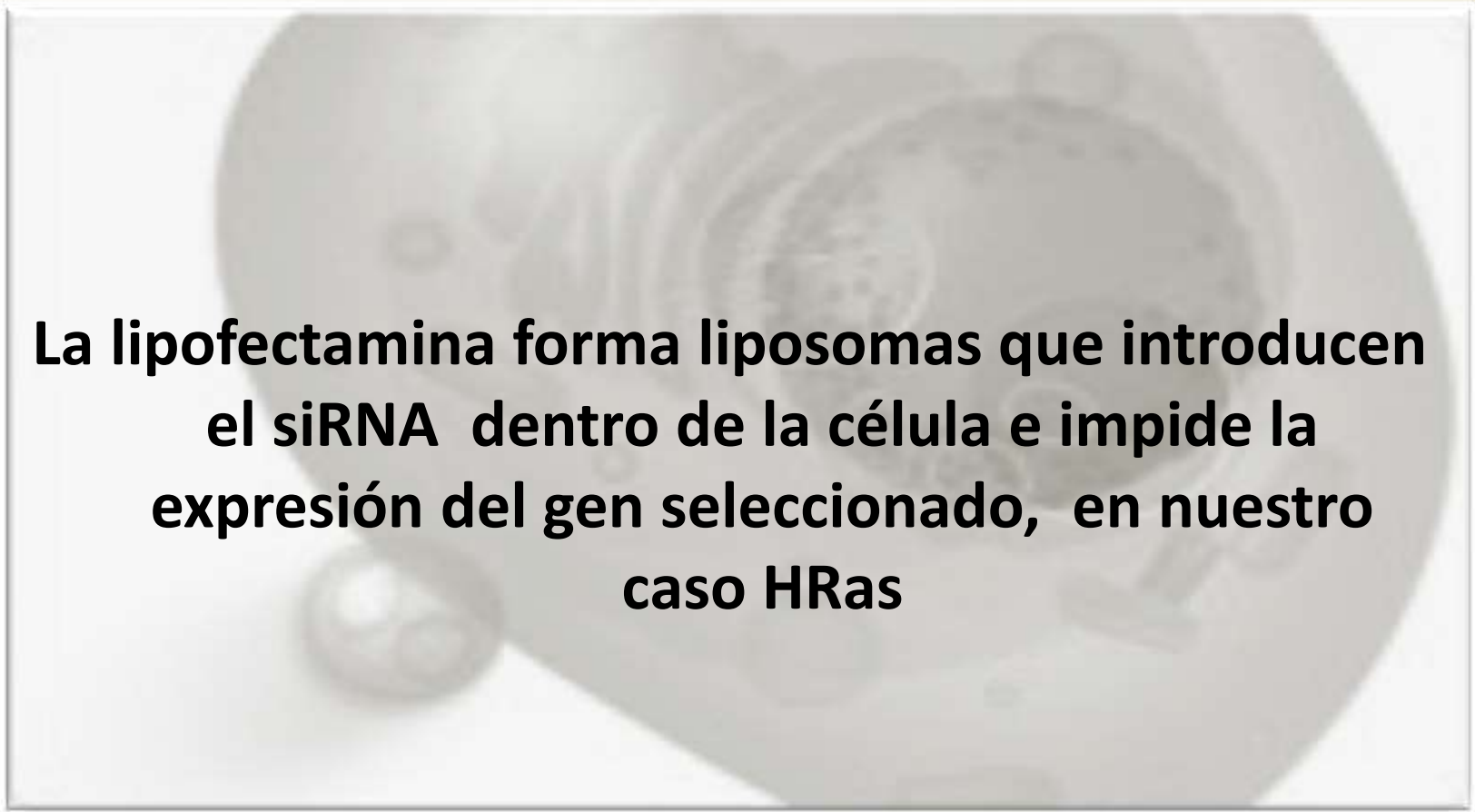


MICROSCOPIO INVERTIDO

DESCRIPCIÓN CRL-1999

- Son células humanas de músculo liso de aorta
- Crecen adheridas y tienen un crecimiento lento
- Su medio de cultivo es F-12 y necesita como suplementos:
 - Ácido ascórbico
 - Insulina
 - Transferrina
 - Selenito de sodio
 - Suplemento de crecimiento endotelial
 - HEPES
 - TES
 - Suero Fetal Bovino

TRANSFECCIÓN DE siRNA CON LIPOFECTAMINA

A grayscale microscopic image of cells, likely fibroblasts, showing their characteristic spindle shape and some internal organelles. The image is semi-transparent and serves as a background for the text.

La lipofectamina forma liposomas que introducen el siRNA dentro de la célula e impide la expresión del gen seleccionado, en nuestro caso HRas

DISEÑO EXPERIMENTAL



SEMBRAMOS LAS CÉLULAS EN P35
Y DEJAMOS CRECER HASTA UN 80%
DE CONFLUENCIA

CONDICIONES DE TRANFECCIÓN:

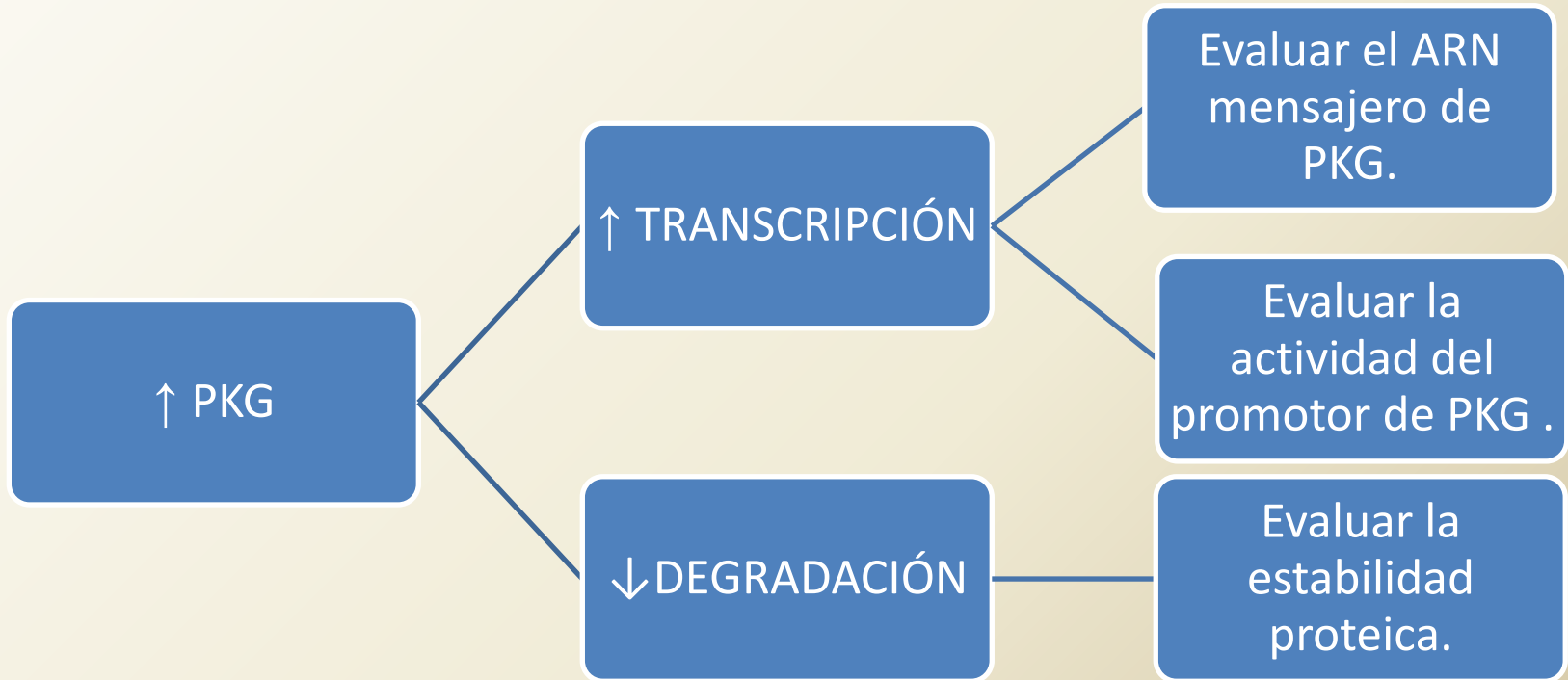
-10 μ l DE LIPOFECTAMINA POR
PLACA.

-Ausencia de FBS y ATB.



DISCUSIÓN

- En base a los resultados de estos experimentos tendremos que ver a que es debido el aumento de PKG



OBJETIVOS

- 2. Evaluar el papel de la delección de Hras en:
 - Fracaso renal agudo inducido por aminoglucósidos.
 - Hipertensión arterial inducida por angiotensina II.
 - Hipertensión pulmonar inducida por hipoxia.

Ratones cepa 129 svj

- El conjunto de sublíneas de 129 se trata del origen de la mayoría de las líneas de células embrionarias (ES cells) empleadas en la construcción de ratones knock-out.



Delección del gen Hras en la cepa 129 svj

- Ratones deleccionados en Hras (Hras -/-) cedidos por el Dr. Eugenio Santos del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca.
- Recuperación de la cepa: fueron cruzados con ratones Hras +/+ para obtener crías H-ras +/- y H-ras -/-

GENOTIPADO

- Se genotipó cada camada obtenida para hacer nuevos cruces y con ello aumentar la población de ratones Hras -/-.

MATERIALES Y METODOS

- Aislamiento de ADN de la cola de ratón mediante la técnica de fenol/cloroformo y etanol.
- Amplificación mediante PCR.
- Electroforesis en gel de agarosa o de acrilamida.

OBJETIVOS

- 2. Evaluar el papel de la delección de Hras en:
 - Fracaso renal agudo inducido por aminoglucósidos.
 - Hipertensión arterial inducida por angiotensina II.
 - Hipertensión pulmonar inducida por hipoxia.

MATERIALES Y METODOS

GENTAMICINA

- Antibiótico aminoglucósido de amplio espectro.
- Indicada en infecciones abdominales, de piel y tejidos blandos, gastrointestinales, biliares, genitourinarias, óseas, infecciones en quemaduras y en otras infecciones como meningitis, septicemia, peritonitis, neumonía....

MATERIALES Y METODOS

- **Interacciones**

- Riesgo de nefrotoxicidad. (1 de cada 10 pacientes)

- **Reacciones adversas**

- Elevaciones de la creatinina en sangre.

- Presencia en la orina de albúmina, cilindros, leucocitos o eritrocitos, exceso de compuestos nitrogenados en sangre (azotemia).

- Disminución en la cantidad de orina (oliguria).

DISCUSIÓN

- La gentamicina provoca un aumento notable de los valores de creatinina. Sin embargo, no hay diferencias entre los ratones Hras +/+ y los Hras -/-.

¡¡Gracias!!

