

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

La matriz extracelular como regulador esencial en la función renal.

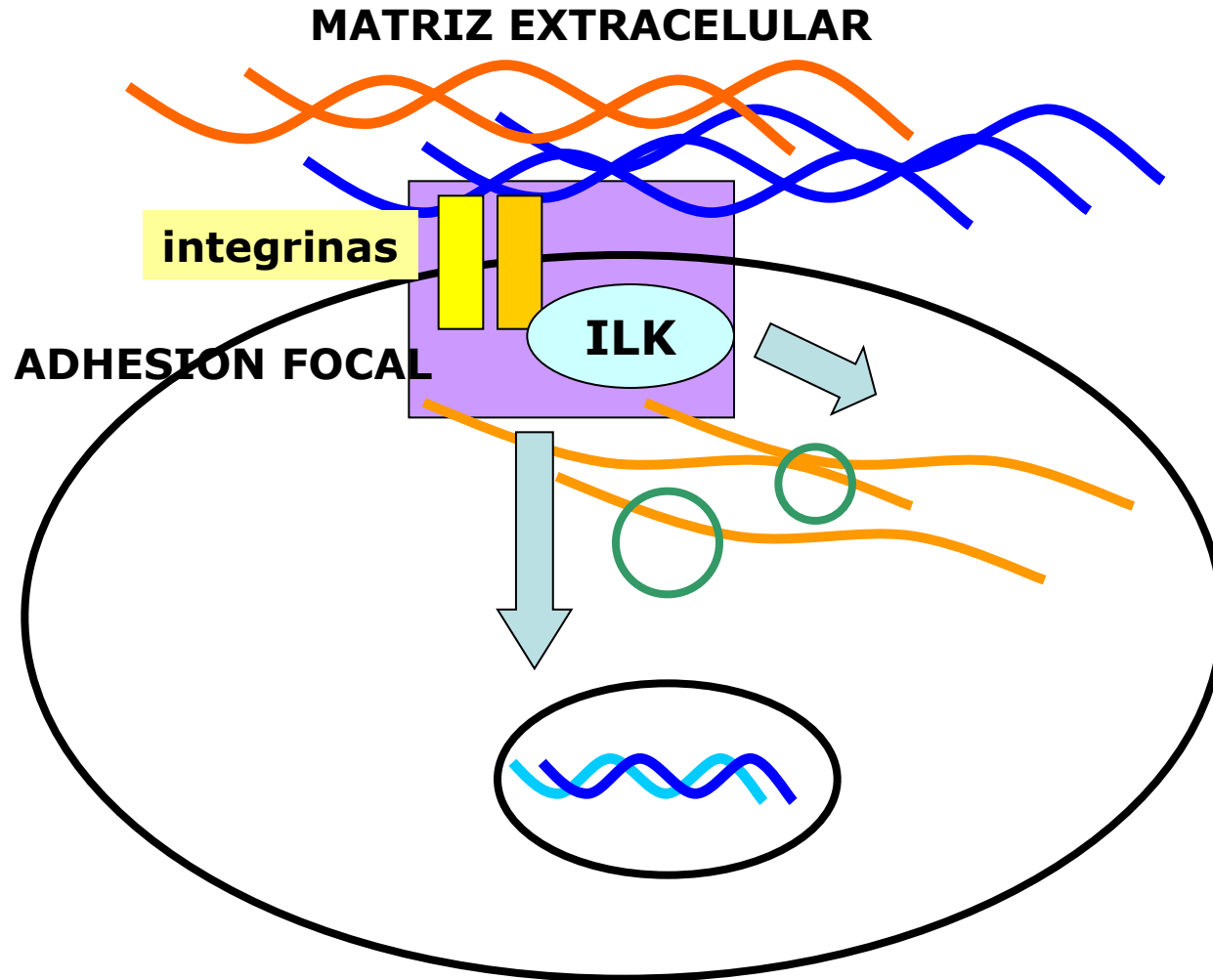
**RESPONSABLE : Dr. Sergio de Frutos. Contratado Doctor.
Jose Luis Cano. Becario MEC
Mercedes Griera. Técnico de Laboratorio
Departamento Fisiología, Universidad de Alcalá**

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

La matriz extracelular, la Kinasa Ligada a Integrinas (ILK) y la función renal

Dr. Sergio de Frutos. Contratado Doctor.

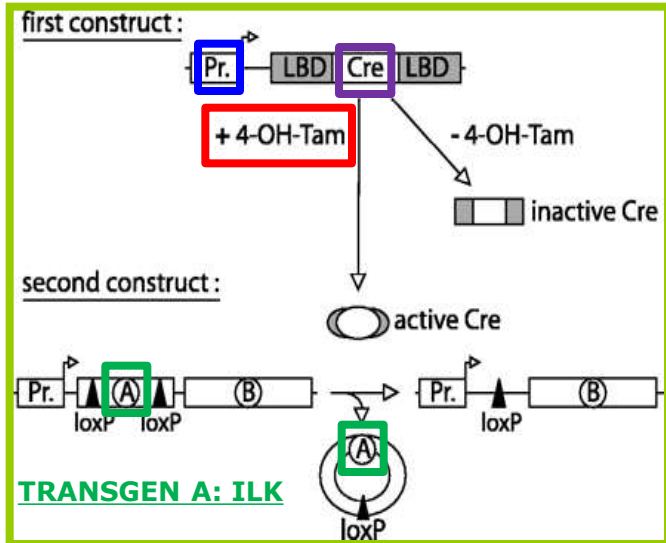
ADHESION FOCAL, INTEGRINAS E ILK. LA COMUNICACION ENTRE LA CELULA Y SU ENTORNO



MODELO ANIMAL CRE-LOX DE DELECIÓN CONDICIONAL DE ILK

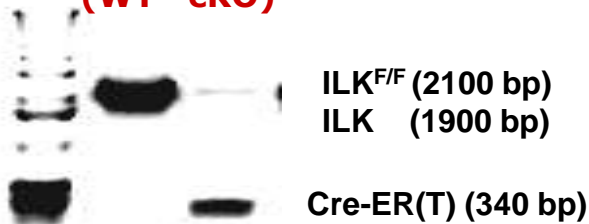
vehículo

amoxifeno



CRE-LOX

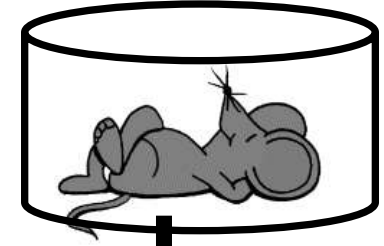
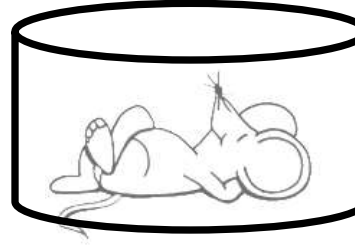
VH TX
(WT cKO)



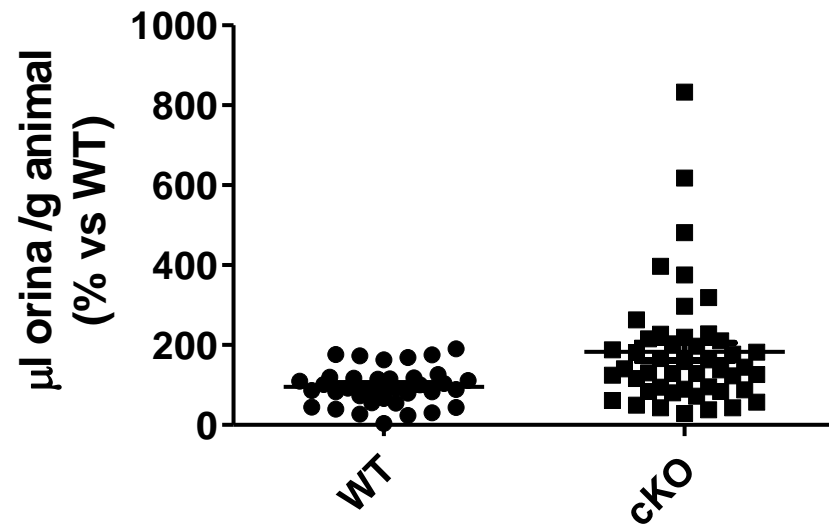
JAULA METABOLICA

WT

cKO-ILK



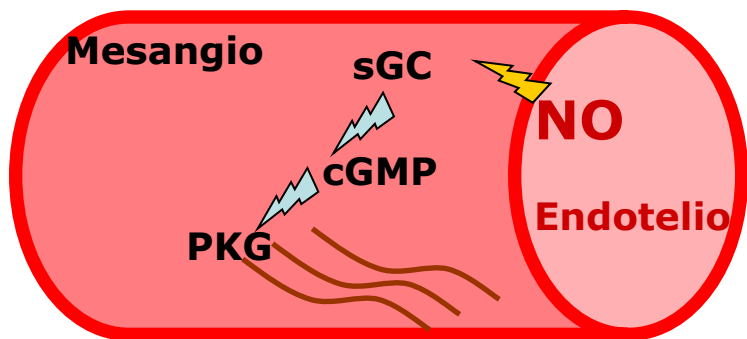
ORINA



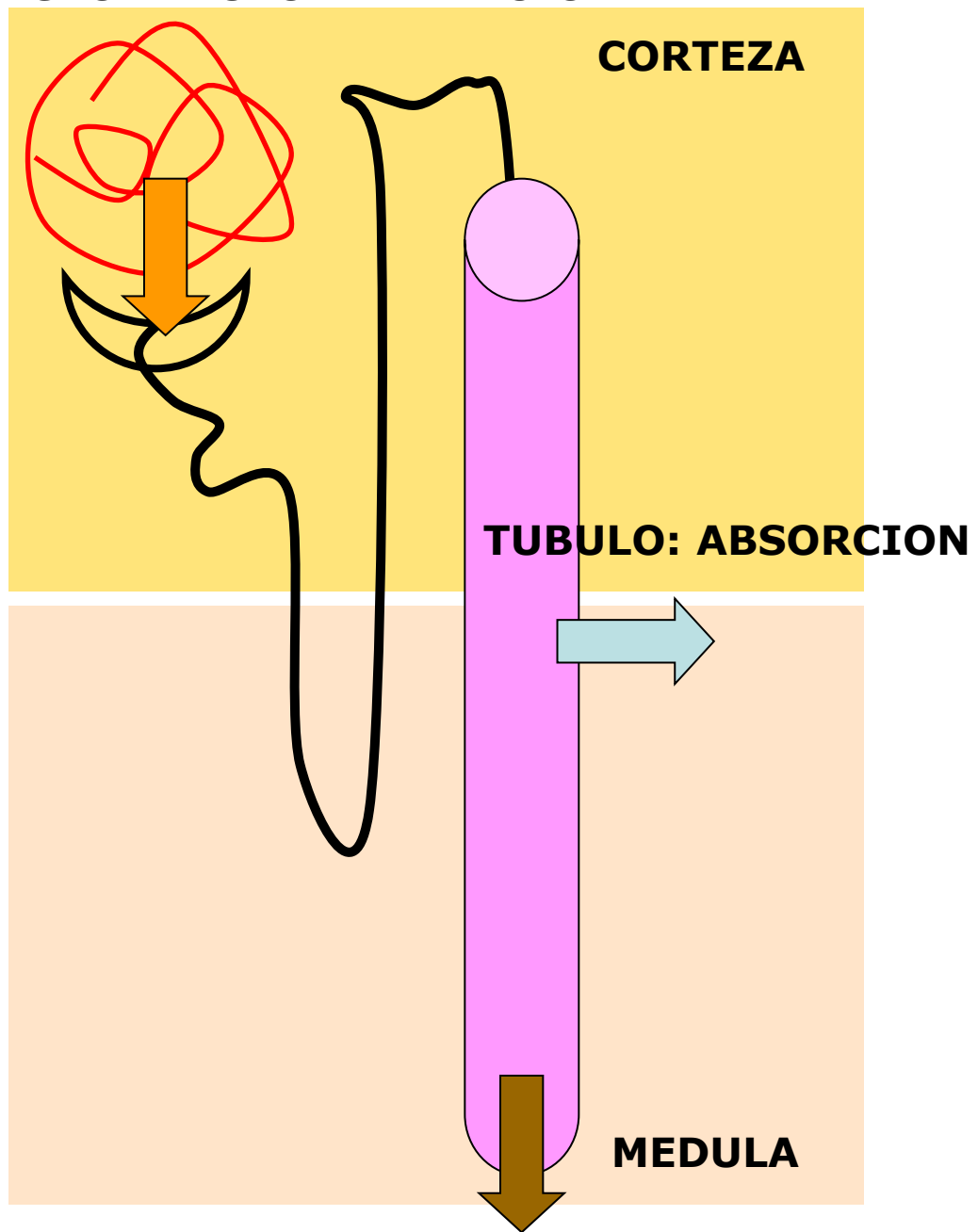
FISIOLOGIA RENAL



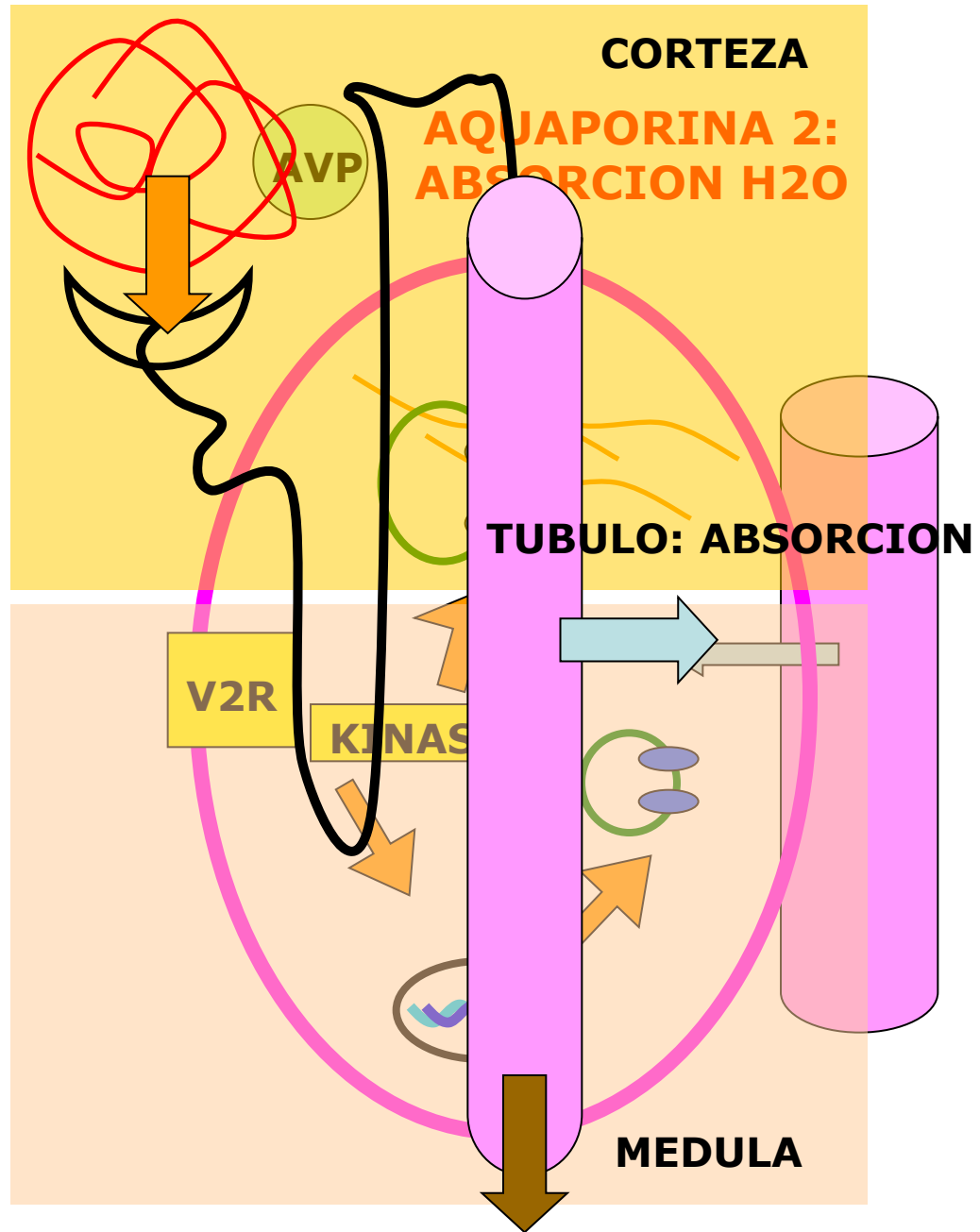
VASODILATACION: eje NO/GMPc



GLOMERULO: FILTRACION

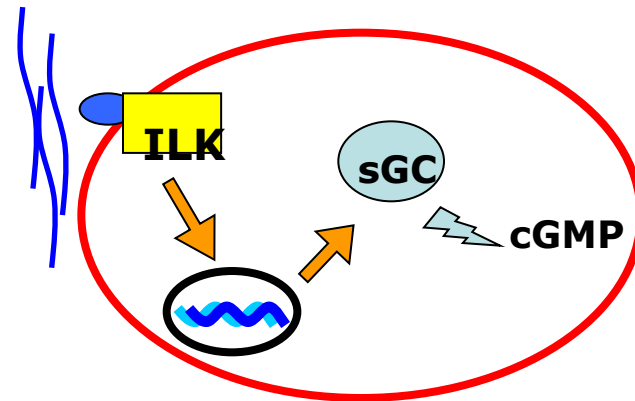


GLOMERULO: FILTRACION

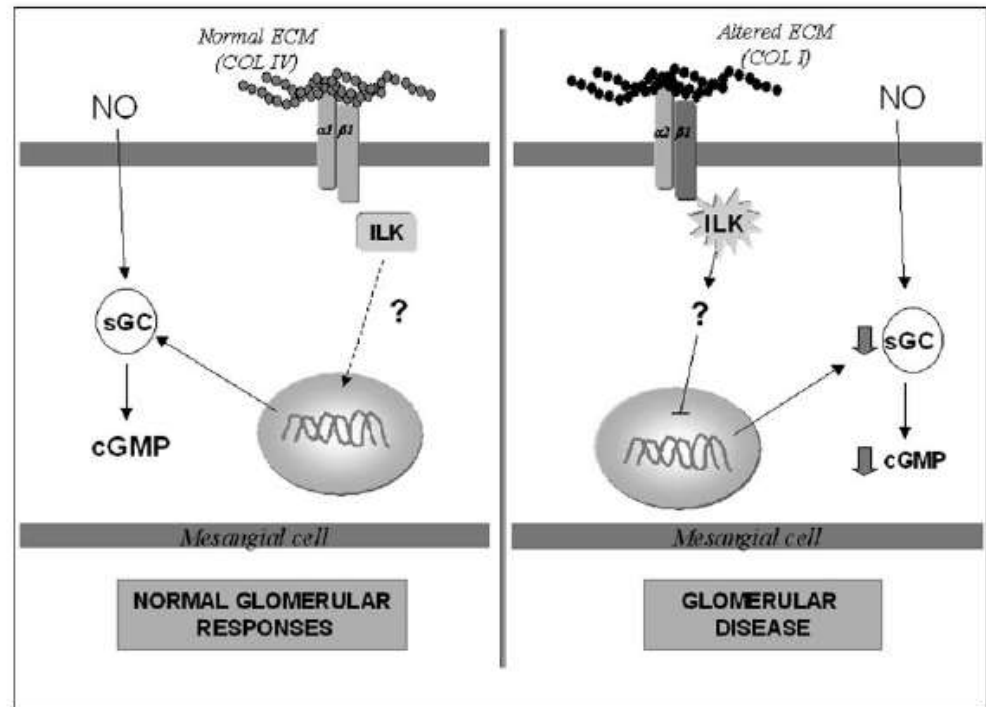
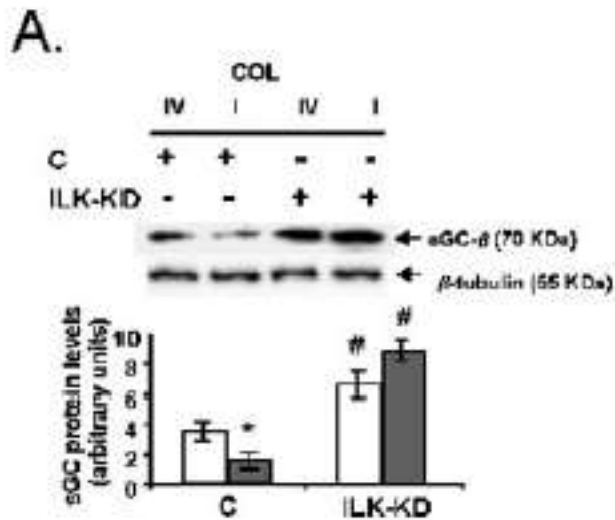


Cómo afecta ILK al eje NO/GMPc a nivel renal

Ortega-Velazquez R et al. AJP 2004 and FASEB J 2003

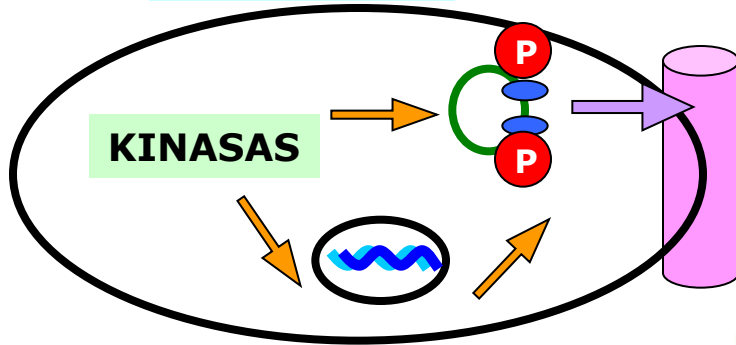


De Frutos S et al. J Am Soc Nephrol. 2005



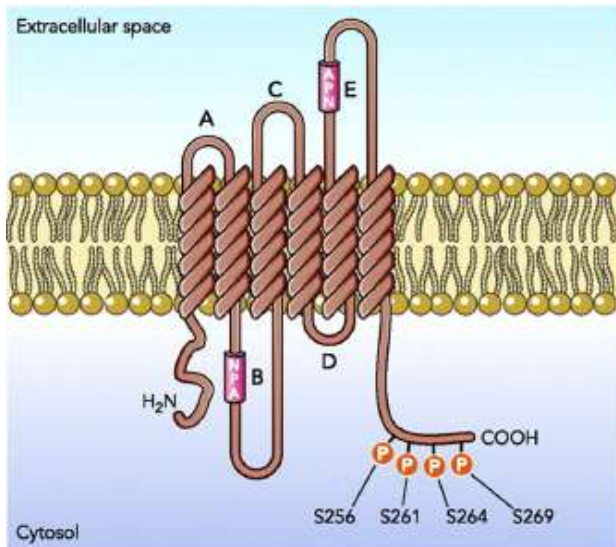
Las KINASAS que regulan AQP2

TRAFICO

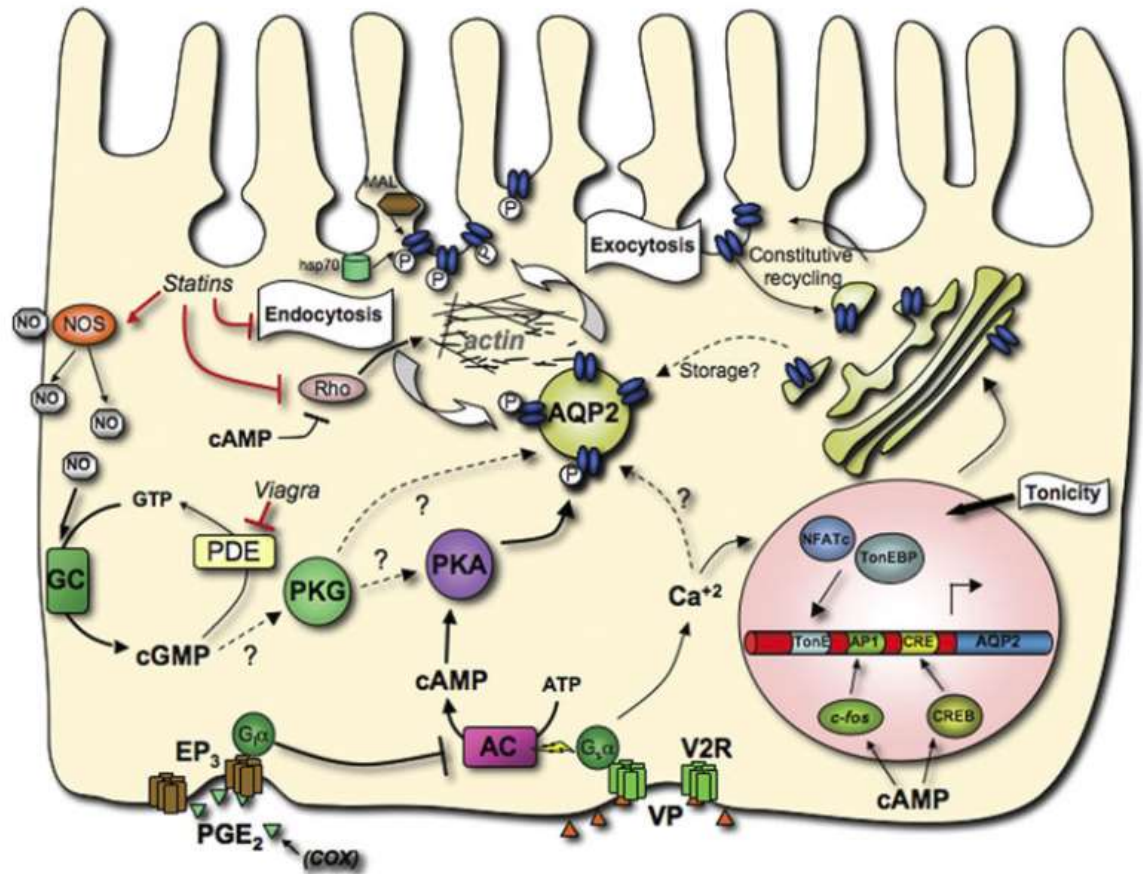


EXPRESION

Moeller HB et al. AJP 2011

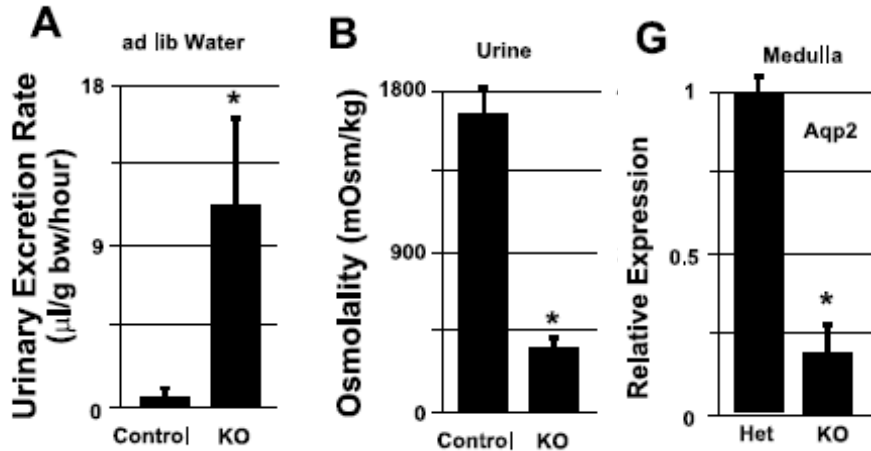


Bouley R et al. Semin Nephrol. 2008

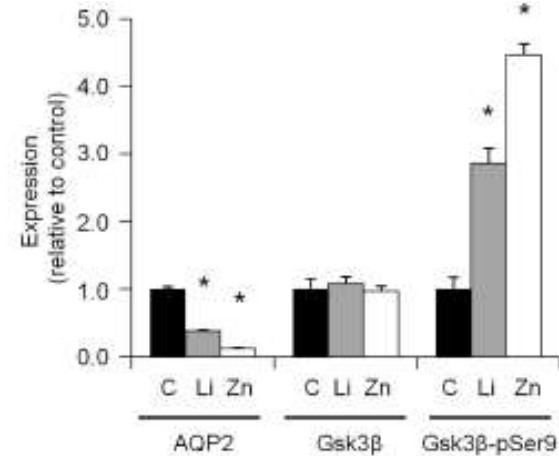


Cómo afectaría integrinas/ILK la AQP2?

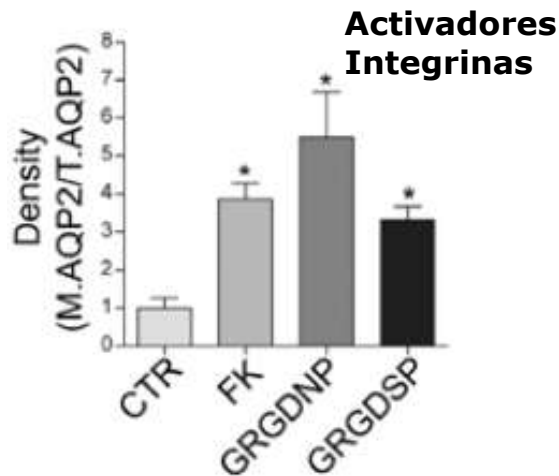
**Integrina beta1 KO DISMINUYE
Expresión AQP2 (Wu, AJP 2009)**



**En NDI, GSK (substrato ILK)
DISMINUYE Expresión AQP2
(Kortenoeven, AJP 2012)**

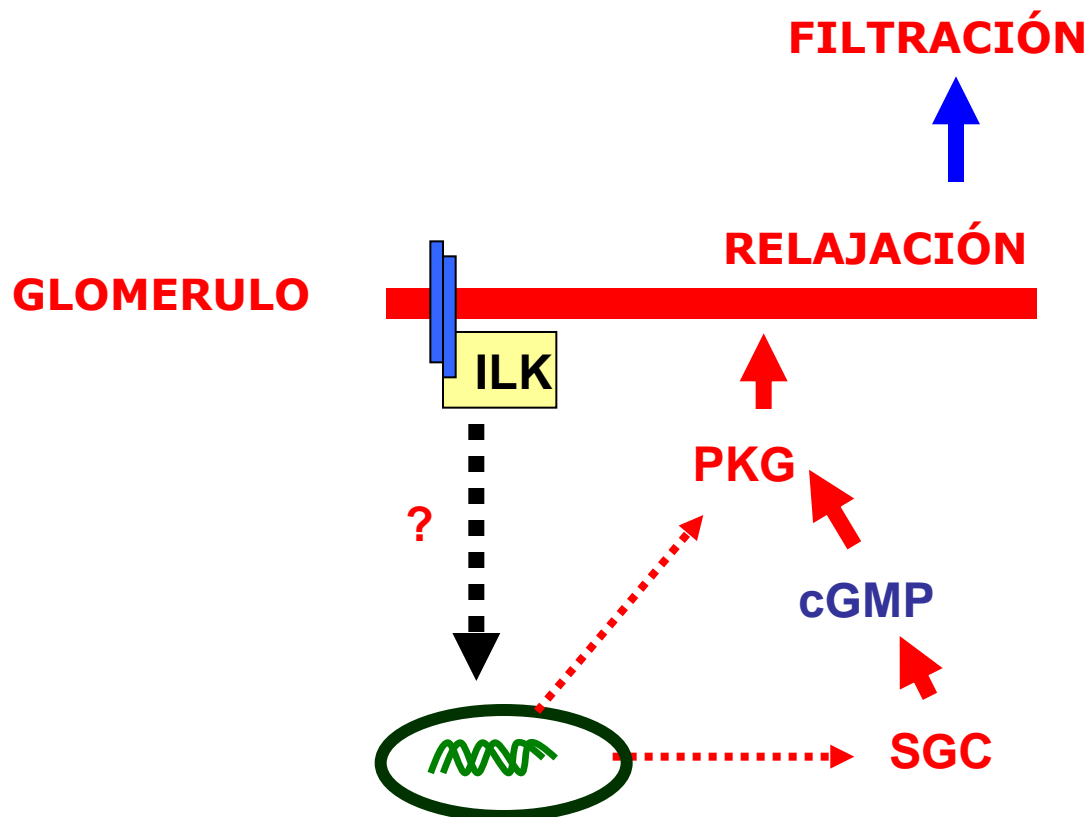


**Integrinas REGULA TRAFICO AQP2
(Tamma CPB 2011)**



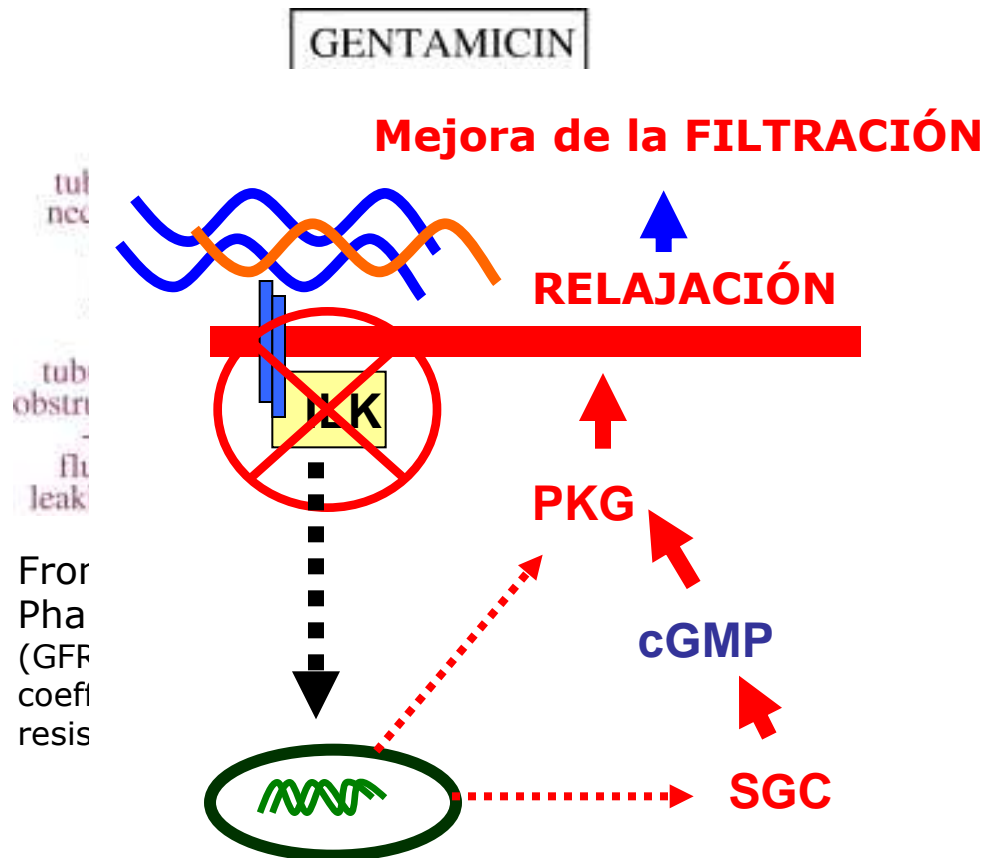
HIPOTESIS: ILK REGULA LA FUNCION RENAL A TRAVES DE LA REGULACION DEL EJE DE NO/GMPc Y DE AQP2

OBJETIVO I: EN UN MODELO DE DELECCION DE ILK ANIMAL ESTUDIAR LA REGULACION DE LA FILTRACIÓN GLOMERULAR POR EL EJE DEL NO/GMPc

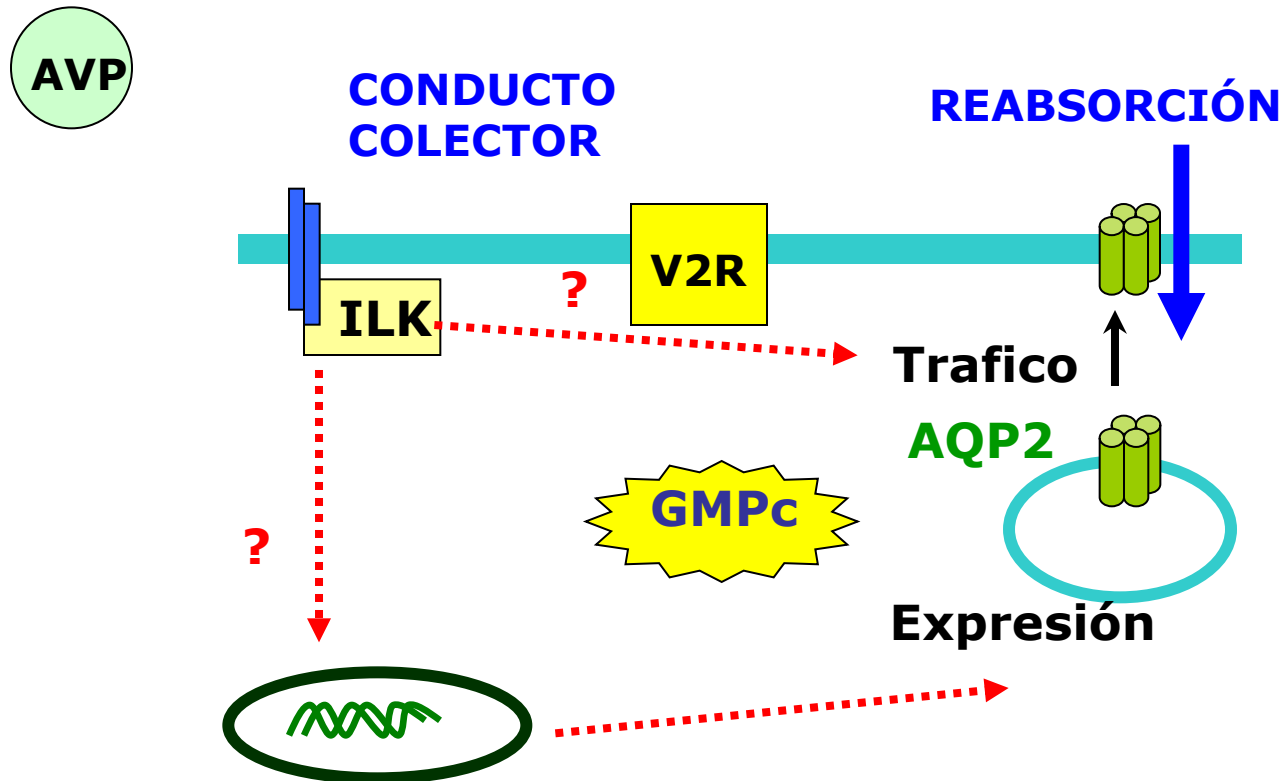


OBJETIVO I: EN UN MODELO DE DELECCION DE ILK ANIMAL ESTUDIAR LA REGULACION DE LA FILTRACIÓN GLOMERULAR POR EL EJE DEL NO/GMPc

GLOMERULO PATOLÓGICO: modelo de gentamicina:



OBJETIVO II: ESTUDIAR LA REGULACION DE LA AQP2 Y LA ABSORCIÓN TUBULAR DEL AGUA EN MODELOS DE DELECCION DE ILK ANIMALES Y CELULARES



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

**ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA
FILTRACIÓN GLOMERULAR POR EL EJE
NO/GMP_c EN cKO-ILK.**

Mercedes Griera. Técnico de Laboratorio

ABORDAJE OBJETIVO I: ESTUDIAR LA REGULACION DE LA FILTRACIÓN GLOMERULAR POR EL EJE NO/GMPc EN CKO-ILK.

JAULA METABOLICA

WT

cKO-ILK

ACTIVAR
VIA NO/GMPc (IDN,
300mg/Kg/24H)



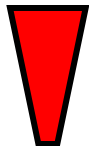
FILTRACION GLOMERULAR

ORINA



VOLUMEN ORINA
CREATININA ORINA

SANGRE

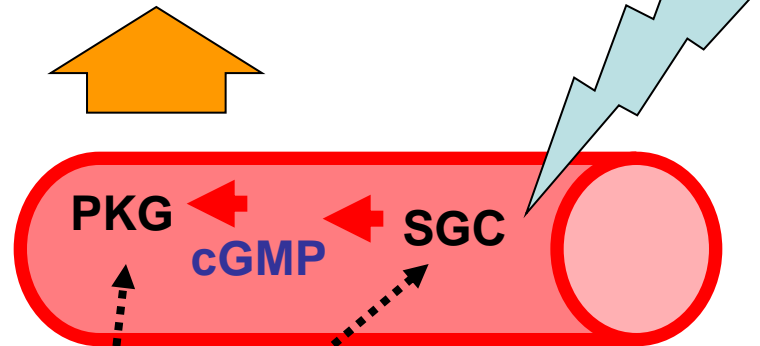


CREATININA PLASMA:
ACLARAMIENTO

RIÑÓN

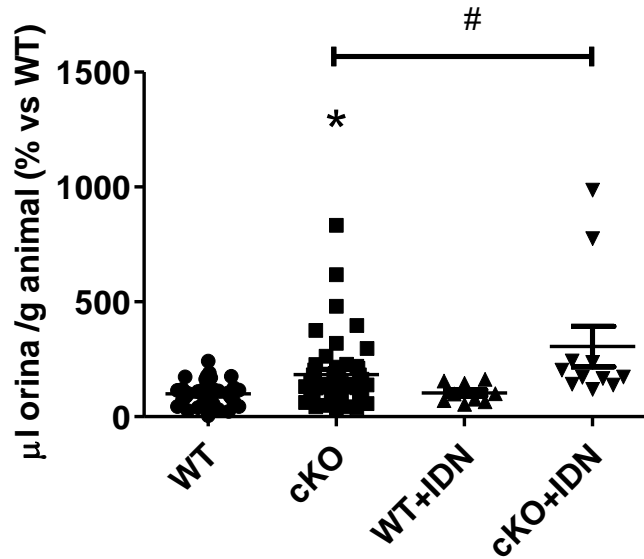
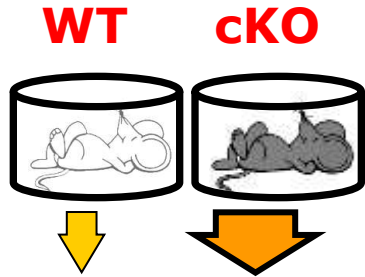


CORTEZA RENAL

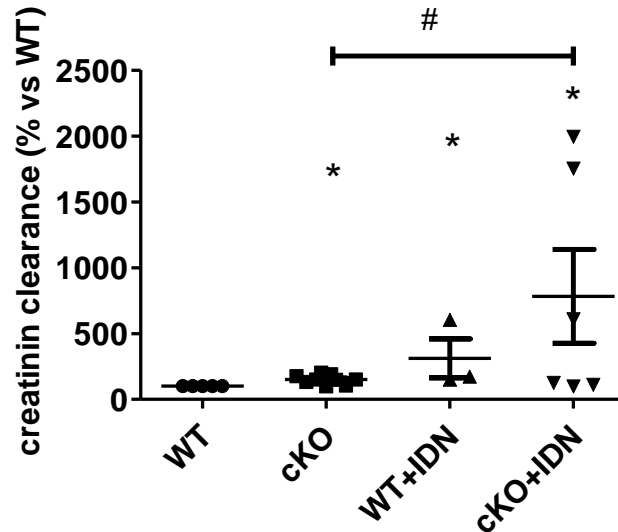


PROTEINAS
mRNA

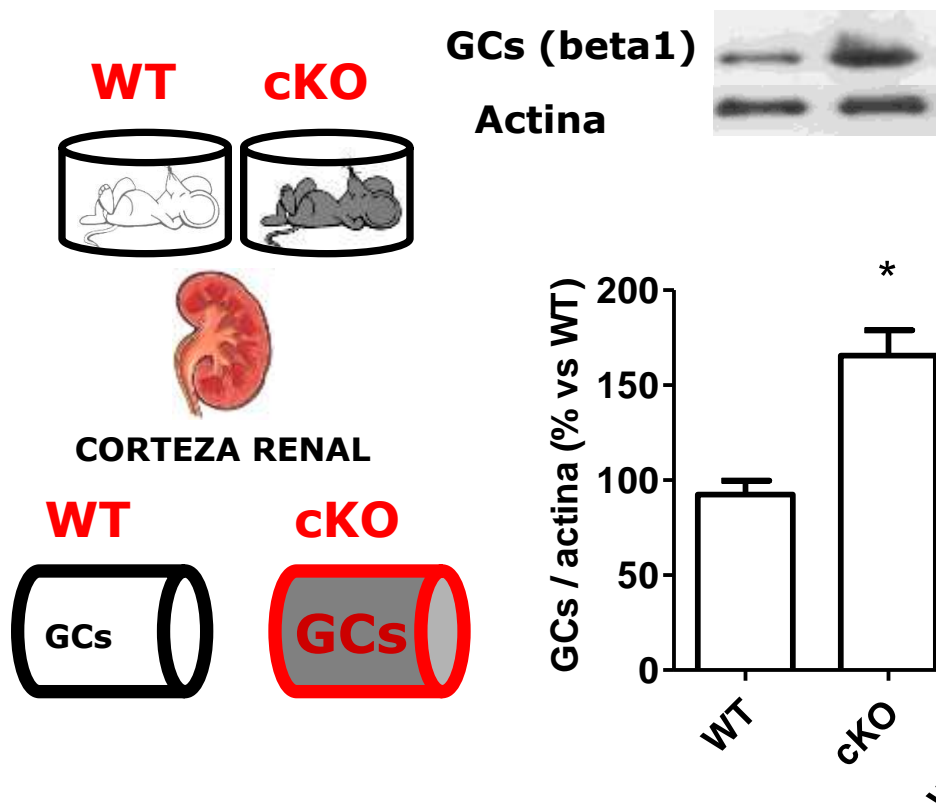
cKO + IDN 24h. Producen sinérgicamente poliuria.



cKO + IDN 24h. El aclaramiento de creatinina aumenta sinérgicamente.

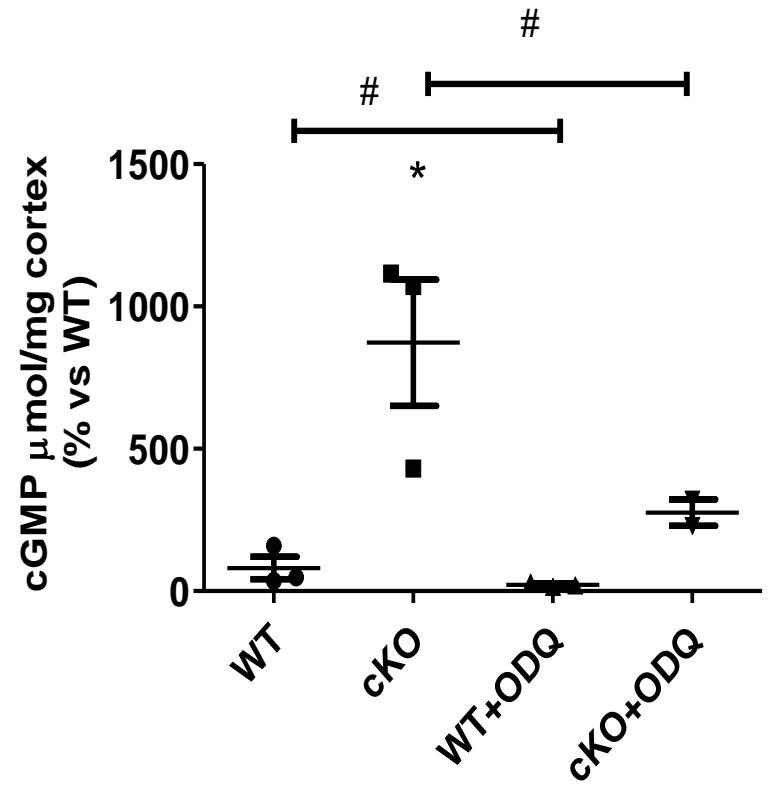
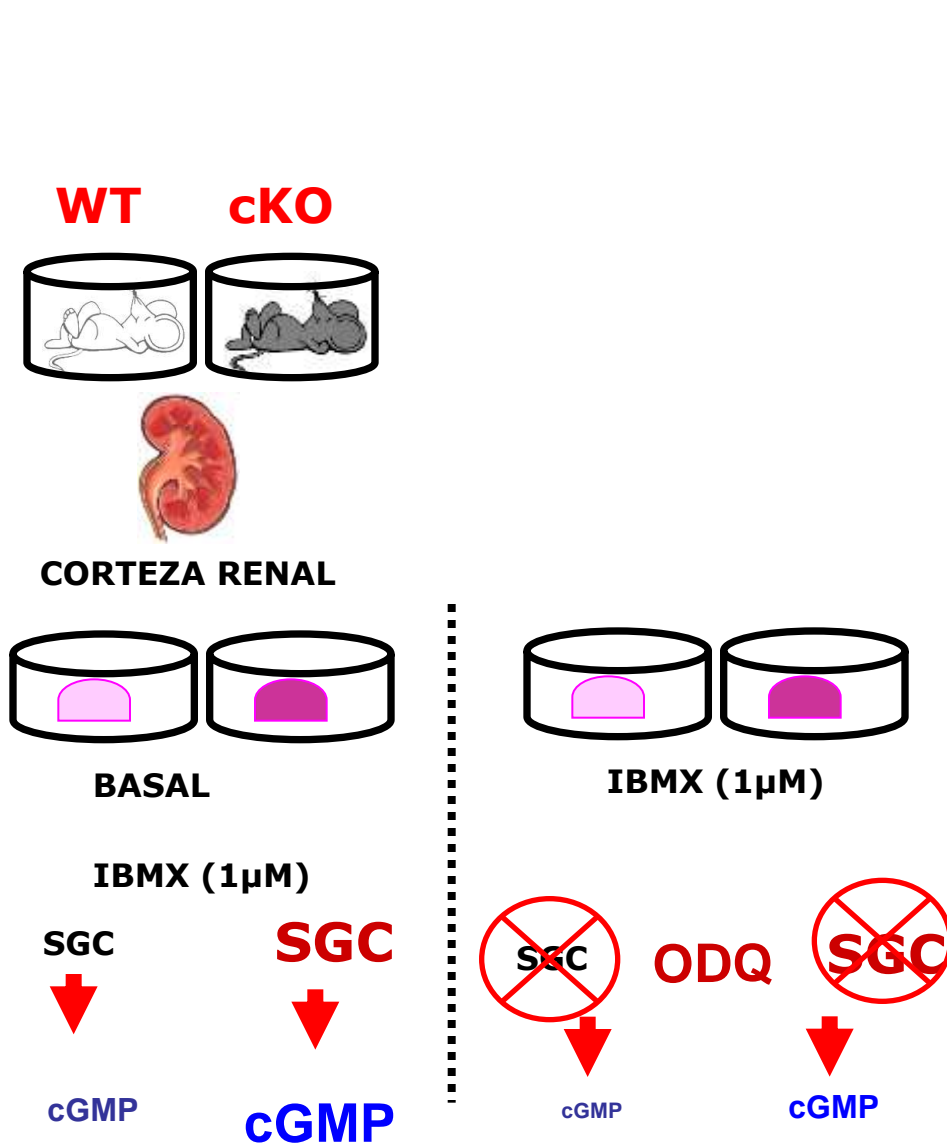


Mayor expresión de GCs en corteza renal de cKO.

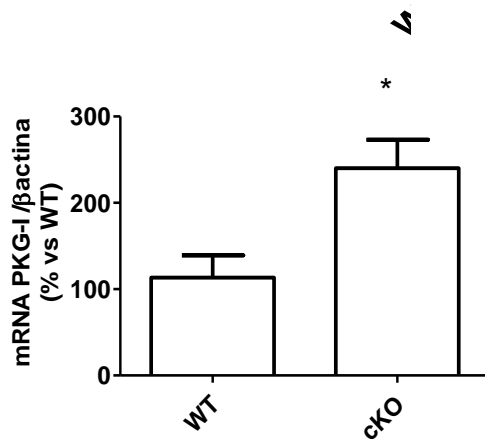
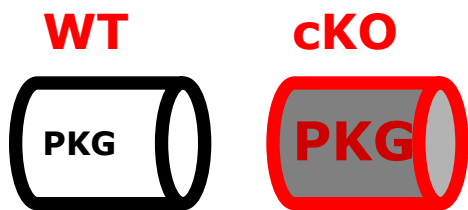
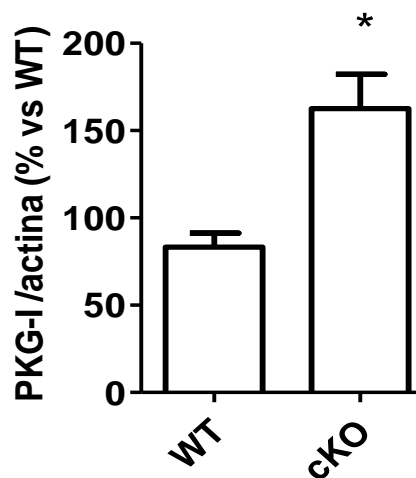
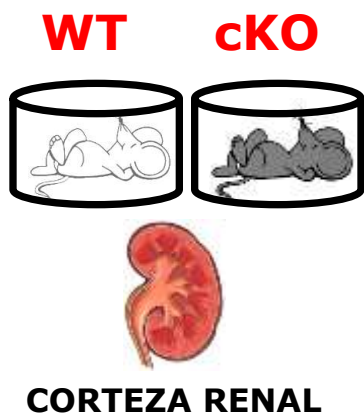
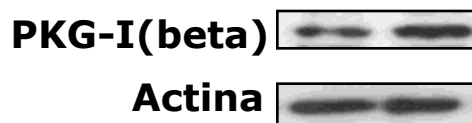


La delección de ILK COMPENSA la tolerancia a donadores de NO.

Actividad de GCs "ex vivo". Niveles de GMPc (EIA). Tratamiento con inhibidor de GCs ODQ (1μM)



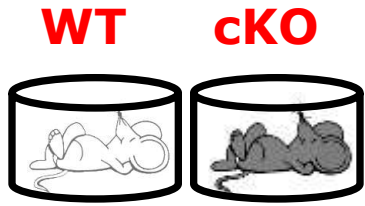
Mayor expresión de PKG en corteza renal de cKO.



La delección de ILK COMPENSA la tolerancia a donadores de NO.

Actividad de PKG "ex vivo". Niveles de fosforilación de VASP.

Tratamiento con activador PKG 8Br-GMPc (10 μ M) e inhibidor PKG DT3 (1 μ M)



CORTEZA RENAL



PKG

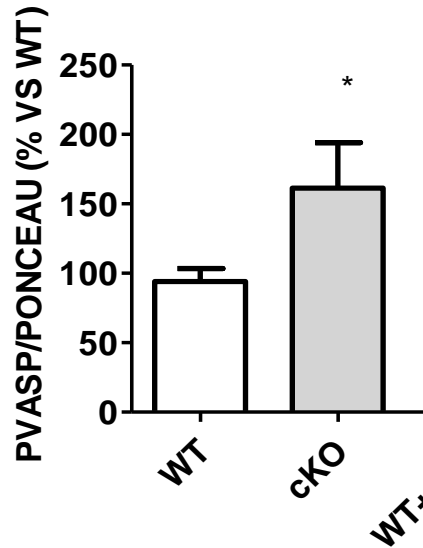


P-VASP

PKG



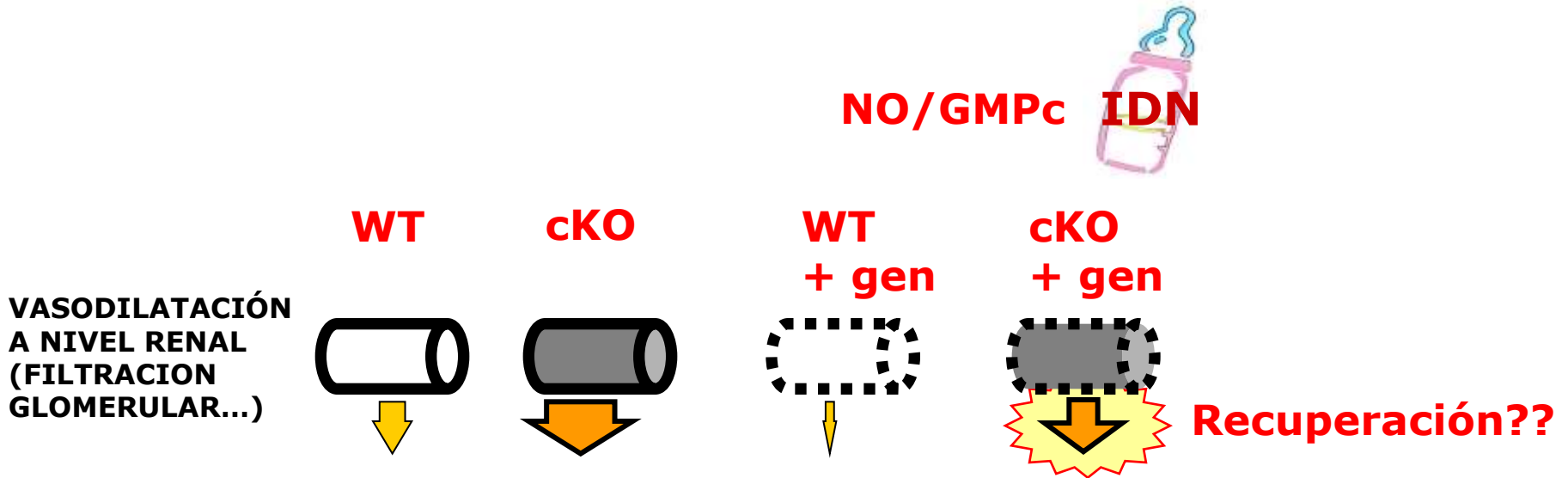
P-VASP



CONCLUSION

A nivel renal, la delección de ILK produce un aumento en la expresión y la actividad de los elementos del eje NO/GMPc, principal mediador de la vasodilatación. Esto se traduce en un aumento en la filtración glomerular.

FUTURO: la recuperación de NO/GMPc al deleccionar ILK será beneficiosa? modelo de daño renal



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

ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA AQP2 Y LA ABSORCIÓN TUBULAR DEL AGUA EN MODELOS DE DELECCION DE ILK ANIMALES Y CELULARES

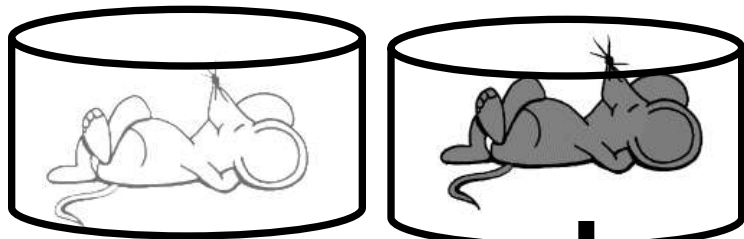
Jose Luis Cano. Becario MEC

ABORDAJE OBJETIVO II: ESTUDIO DE LA REGULACION DE LA AQP2 Y LA ABSORCIÓN TUBULAR DEL AGUA EN MODELOS DE DELECCION DE ILK ANIMALES Y CELULARES.

JAULA METABOLICA

WT

cKO-ILK



ORINA



VOLUMEN ORINA
OSMOLALIDAD

CORTEZA RENAL

RIÑÓN



MEDULA RENAL

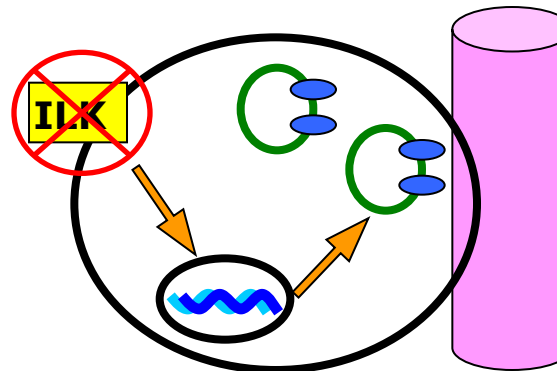
mIMCD3

siRNA-ILK

Control

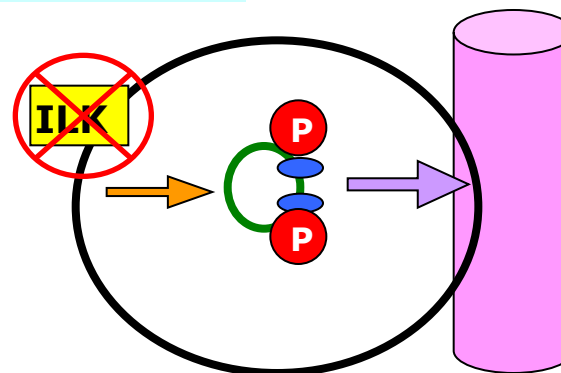


EXPRESION



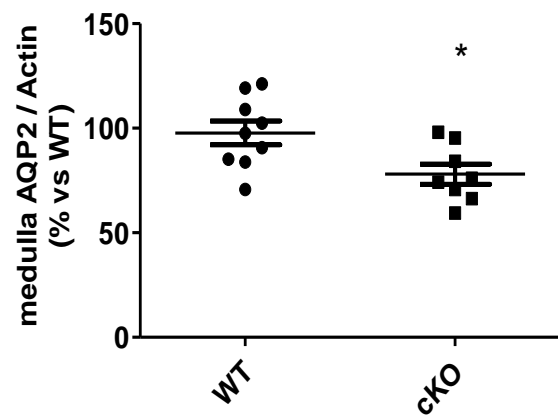
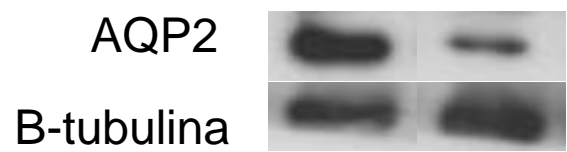
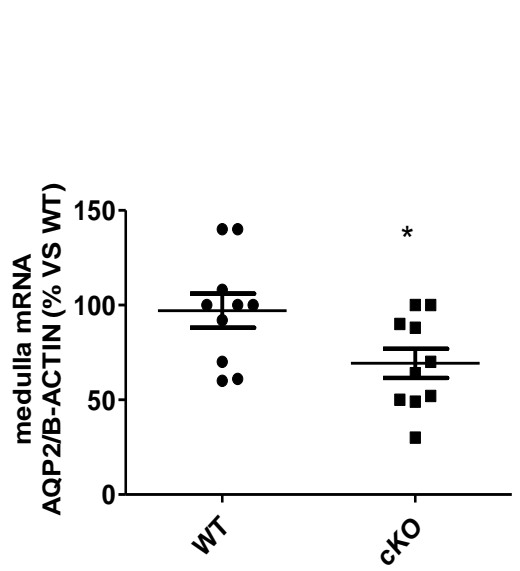
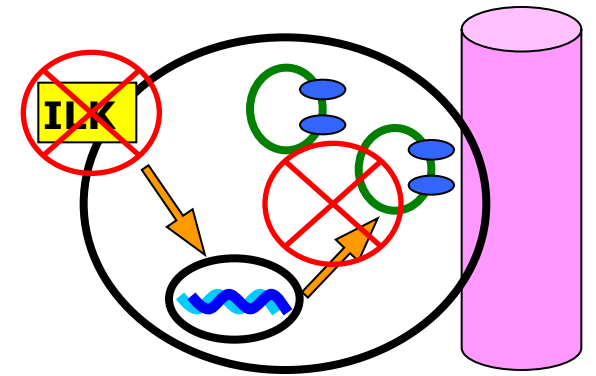
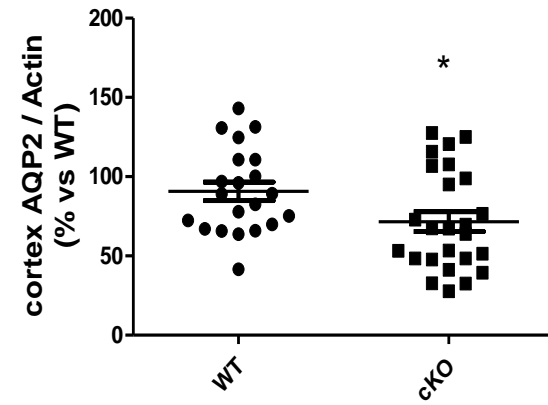
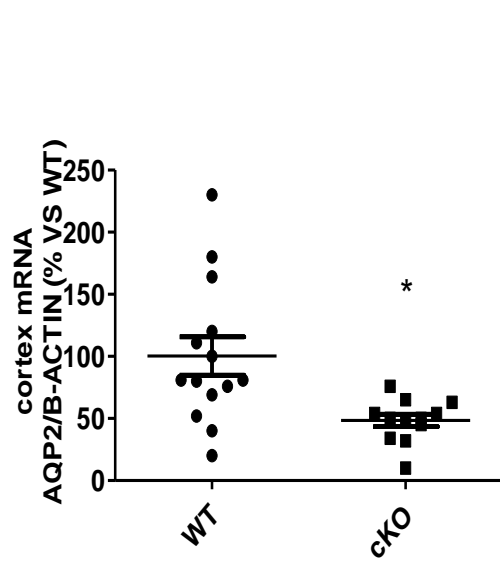
mRNA, proteínas

TRAFICO

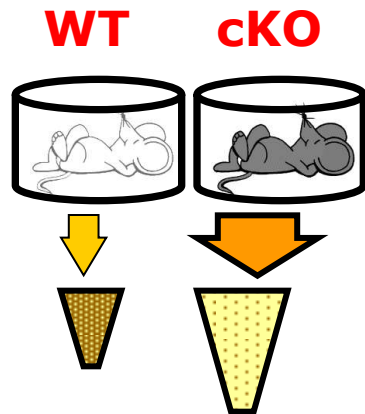


Inmunofluorescencia

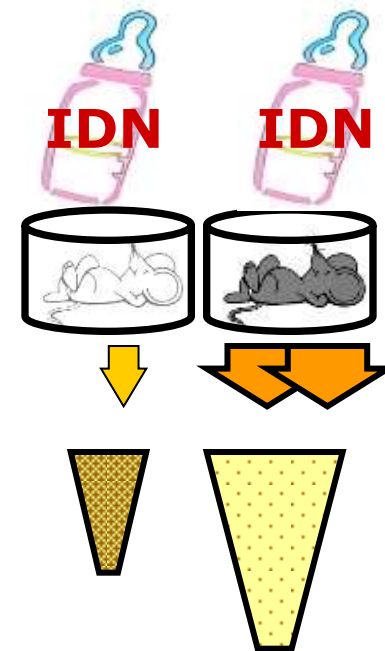
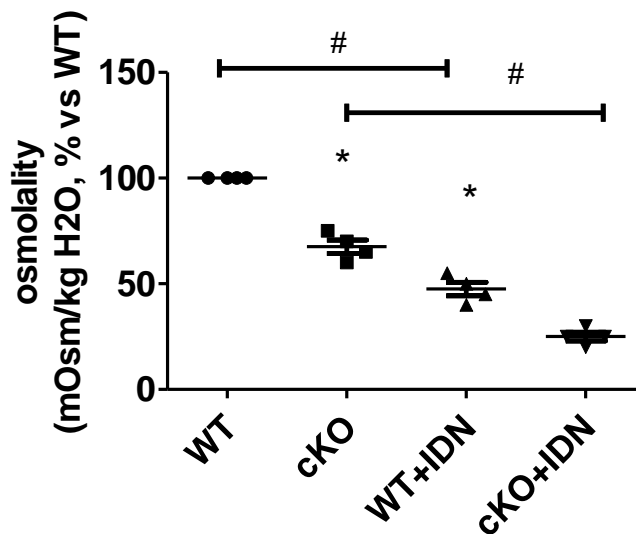
Expresión de AQP2 en corteza y medula es MENOR en cKO



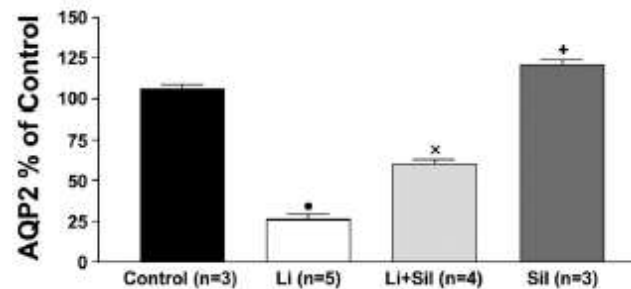
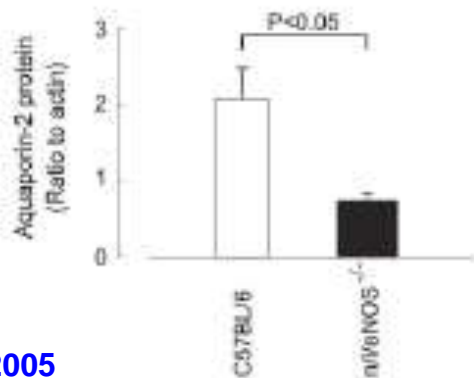
MECANISMOS: PAPEL DE NO/GMPc EN EL CAMBIO DE EXPRESION DE AQP2



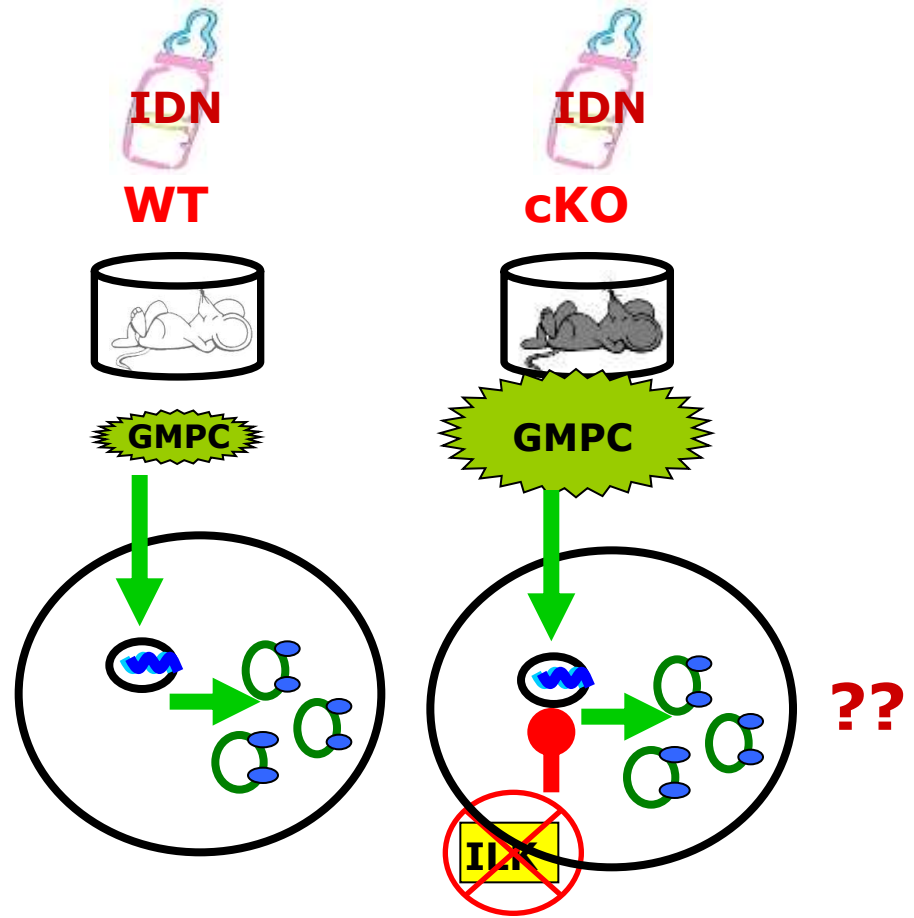
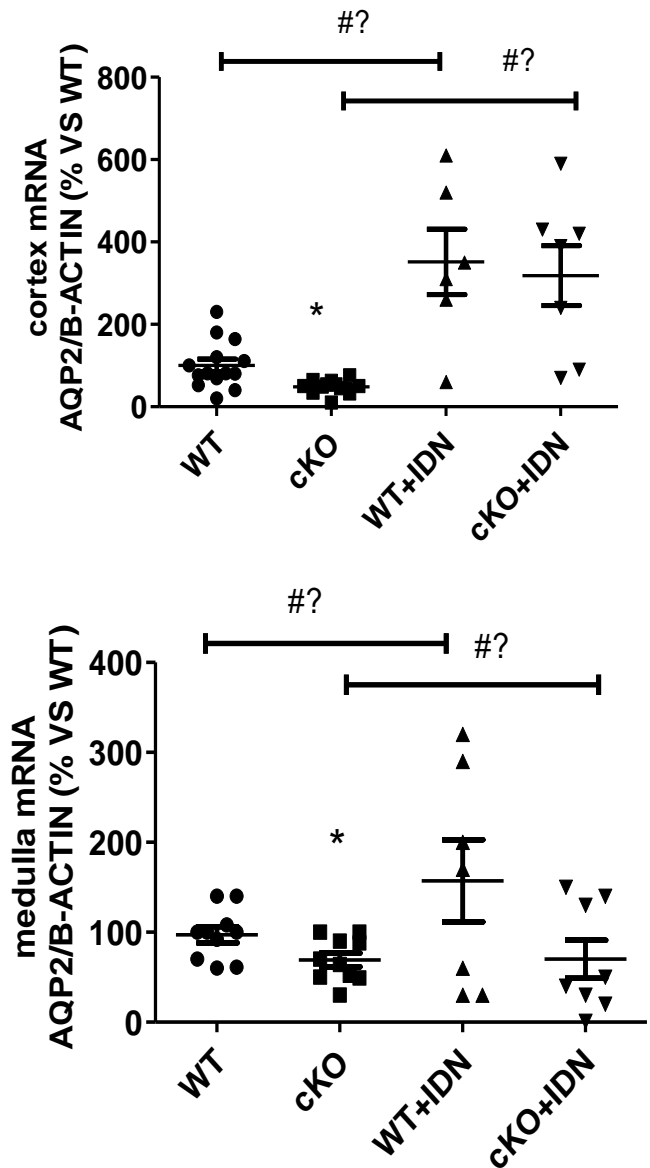
cKO+IDN Disminuye sinérgicamente osmolalidad orina.



Pero....La via de GMPc INCREMENTA la expresion de AQP2

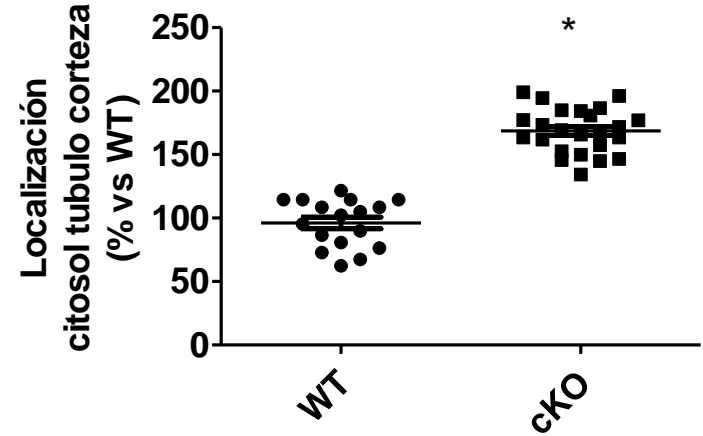
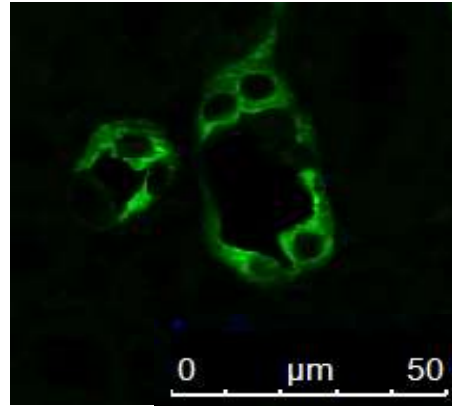
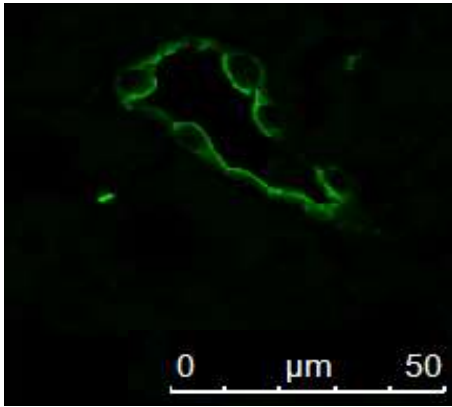


NO/GMPC incrementa la expresión AQP2 EN WT y cKO, pero de manera independiente a la delección de ILK???

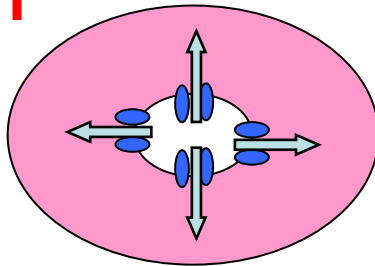


TRAFICO: Localización de la AQP2 en membrana apical del TUBULO es MENOR en cKO

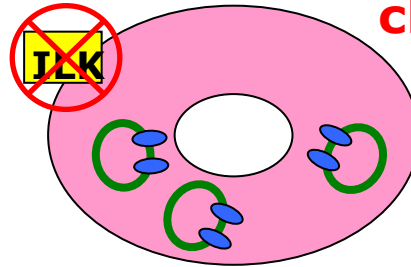
corteza



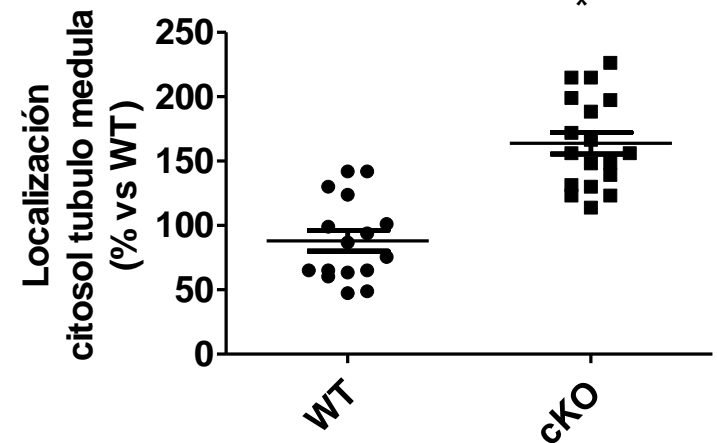
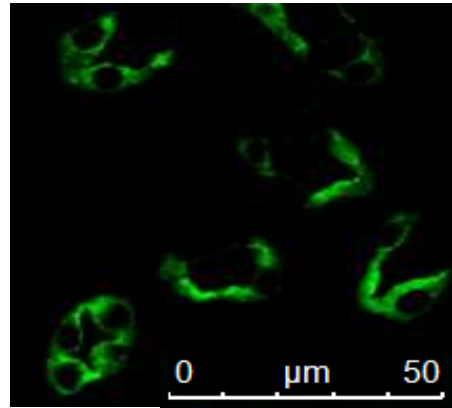
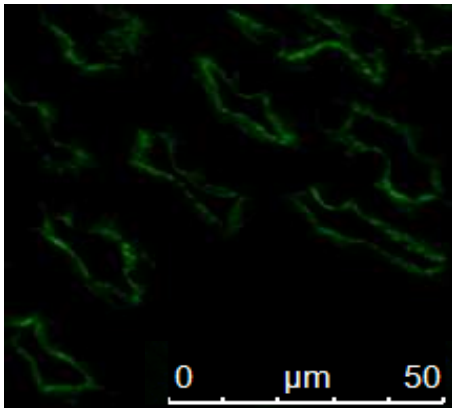
WT



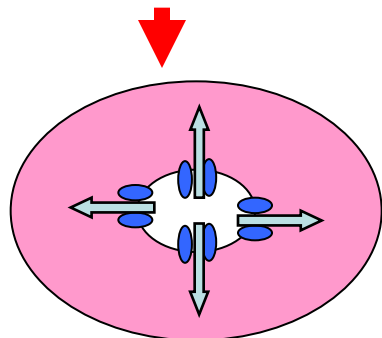
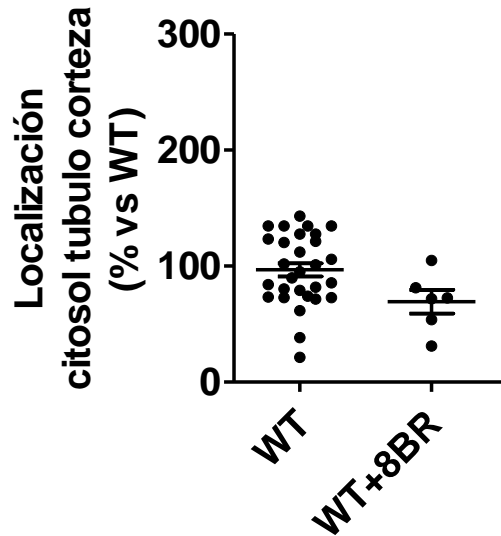
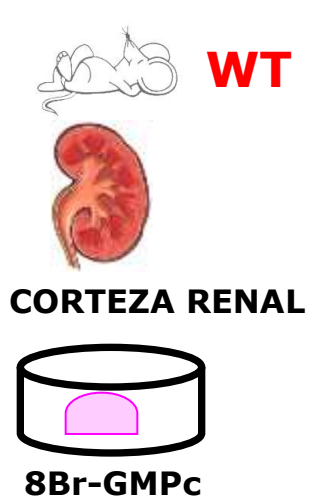
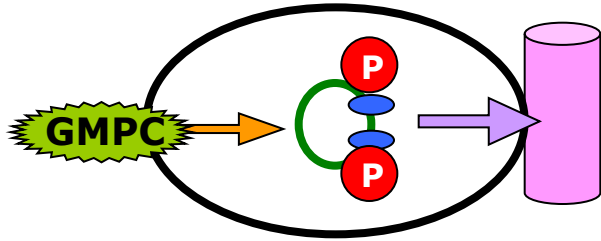
cKO



medula

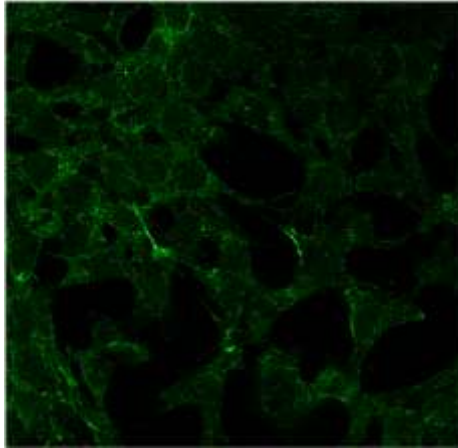


La via NO/GMPc regula el TRAFICO, PERO INDEPENDIENTE DE LA REGULACIÓN POR ILK?

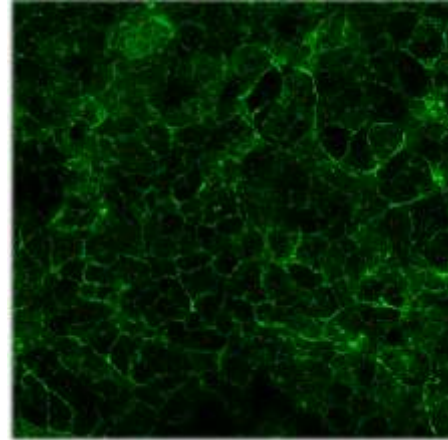


MODELO CELULAR

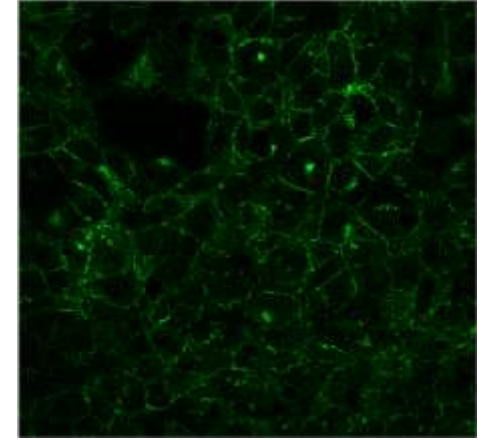
AQP2



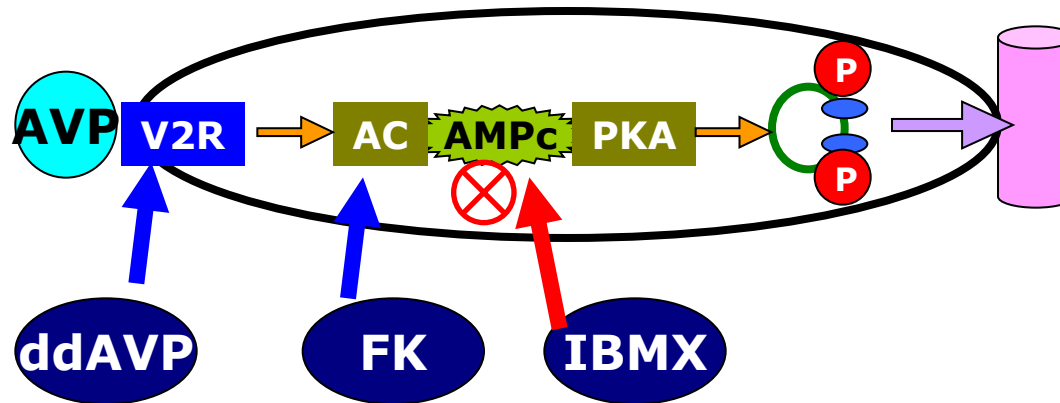
BASAL



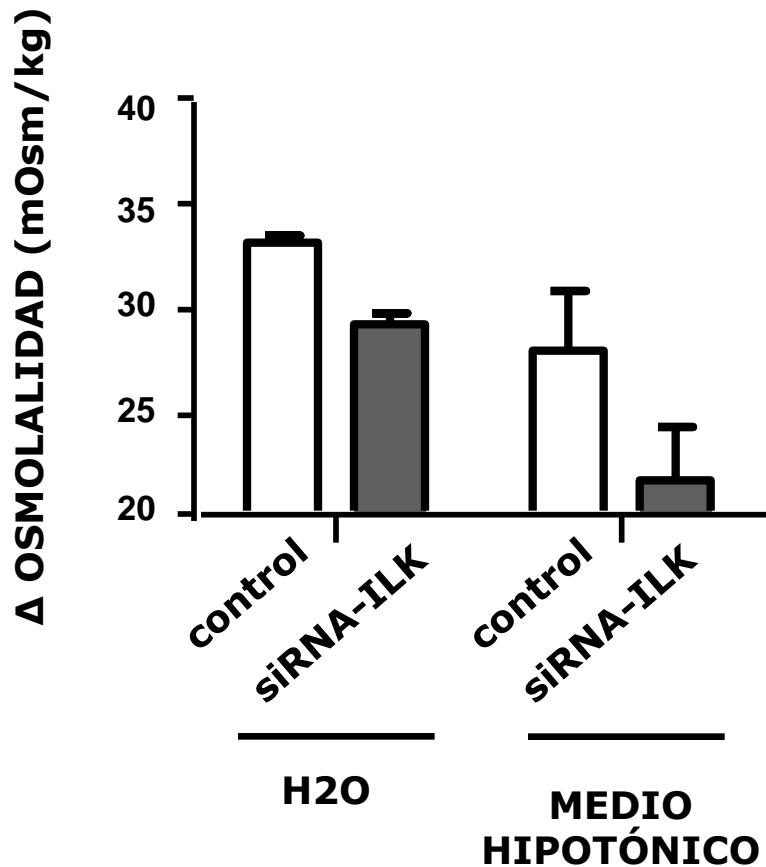
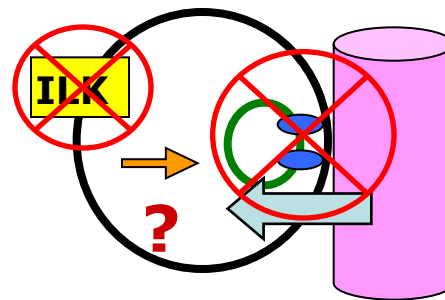
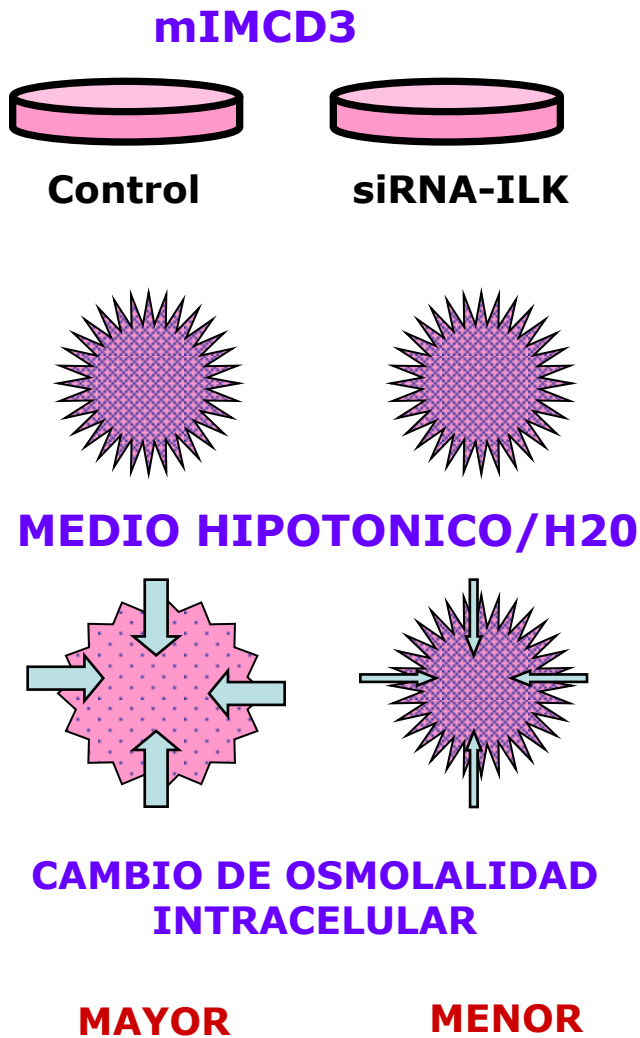
IBMX + dDAVP



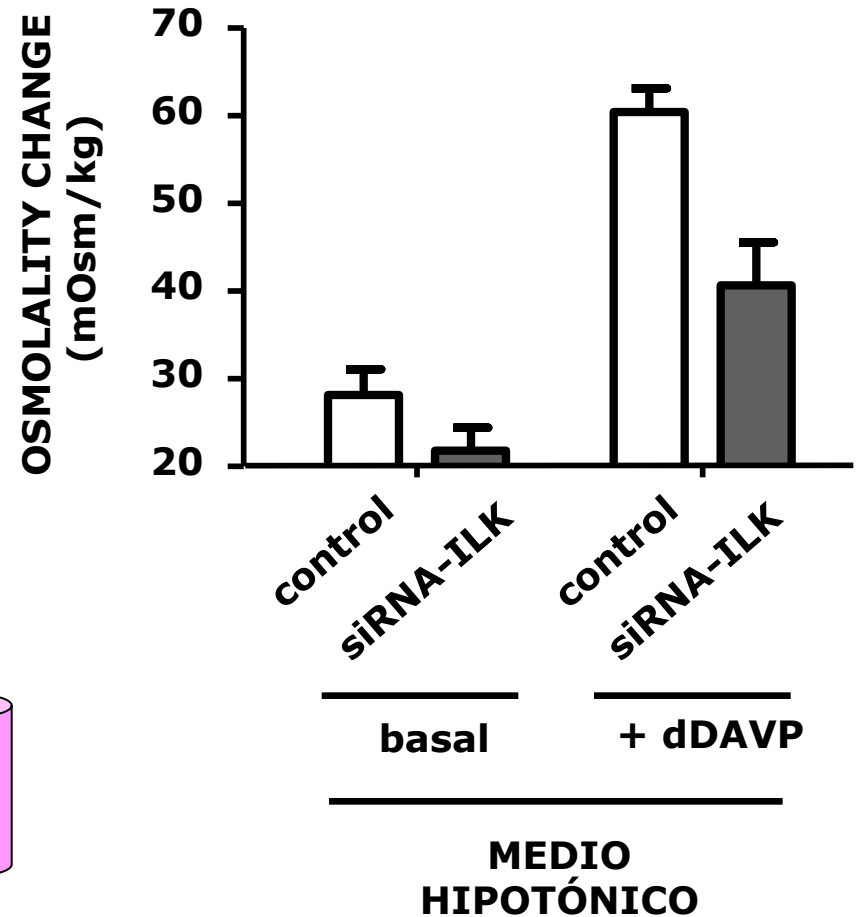
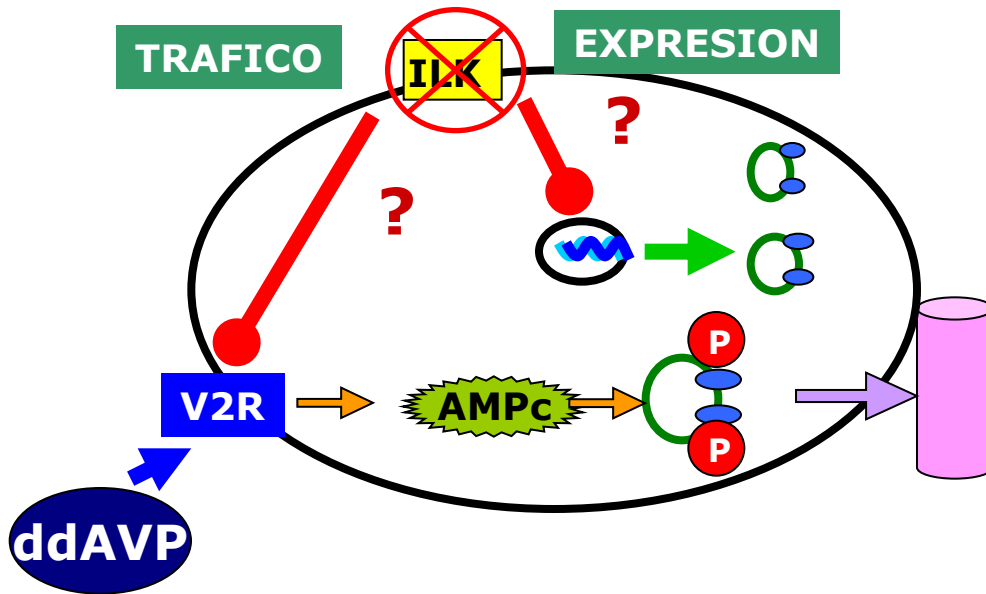
IBMX + FK



MODELO CELULAR



El receptor de Vasopresina (V2R) regula el TRAFICO y es DEPENDIENTE DE LA REGULACIÓN POR ILK ?



CONCLUSION

A nivel renal, la deleción de ILK produce una disminuci3n en la expresi3n y el trafico intratubular de la AQP2, lo que disminuye la capacidad de absorci3n tubular del H2O, de manera independiente a la vía de NO/GMPc/PKG.

FUTURO: que mecanismos llevan a que ILK regule a AQP2?

En que punto ILK regula?

Poner a punto el modelo celular (mIMCD3)

Expresion: Transfeccion de las celulas con plasmido promotor de AQP2-Luciferasa (Albertoni-Borghese et al Nephron extra 2012).

Trafico: Transfeccion de las celulas con plasmidos AQP2-GFP, AQP2 mutada en sitios de fosforilaci3n

Trafico: en tejido, niveles y localizaci3n de las isoformas fosforiladas de AQP2. Estudios Ex-vivo.