



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Metabolismo energético de células renales.
Efectos del *shear stress*.

Metabolism of renal cells. Shear stress effects.

Autor

Pablo Laborda Martínez

Directores

Ignacio Giménez López

Patricia Meade Huerta

Grado en Biotecnología

Departamento de Farmacología y Fisiología

Departamento de Bioquímica y Biología Celular y Molecular

2017

Índice

Resumen/Abstract	1
1 Introducción	2
1.1 Fisiología de la barrera epitelial	2
1.2 Medida de la integridad de la barrera epitelial	4
1.2.1 Método clásico de medida.....	4
1.2.2 Método de la espectroscopía de impedancia	5
1.3 <i>Shear stress</i> : cambios fenotípicos asociados a la perfusión apical.....	6
1.4 Estado actual del desarrollo de modelos con perfusión y medida del TEER	6
2 Objetivos	8
3 Materiales y métodos	8
3.1 Líneas celulares	8
3.1.1 Células NRK-52E.....	8
3.1.2 Células raTAL	8
3.1.3 Mantenimiento de las líneas celulares	8
3.2 Experimentos de medida del TEER	9
3.2.1 Siembra de células.....	9
3.2.2 Montaje del dispositivo de medida del TEER.....	9
3.2.3 Incorporación de la microfluídica al sistema	10
3.2.4 Registro de los valores del TEER.....	11
3.3 Análisis fenotípico.....	12
3.3.1 Análisis bioquímico.....	12
3.3.2 Análisis de expresión génica mediante RT-PCR	12
3.3.3 Inmunofluorescencia	14
4 Resultados y discusión.....	14
4.1 Adaptación del cultivo de células a un sistema de medida de TEER.....	14
4.2 Validación del sistema	15
4.3 Identificación de parámetros externos que influyen en los valores de TEER.....	16
4.4 Efectos de la perfusión sobre los valores de TEER.....	17
4.5 Efectos del <i>shear stress</i> sobre la expresión/fenotipo.....	18
4.6 Efectos de la perfusión sobre el metabolismo energético de células raTAL.....	20
4.7 Medidas de la conductividad y estimación de flujos transepiteliales de iones.....	21
5 Conclusiones/Conclusions	23
6 Bibliografía	24
Anexos	26

Resumen

Los modelos de cultivos celulares actuales no simulan bien las condiciones fisiológicas porque las células se encuentran en un ambiente distinto al que tienen *in vivo*. En este trabajo se ha puesto a punto un modelo intentando solucionarlo al permitir aplicar flujo sobre una monocapa de células, dejando compartimentos superior e inferior pudiendo aplicarlo por uno o ambos simultáneamente. El modelo permite también valorar la integridad de la monocapa a tiempo real sin manipular las células y medir algunos parámetros que permitan comprobar cómo se comportan.

Para ello, se ha utilizado un dispositivo capaz de medir la resistencia eléctrica transepitelial de una monocapa de células (basada en las uniones estrechas entre ellas), así como la conductividad de los compartimentos superior e inferior de la monocapa,

Con los experimentos realizados, se ha determinado que el polietilentereftalato es el mejor material sobre el que sembrar las células. También permitieron determinar la concentración celular de siembra óptima, así como que las variaciones de temperatura y la formación de burbujas en los compartimentos alteran las medidas que lleva a cabo el dispositivo pero no lo hacen las variaciones de CO₂ o de frecuencia de las medidas. Se ha observado que el flujo no tiene efectos sobre las células medibles con el dispositivo ni sobre la expresión de genes de interés, posiblemente debido a la ausencia de cilio descubierta posteriormente, pero sí que permite que las células tengan un consumo de glucosa similar al que tienen con mayor disponibilidad de medio.

Se ha demostrado que el sistema desarrollado constituye un método de medida fiable de la integridad de la monocapa así como de la conductividad del medio. También genera gran cantidad de datos de distintos aspectos simultáneamente para el estudio de células epiteliales que nos han permitido determinar que la monocapa de células estaba polarizada.

Abstract

Current cell culture models do not accurately simulate physiological conditions, because cells grow in a different environment from the one they have *in vivo*. In this project, a model has been optimized trying to solve this by allowing the application of flow on a cell monolayer, leaving upper and lower chambers so that flow could be applied through one or both of them simultaneously. It also allows to evaluate the integrity of the cell monolayer in real time without having to manipulate the cells and to measure representative parameters of their behaviour.

In order to do this, we used a device able to measure the transepithelial electrical resistance of a cell monolayer (based on the tight junctions between them) and the conductivity of the upper and lower chambers of the cell monolayer.

The experiments conducted showed that polyethyleneterephthalate is the best material on which make cells grow. They also permitted to determine the optimal seed density of cells, as well as the fact that variations in temperature and bubbles formation in the chambers modify measures carried out by the device, while variations in CO₂ or in the frequency of the measurements taken do not. It was observed that flow has no effect on cells measurable with the device, and neither does on the expression of target genes, possibly because of the lack of cillium subsequently discovered. However, it makes the cells to have a similar glucose consumption to the one they have when more culture medium is available.

We have demonstrated that the system developed provides a reliable method to measure the integrity of the cell monolayer and the conductivity of the medium. It generates a large amount of data

regarding to different aspects simultaneously to study epithelial cells, allowing for us to determine that the cell monolayer was polarized.

1. Introducción

Los epitelios son la frontera entre el medio interno del organismo y el ambiente externo constituido por aire o agua que rodea al individuo en el caso de la piel o el contenido de una cavidad interna o conducto. En organismos multicelulares, los conductos y cavidades están cubiertos por epitelio y permiten mantener separados cosas tan diversas como orina, sangre, jugo gástrico, bilis, etc. El transporte de iones, agua y moléculas a través del epitelio regula la composición de los fluidos corporales y, en consecuencia, la obtención y pérdida de iones y sustancias del cuerpo.

Los modelos de cultivo actuales no simulan bien las condiciones fisiológicas. Por ello, existe la necesidad, que trata de satisfacer el desarrollo de este trabajo, de buscar un sistema que permita poner flujo sobre la monocapa de células lo cual acercaría las condiciones más a las que se producen fisiológicamente. Además, se pretende que el modelo permita medir la integridad de la barrera de las células a tiempo real sin manipularlas así como ciertos parámetros que nos permitan comprobar si las células se comportan de una forma similar a como lo hacen en un medio fisiológico como sería la medida de la concentración de los iones en el medio que tenga la monocapa tanto encima como debajo para demostrar la polaridad de la misma.

Concretamente, este trabajo se centra en células del túbulo proximal y del asa de Henle de la nefrona. La nefrona es la unidad funcional y estructural del riñón que está constituida por el corpúsculo renal, que actúa como filtro, y el túbulo renal donde el filtrado se procesa y se convierte en orina. El túbulo renal está constituido por el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo distal y el conducto colector. Debido a la baja capacidad de traslación de modelos de este tipo de células hay una serie de problemas como un mayor tiempo de desarrollo de fármacos, mayor uso de animales de experimentación, etc.

1.1 Fisiología de la barrera epitelial

La barrera epitelial está formada por células, cuya membrana lipídica y uniones entre ellas van a determinar el paso de sustancias. Para atravesar un epitelio se puede usar la vía transcelular, en la cual se necesita que la molécula sea hidrófoba para atravesar la membrana o contar con un sistema de transporte específico, o paracelular que es a través de las uniones estrechas^{[1], [2]}. El transporte por las uniones estrechas es pasivo y dirigido por gradientes electro-osmóticos producidos por el transporte transcelular^[2].

Además de actuar como barrera, las uniones estrechas limitan el movimiento de lípidos y proteínas entre la parte apical y basal de la membrana y son las responsables de generar una polaridad apical-basolateral al ser selectivas al paso de iones^{[3], [4]}. Las principales proteínas que forman parte de las uniones estrechas son las siguientes^{[1],[2]}:

- ZO cuyo nombre viene del latín *zonula occludens* y lo que hacen es interaccionar con claudinas, ocludinas y JAMs y unir las al citoesqueleto, además de interaccionar con quinasas, fosfatasas, proteínas G y factores nucleares por lo que están involucradas en regulación de transcripción génica^[5].
- Claudinas tienen diversidad de cargas determinando la selectividad del tránsito de iones ya que algunas son canales iónicos^{[6], [7]} y otras barreras para iones^[8], cabe destacar que hay una composición de claudinas específica en cada epitelio.

- Ocludinas no se conoce su función con exactitud ya que se han visto uniones estrechas sin ocludinas y son aparentemente normales morfológicamente^[9].

Concretamente en el riñón de mamífero, la permeabilidad paracelular disminuye desde el túbulo proximal hasta el túbulo colector debido al conjunto de claudinas expresadas en cada segmento y a los niveles mayores de ocludinas y ZO-1 en los segmentos distales^{[10], [11]}.

En el túbulo proximal, tenemos un epitelio con baja resistencia transepitelial y alto transporte paracelular debido a que un tercio de la reabsorción total de fluidos ocurre por esta vía. Las claudinas 2, 10 y 11 están muy expresadas^[12] y la claudina 2 forma poros de cationes de alta conductividad permitiendo la reabsorción de sodio en grandes cantidades^[13].

El asa ascendente expresa una gran cantidad de claudinas: las 10, 16 y 19 y, dependiendo de las especies, también las claudinas 3, 4, 8 y 11^[8]. La reabsorción paracelular del calcio y el magnesio ocurren en este tramo y está dirigido por un voltaje transepitelial positivo en el lumen generado por el cotransporte de sodio, potasio y cloro y la recirculación de potasio luminal^[14]. La interacción entre la Claudina 16 y 19 es crítica para la reabsorción de calcio y magnesio como se ha visto con mutaciones en las mismas^[15].

La parte distal de la nefrona es un epitelio estrecho con alta resistencia transepitelial y baja permeabilidad pasiva a los cationes. En este segmento, Claudina 4, 7 y 8 hacen de barrera de cationes para prevenir la disipación de los gradientes de sodio, potasio e hidrógeno transtubulares^[12].

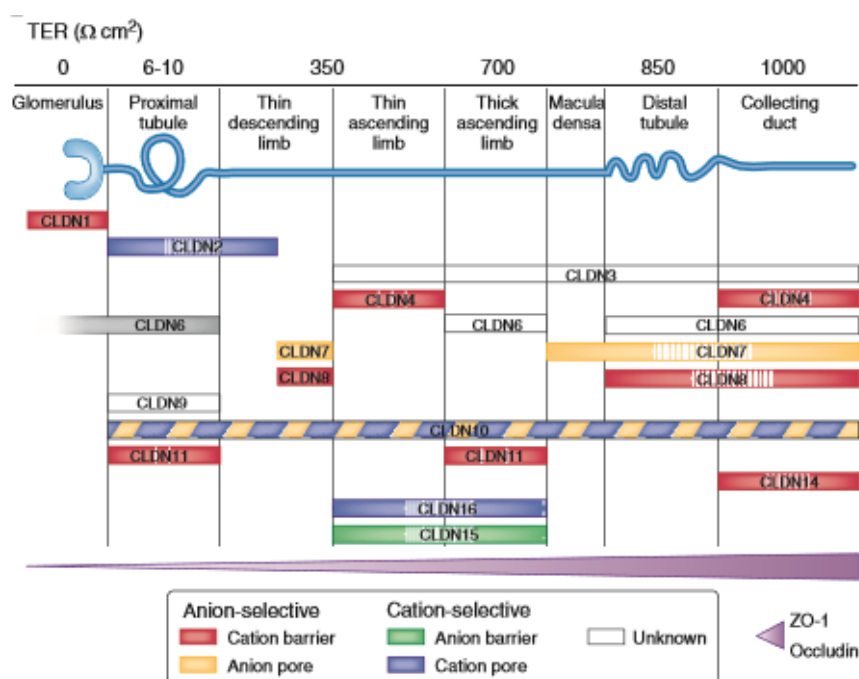


Figura 1.1 Representación lineal de la nefrona con las claudinas mayoritarias expresadas en cada segmento. Algunas características difieren entre los distintos segmentos debido al conjunto de claudinas expresadas en cada uno. Adaptado de referencia [12].

Las uniones estrechas son unos complejos de proteínas que se asocian a diversas moléculas involucradas en cascadas de señal como proteínas G, kinasas y fosfatasa, permitiendo transmitir información al interior celular modulando la formación y desestructuración de la barrera^{[1], [2]}.

1.2 Medida de la integridad de la barrera epitelial

La permeabilidad a través de la ruta paracelular se puede evaluar midiendo la resistencia eléctrica transepitelial^[16] o el flujo de algunos marcadores fluorescentes o radioactivos^[1]. El uso de compuestos marcadores puede interferir con el proceso de transporte en estudio así como con la integridad de la barrera; además, el uso de químicos deja las células testadas inusables para otros experimentos^[17]. Por lo tanto, las técnicas no invasivas son mejores para la monitorización continua de la integridad de la barrera durante varios estadios de crecimiento y diferenciación: la resistencia eléctrica transepitelial o TEER (de sus siglas en inglés) es la medida de la resistencia eléctrica a través de una monocapa celular y es un método muy sensible y fiable para confirmar la integridad y permeabilidad de la barrera^{[17][18]}.

Por ello, lo que vamos a usar en este trabajo es la resistencia eléctrica transepitelial. Como ya se ha explicado, el epitelio es selectivo al paso de iones y eso es lo que vamos a usar para medir el TEER, que consiste en la resistencia que genera esta capa de células al paso de corriente eléctrica ante la aplicación de una diferencia de potencial. En las condiciones que se emplean, la mayor parte de la resistencia que se mide es debida a la vía paracelular, pero en otras condiciones puede influir más la capacitancia transcelular.

1.2.1 Método clásico de medida

El sistema clásico de medida de TEER consiste en una monocapa celular sembrada en un filtro semipermeable que define un compartimento apical y otro basolateral. Para las medidas eléctricas, se disponen dos electrodos, uno de ellos en el compartimento superior y otro en el inferior y separadas por la monocapa celular (Figura 1.2)^{[17][18]}. En teoría, la resistencia óhmica puede ser determinada aplicando un voltaje de corriente continua a los electrodos y midiendo la corriente resultante^[19]; la resistencia óhmica es calculada con la Ley de Ohm como el cociente del voltaje y la corriente.

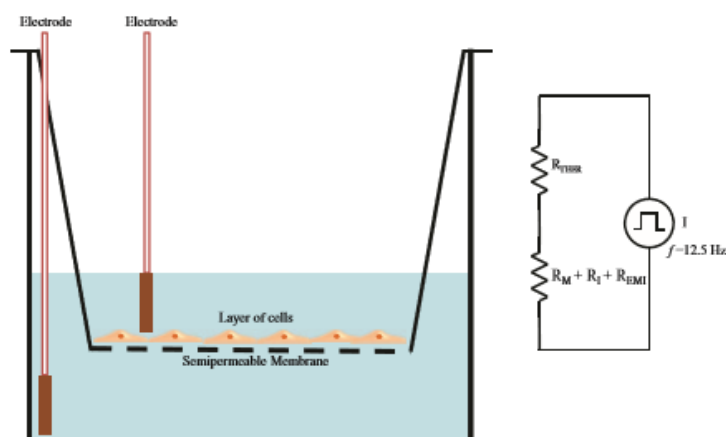


Figura 1.2 Método clásico de medida de la resistencia eléctrica transepitelial. Consistente en dos electrodos, uno en el compartimento superior y otro en el inferior y separadas por la monocapa celular. Adaptado de referencia [17].

Sin embargo, las corrientes continuas pueden dañar tanto las células como los electrodos. Además, las lecturas de TEER son muy dependientes de la posición de los electrodos y tienen que ser manejados de forma muy cuidadosa al introducirlos en el sistema para evitar cualquier efecto sobre las células. La uniformidad de la densidad de corriente generada por los electrodos a través de la capa celular tiene efectos significativos sobre las medidas del TEER^[20] y el sistema descrito no puede dar lugar a una

densidad de corriente uniforme en una membrana relativamente grande y lleva a una sobreestimación del valor medido ya que mide sólo en una parte de la monocapa por la cual pasa la corriente ocasionada por la diferencia de voltaje y no por toda su superficie. Por último, la resistencia eléctrica medida incluye tanto la resistencia de la capa celular como la del medio de cultivo, la membrana semipermeable y la de los propios electrodos^{[17], [18]}.

1.2.2 Método de la espectroscopía de impedancia

La espectroscopía de impedancia, cuando se combina con un algoritmo, puede dar una representación del TEER mucho más precisa que los valores obtenidos con el sistema anterior^[21]. La espectroscopía de impedancia se puede determinar al aplicar una diferencia de potencial de corriente alterna de pequeña amplitud con un barrido de frecuencias y medir la amplitud y la fase del potencial resultante (Figura 1.3)^{[17], [18]}. Como está basada en el uso de corriente alterna, que consiste en que el potencial positivo y el negativo van cambiando de electrodo cada cierto tiempo, la intensidad resultante también va a variar con el tiempo (Figura 1.3 B). La impedancia eléctrica (Z) es el ratio entre la función del voltaje con el tiempo $V(t)$ y la función de la corriente resultante con el tiempo $I(t)$ ^[19]:

$$Z = \frac{V(t)}{I(t)} = \frac{V_0 \cdot \sin \theta}{I_0 \cdot \sin(2\pi f t + \phi)} = \frac{1}{Y} \quad Z = Z_R + jZ_I$$

Donde V_0 e I_0 son los picos del voltaje y la corriente respectivamente; f es la frecuencia; t es el tiempo; Φ es el desplazamiento de fase entre las funciones de voltaje con el tiempo e intensidad con el tiempo; Y es la conductancia compleja o admitancia. Z es una función compleja y puede ser descrita por el módulo $|Z|$ y el desplazamiento de fase Φ o por su parte real Z_R y su parte imaginaria Z_I (Figura 1.3 B)^[19].

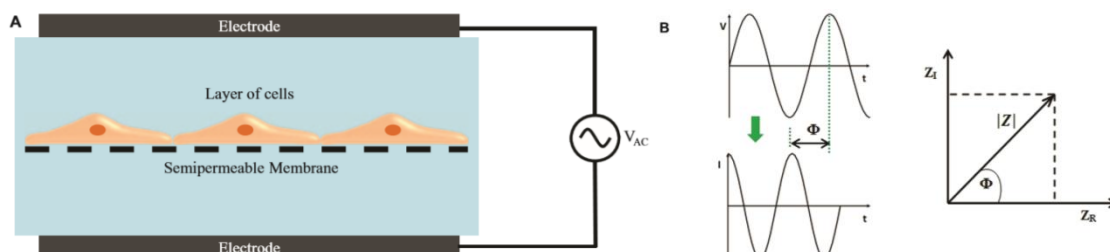


Figura 1.3 (A) Concepto de medida de resistencia eléctrica transepitelial basado en espectroscopía de impedancia. (B) Componentes de la impedancia. La espectroscopía de impedancia se puede determinar al aplicar una diferencia de potencial de corriente alterna de pequeña amplitud con un barrido de frecuencias y medir la amplitud y la fase de la corriente resultante. Adaptado de la referencia [17].

En este caso la célula, debido a la naturaleza aislante de su bicapa lipídica, va a actuar como capacitor^[19]: al aplicar una diferencia de potencial con corriente continua simplemente la corriente no pasaba o pasaba con tanta resistencia que se puede considerar despreciable, ahora ocurre lo mismo al principio pero como es corriente alterna una vez cambia la polaridad los iones que se habían acumulado a cada lado de la capa son atraídos por el electrodo que antes los repelía y de esta manera se genera un movimiento de iones que va a resultar en una corriente medible y que tendremos que tener en cuenta.

Podemos usar un esquema de un circuito típico para analizar el espectro de impedancia de sistemas celulares (Figura 1.4 A y B)^{[18], [19]}. En este circuito, la corriente puede pasar por las uniones estrechas

(ruta paracelular) o a través de la membrana de las células (ruta transcelular). Las uniones estrechas contribuyen a una resistencia en el circuito equivalente, lo que sería el TEER; cada bicapa lipídica en la ruta transcelular contribuye con una resistencia óhmica (resistencia de la membrana) y una capacitancia eléctrica; además, también tenemos la resistencia del medio de cultivo y la capacitancia de los electrodos de medida que también tienen que ser consideradas^[19]. Podemos simplificar este esquema ya que los valores tan altos de la resistencia ofrecida por la membrana hace que la corriente fluya mayoritariamente a través del capacitor y podamos realizar una aproximación en la cual ignoramos la resistencia de la membrana^[19].

Típicamente, hay tres regiones de frecuencia en el espectro de impedancia en cada uno de los cuales la impedancia está influenciada por determinados elementos del circuito (Figura 1.4 C). En el rango de bajas frecuencias, la señal de impedancia está determinada por la capacitancia de los electrodos de medida. En el rango medio, la señal de impedancia está determinada por los elementos del circuito relacionados con las células, es decir, el TEER y el efecto de capacitor. En el rango de frecuencias altas, lo que predomina es la resistencia del medio de cultivo^{[18], [19]}. De este modo, a través de la medida de la impedancia en el rango de frecuencias correcto y a través de un programa informático que disponga del algoritmo adecuado podemos transformar la medida en un valor de TEER, que es lo que pretendemos medir.

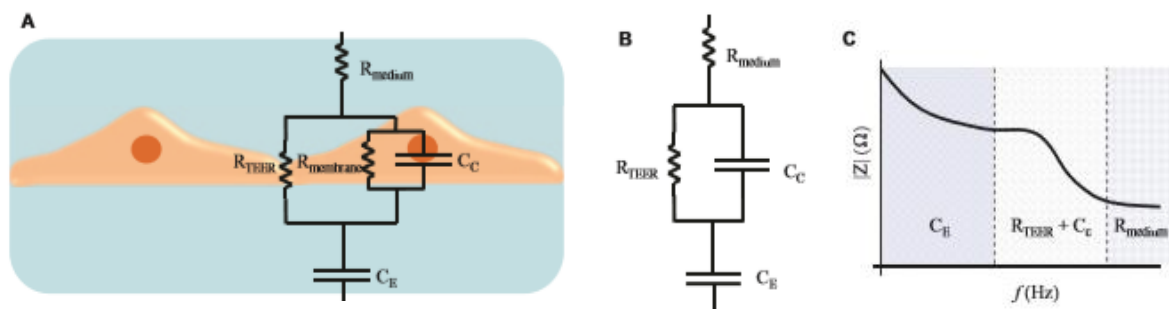


Figura 1.4 (A) Circuito equivalente de un sistema celular. (B) Circuito equivalente simplificado. (C) Espectro de impedancia con distintas regiones dependientes de la frecuencia. Adaptado de la referencia [17].

1.3 *Shear stress*: cambios fenotípicos asociados a la perfusión apical

El *shear stress* consiste en el efecto que provoca un fluido que pasa sobre una monocapa de células. El flujo es detectado por las células a través de un orgánulo concreto, el cilio, que además es capaz de provocar efectos mecanotransductivos en el interior celular.

Concretamente, se ha comprobado que el *shear stress* provocado por un fluido que pasa por la superficie de una monocapa celular tiene un efecto mecanotransductivo en varias rutas moleculares epiteliales a través de la activación de receptores de membrana. Estas rutas estimulan la expresión de genes y proteínas que lleva a la producción de proteínas de las uniones estrechas como ZO-1^[22] y pueden modular la estructura del citoesqueleto para reorientación y reestructuración celular^{[2], [23]}. Especialmente en células renales puede provocar cambios relacionados con la barrera epitelial, el transporte de iones y el metabolismo energético.

1.4 Estado actual del desarrollo de modelos con perfusión y medida del TEER

Se han realizado estudios a través de dispositivos con perfusión y midiendo simultáneamente el TEER con células de barrera hematoencefálica para estudio de drogas que la atraviesan^[24], con células

intestinales para estudio de los efectos del *shear stress*^[25] o con células del epitelio pulmonar para estudio de los daños causados por el movimiento de líquidos^[26], entre otros.

Hasta el momento, las aproximaciones al respecto en células renales han hecho uso del método clásico de medida del TEER^{[27], [28]}, pero debido a que tiene algunas limitaciones, durante este trabajo se ha realizado la validación de un sistema que nos permita medir el TEER de una monocapa de células renales y que tenga unas características óptimas. Como ha quedado patente, el sistema de espectroscopía de impedancia es más efectivo que el de la resistencia óhmica, por lo que habría que añadirlo en el sistema de medida de TEER óptimo. Este sistema tendría también una integración de los electrodos inmovilizados directamente con el modelo de chip para evitar el problema de dañar las células y que quedasen próximos a la monocapa celular, lo cual puede reducir no sólo la contribución de la resistencia eléctrica del medio de cultivo si no también el ruido generado por los propios electrodos. Además, el diseño debería permitir aplicar una densidad de corriente uniforme en toda la superficie de manera que se mida en toda la superficie de la capa de células y, por último, que incorpore la posibilidad de fluídica para monitorización en tiempo real de las células.

Tal sistema, entraría dentro de lo que se llama sistemas de “órgano en un chip”. Los sistemas de órgano en un chip son dispositivos microfabricados biomiméticos que contienen canales de microfluídica y cámaras habitadas por células vivas, que replican unidades funcionales clave de órganos para reconstruir fisiopatología a nivel de órgano in vitro^[29]. En los últimos años, los sistemas de órganos en chips han ganado popularidad debido a razones científicas y éticas y, concretamente en la Unión Europea, los métodos in vitro tendrán un papel importante en la legislación futura de pruebas de fármacos y cosméticos^[30]. Esto es debido a que se pretende seguir las normas de reemplazo, reducción y refinamiento en experimentación animal.

Por lo tanto, se ha mostrado un gran interés por parte de industrias farmacéuticas, alimentarias y cosméticas en aplicar estos sistemas para estudio de absorción de fármacos, nutrientes y xenobióticos y sus posibles efectos tóxicos. Esto es debido a que el desarrollo de sistemas basados en chips con barreras celulares in vitro suponen un método fiable, coste-efectivo y de alto rendimiento para predecir parámetros que controlan permeabilidad y transporte de esas moléculas a través de estas barreras en las etapas tempranas de desarrollo del fármaco o producto determinado. Estos modelos celulares tienen también la ventaja de controlar de manera precisa parámetros de transporte y condiciones experimentales.

Los órganos en chips también proporcionan la ventaja de permitir el estudio de células bajo condiciones de flujo relevantes fisiológicamente que se sabe que inducen efectos mecanotransductivos en algunos tipos celulares^[17]. Por ejemplo, muchos procesos de transporte en el riñón se sabe que están regulados por condiciones de flujo y *shear stress*^[31] y el modelo desarrollado en este trabajo nos permite basarnos en que el *shear stress* puede afectar a la función de barrera de las células epiteliales y, por lo tanto, los valores del TEER bajo condiciones de flujo pueden ser diferentes que en condiciones estáticas.

En definitiva, la integración de un sistema de medida de TEER con dispositivos basados en chips permitiría un control continuo no invasivo de las células en un incubador sin interrumpir el ambiente celular para hacer las medidas. La importancia de este tipo de sistemas actualmente se puede apreciar el desarrollo de un sistema muy parecido al que se ha pretendido desarrollar durante este trabajo con tipos celulares procedentes de pulmón^[32] y corazón^[33] por parte de autores reconocidos en el ámbito.

2. Objetivos

La hipótesis de la que se parte es que un sistema como el descrito, que permita introducir un flujo sobre una monocapa de células y medir el TEER a tiempo real nos permitirá desarrollar un modelo en el que las células sobrevivan más tiempo sin necesidad de manipularlas y se comporten de una forma más parecida a como lo hacen en condiciones fisiológicas. En concreto, los objetivos propuestos son los siguientes:

1. Desarrollar un protocolo para el cultivo de células en un sistema que permita aplicar perfusión y medir el TEER
2. Determinar que se mide la permeabilidad por la ruta paracelular de una monocapa de células con la medida de la resistencia eléctrica transepitelial
3. Determinar todos los parámetros que influyan en las medidas
4. Determinar los efectos de la perfusión sobre el fenotipo celular y la expresión de marcadores de interés
5. Determinación del metabolismo de las células
6. Validar la medida de la conductividad

3 Materiales y métodos

3.1 Líneas celulares

3.1.1 Células NRK-52E

Se trata de una línea celular comercial obtenida a partir de túbulo proximal de riñón de rata. Son células epiteliales adherentes que crecen en monocapa y su cultivo durante este trabajo se ha realizado en medio MCR que consiste en medio DMEM:F12 comercial suplementado con suero fetal bovino al 2% (v/v), Penicilina-Estreptomicina-Anfotericina B (100 uds/ml-100 uds/ml-25 µg/ml), insulina (5 µg/ml), transferrina (5 µg/ml), selenio (60 nM), dexametasona ($5 \cdot 10^{-8}$ M), T3 (10^{-9} M) y EGF (10 ng/ml) (Anexo 1: Composición de los medios).

3.1.2 Células raTAL

Se trata de una línea celular desarrollada y donada por el doctor N Ferreri (NYUC, EEUU). Proviene de células del asa del Henle de riñón de rata que fueron cultivadas hasta 75 pases^[34]. Son células epiteliales adherentes que crecen en monocapa y, al igual que las células NRK-52E, su cultivo durante este trabajo se ha realizado en medio MCR. En comparación con las células del túbulo proximal, las células del asa de Henle van a formar una monocapa con menos permeabilidad paracelular^{[10], [11]}.

3.1.3 Mantenimiento de las líneas celulares

La manipulación de las células se llevó a cabo en campanas de flujo laminar vertical (Telstar Bio II Advance) y los cultivos se mantuvieron en un incubador termostatzado (Barnstead Lab-Line) a 37°C con 5% de CO₂ y aire saturado de humedad. Se realizaban subcultivos de forma periódica en frascos de cultivo de 25 cm² con volumen final de 5 ml y ambas líneas celulares se observaban diariamente al microscopio invertido (Nikon ECLIPSE TS100) con el fin de controlar su crecimiento, morfología y posibles contaminaciones.

Para llevar a cabo el subcultivo, las células se trataban con 1 ml de una preparación de tripsina-EDTA 1x (Lonza) durante 5 minutos en el incubador. Posteriormente se comprobaba al microscopio que las células se hubiesen despegado del fondo del frasco y se añadían 3 ml de medio MCR para neutralizar

la acción de la tripsina. Finalmente se determinaba la concentración celular con un contador automático Beckman Coulter y se iniciaba un nuevo cultivo con $5 \cdot 10^4$ o 10^5 células totales en función del tiempo previsto hasta el siguiente subcultivo.

3.2 Experimentos de medida del TEER

3.2.1 Siembra de células

La siembra de las células para la realización de los experimentos de medida de TEER se lleva a cabo en una membrana semipermeable en forma de 3 canales independientes y separados por una capa de silicona pegada a la membrana donde se siembra, mediante una capa de PSA (de las siglas en inglés *Pressure-sensitive adhesive*) (Figura 3.1 A).

Para realizar la siembra, previamente se esteriliza la membrana mediante la exposición a rayos UV durante 18 minutos. A continuación, se deposita una capa de colágeno (*Collagen I, Rat Tail*, 3,36 mg/ml Corning®) durante al menos una hora a temperatura ambiente y se retira el sobrante de la solución de colágeno. Posteriormente, se siembran las células, tras llevar a cabo el mismo proceso que para el mantenimiento de las líneas celulares comentado en el apartado anterior, a una concentración adecuada. Esta concentración fue determinada previamente en función del tiempo previsto que se va a tardar en comenzar el experimento para el cual se requiere que las células hayan crecido y cubierto los canales completamente. Normalmente, se depositaron en los canales 300 μ l de una suspensión celular a 96000 células/ml para conseguir la confluencia de los canales 48 horas después, durante las cuales la membrana con las células se deja en el incubador con 7 ml de medio MCR, suficiente para cubrir toda la membrana. Todo el proceso de siembra se lleva a cabo en esterilidad en campana de flujo laminar.

3.2.2 Montaje del dispositivo de medida del TEER

Una vez tenemos los canales de la membrana con las células en confluencia montamos el dispositivo de medida (Figura 3.2). Para ello, colocamos dos placas con electrodos (Figura 3.1 B) encima y debajo de la membrana como se muestra en la figura 3.1 A, de modo que va a quedar un compartimento superior o apical y otro inferior o basal para cada canal de células independiente. Se cierra el conjunto mediante placas metálicas encima y debajo del montaje llevado a cabo (Figura 3.3 A) y se mantiene todo estable con tornillos que pasan por orificios que tienen tanto las placas con electrodos como las placas metálicas previamente diseñadas con tal fin.

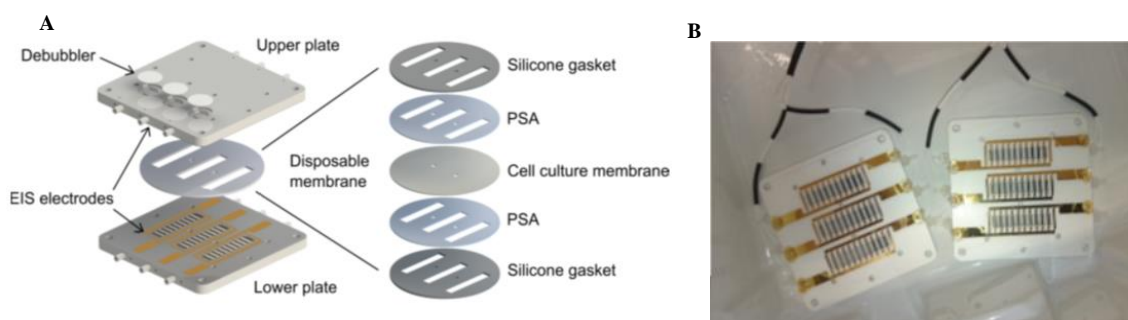


Figura 3.1. (A) Esquema de los componentes de la membrana de siembra y de la disposición de los componentes para la medida del TEER. (B) Imagen de las placas con electrodos usados para los experimentos.

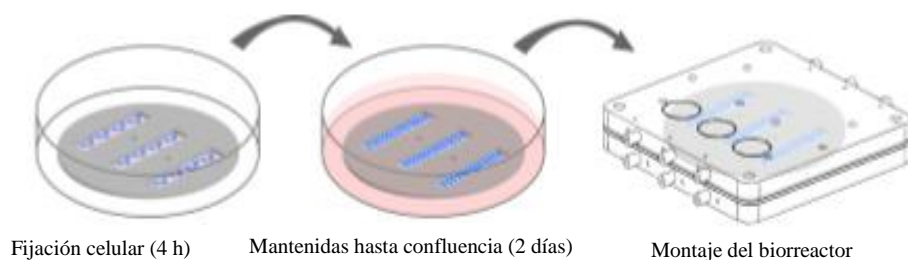


Figura 3.2 Esquema general del montaje del dispositivo de medida del TEER

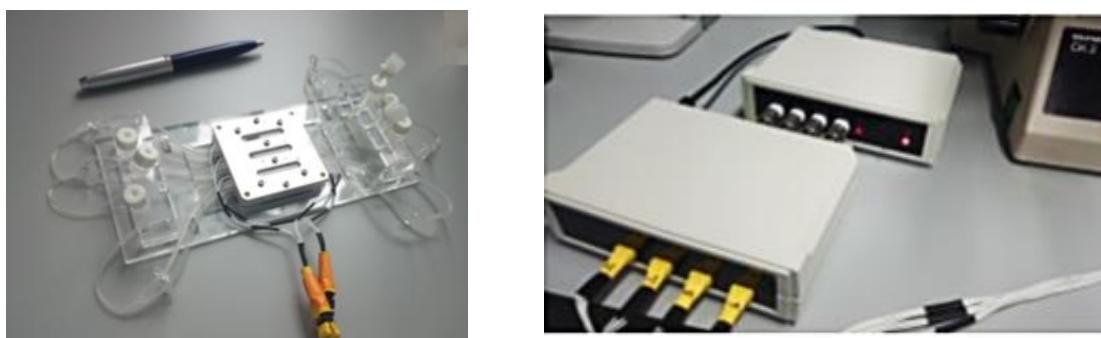


Figura 3.3. (A) Imagen del montaje final mantenido con placas metálicas y tornillos. (B) Imagen del medidor.

3.2.3 Incorporación de la microfluídica al sistema

Como se ha comentado, tras montar el dispositivo quedan compartimentos apicales y basales respecto a cada canal de células sembradas y por esos compartimentos puede pasar medio de cultivo que requieren las células para mantenerse viables. Para que pase medio de cultivo usamos una serie de tubos de silicona con 0,5 mm de diámetro que van desde un reservorio de vidrio que contiene el medio de cultivo (con un filtro para que se equilibre con la composición de gases del incubador) hasta el dispositivo y desde el dispositivo vuelven al reservorio, permitiendo que el líquido fluya, salga del reservorio y vuelva al mismo tras pasar por las células gracias al impulso de una bomba peristáltica de Ismatec (Figura 3.4). El rango fisiológico de *shear stress* es de 0,2-1 dyn/cm² y durante el trabajo se ha usado el flujo correspondiente al límite inferior para evitar dañar las células (0,2 ml/min).

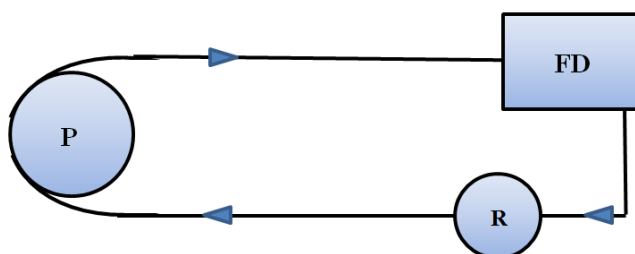


Figura 3.4. Esquema del circuito. La bomba (P) mueve el líquido desde el reservorio (R) hasta el dispositivo de medida (FD) y de ahí vuelve de nuevo al reservorio.

Por los canales de células puede pasar medio de forma independiente por cada uno de ellos tanto por su parte apical como su parte basal, y pueden ir conectados en serie los compartimentos apicales y

basales que nos interesen y en el orden que nos interesen, así como mantener algunos de los compartimentos sin flujo para llevar a cabo el experimento que necesitemos realizar siempre que coloquemos los tubos en el orden correcto. Podremos cambiar de un medio a otro cambiando el reservorio del cual llega el medio a todo el sistema a través del impulso de la bomba.

Estos tubos de silicona por los que pasa medio de cultivo que llega hasta las células, se esterilizaban previamente en el autoclave, así como el reservorio de medio de cultivo utilizado, y el montaje del sistema de fluídica se lleva a cabo en esterilidad en campana de flujo laminar. A su vez, las placas con electrodos se esterilizaban previamente al montaje con isopropanol, pasando posteriormente al menos una noche en la estufa para eliminarlo completamente, ya que el material que las constituye no resiste las temperaturas demasiado altas.

El medio que se utiliza para que pase por los canales de células es el mismo medio usado para el cultivo de las mismas, medio MCR. En algunos experimentos, los experimentos de iones, lo que se utiliza es un *Ringer* que contiene HEPES y 140 mM de NaCl y medio con HEPES y 70 mM de NaCl (Anexo 1: Composición de los medios). Por último, también se usó el *Ringer* y un medio carente de calcio (Anexo 1: Composición de los medios) con el fin de afectar a las uniones estrechas, al ser el calcio un componente esencial para su estabilidad, y comprobar cómo afectaba eso a las medidas.

3.2.4 Registro de los valores del TEER

Una vez tenemos el dispositivo montado, con o sin flujo en cualquiera de las combinaciones posibles, conectamos las placas con electrodos al sistema encargado de generar los potenciales eléctricos y del registro de las resistencias (ZMeter) (Figura 3.3 B). Este aparato aplica una diferencia de potencial alterna entre dos electrodos (uno apical y otro basal) a diferentes frecuencias (10^{-10} Hz) y mide y registra el paso de la corriente a través del epitelio. En otra configuración, el sistema establece un circuito entre dos electrodos del mismo compartimiento, para medir la resistencia del medio que contiene. El análisis de la resistencia permite establecer la conductividad de los medios presentes en el compartimiento apical o en el basal de cada canal de forma independiente.

El ZMeter se controla desde una aplicación específica, desarrollada por el grupo de aplicaciones biomédicas del Centro Nacional de Microelectrónica de Barcelona encargado de toda la parte de desarrollo de materiales de medida de parámetros electrónicos que participa en el proyecto de colaboración del que forma parte este trabajo. Dicha aplicación calcula los diferentes parámetros de la impedancia (módulo Z y fase) para cada frecuencia de estimulación y genera los archivos y gráficos correspondientes. Mediante el análisis de la amplitud y la fase de la corriente generada se calcula la resistencia que ejerce la capa de células. Consideramos como TEER los valores de observados en la región de frecuencias entre 10 y 10^4 Hz.

Las medidas que realiza el sistema son mediante el método de espectroscopía de impedancia que consiste, como se ha explicado, en medir la impedancia y la fase en un barrido de frecuencias, que a través de un algoritmo matemático incorporado a la aplicación transforma esas medidas en un punto de TEER cada cierto tiempo que podemos determinar modificando los parámetros de las medidas con el mismo programa. En el ordenador veremos los barridos de frecuencias, que nos permitirán comprobar el estado de la monocapa tras determinar experimentalmente la forma que tienen las curvas de esos barridos para monocapas confluentes, sin burbujas que perturbasen la medida y sin contaminaciones que afectasen a las células (Figura 3.5), lo cual supone que con observar si la curva que está apareciendo en las medidas a tiempo real es la característica, podemos verificar que el sistema continúa sin ninguna anomalía. También veremos la progresión de TEER respecto al tiempo que nos permitirá evaluar el estado de la monocapa a lo largo del experimento.

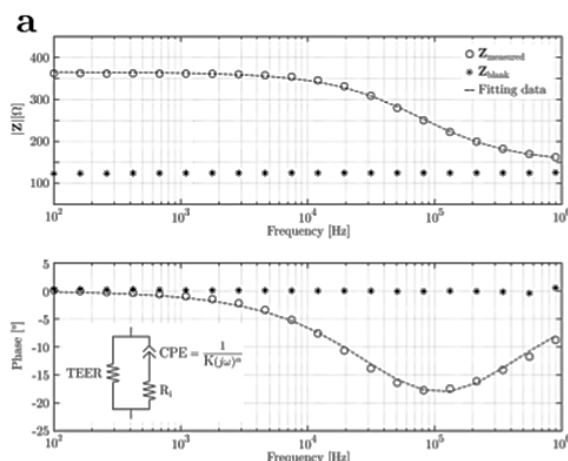


Figura 3.5 Curvas características de células en correctas condiciones. Nos permiten evaluar el estado de la monocapa en cada momento.

La determinación del TEER nos va a permitir seguir el estado de la monocapa de células a tiempo real mientras sometemos a las células a diferentes condiciones experimentales, como por ejemplo el *shear stress* debido al flujo de medio de cultivo pudiendo comprobar los efectos del mismo. La medida de la conductividad del medio puede aprovecharse para determinar la capacidad de las células de mover iones de un compartimento a otro usando medios de concentración de iones definida.

3.3 Análisis fenotípico

3.3.1 Análisis bioquímico

Durante el transcurso de algunos experimentos, se llevó a cabo la recogida de muestras del medio con el fin de comparar posteriormente la concentración de glucosa y lactato del medio en distintas condiciones y, por tanto, la tasa de consumo de glucosa y producción de lactato de las células en distintas condiciones, así como las concentraciones de los distintos iones para validar y complementar la medida de conductividad llevada a cabo por el sistema. Estas muestras pueden ser recogidas de los reservorios o directamente de los canales aspirando el medio de los mismos con una jeringa. Las muestras recogidas se guardan en viales de 2 ml y a -80°C hasta su análisis posterior.

Estas mediciones fueron llevadas a cabo en el Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Miguel Servet, con el desconocimiento de las condiciones de las que procedían las muestras por parte de los operarios que llevaron a cabo las medidas. Para medir los iones se usaron electrodos específicos de cada ion y para la glucosa y el lactato se usaron técnicas enzimáticas colorimétricas. Como valores de referencia se emplearon los determinados en muestras del medio fresco con estas mismas técnicas.

3.3.2 Análisis de expresión génica mediante RT-PCR

Se realizaron análisis comparativos de la expresión génica en células que fueron sometidas a flujo con distintas duraciones del flujo en el dispositivo, respecto a células que no fueron sometidas a flujo. Concretamente, se comprobó la expresión de las claudinas que son elementos fundamentales en la formación de las uniones estrechas y otros marcadores.

Primero se extrajo ARN de las muestras de células en cada una de las condiciones a través del *Total RNA purification kit* de Norgen según las instrucciones del fabricante. En el caso de las células no sometidas a flujo, se cogía una muestra de células con las que se hacía un pellet y se seguían los pasos indicados en el kit que consistían en la lisis de las células y la purificación del ARN a través de una

columna con la que se adsorbe el ARN al estar constituida por resina catiónica. En el caso de las células sometidas a flujo, se siguió el mismo protocolo pero las células no eran lisadas en el pellet si no vertiendo el tampón de lisis directamente sobre la membrana semipermeable, se recogía lo resultante tras incubarlo 5 minutos a temperatura ambiente y se seguía el protocolo con la columna tal como indica el kit.

El siguiente paso consiste en la cuantificación del ARN extraído con *NanoDrop 1000* de ThermoSCIENTIFIC que nos indica la concentración con la medida de la absorbancia a 260 nm y la pureza de la muestra a través del ratio de la medida de absorbancia a 260 nm y a 280 nm. Finalmente el ARN se conserva a -80°C hasta su utilización. A continuación, se pasa el ARN a ADNc a través de la reacción de retrotranscripción con la retrotranscriptasa del *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (200mx) 1 Kt* de Life Technologies siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

Una vez tenemos el ADNc de las células llevamos a cabo la PCR. Para ello, se habían diseñado previamente los *primers* que iban a usarse para amplificar las regiones de los genes correspondientes a las claudinas de interés y otros marcadores. Se trataba de KSP1, α SMA2, NKCC2, THP1, CL2, CL14 y CL19. KSP que es una cadherina específica del riñón, THP que es un marcador de asa de Henle, NKCC2 es un cotransportador de Na-K-Cl que también es un marcador de asa de Henle y se había observado que aparece en muestras obtenidas de riñón pero en las células mantenidas en cultivo desaparecía, α -SMA es actina de músculo liso que es un marcador de estirpe mesenquimal (por tanto, de desdiferenciación) y las tres claudinas (CL2, CL14 y CL19) son proteínas de las uniones estrechas.

El diseño de los oligonucleótidos para la PCR se había llevado previamente a cabo a partir de las secuencias conocidas de los genes del genoma de rata (Anexo 2: Secuencias de primers). Se validaron a través de una PCR partiendo de ADNc de riñón de rata.

Partiendo del ADNc extraído de las células, añadimos los componentes de la reacción de PCR: para llevarla a cabo se mezclaron 0,5 μ l de IBIAN Taq polimerasa, 0,5 μ l del ADN correspondiente en cada caso, dNTPs a 0,2 mM, los primers a 0,5 mM, buffer 1x y agua hasta 20 μ l. La reacción se llevó a cabo siguiendo los siguientes ciclos:

94°C	2 minutos	} 40 ciclos
94°C	30 segundos	
62°C	30 segundos	
72°C	1,5 minutos	
72°C	5 minutos	
4°C	∞	

A las muestras se les añade tampón de carga 6x que lleva glicerol, azul de bromofenol y xylencyanol y se cargan en un gel de electroforesis al uno por ciento de agarosa y 0,5 μ g/ml EtBr. Se coloca en una fuente BIO-RAD y se ponen 120V durante 20 minutos en un tampón SB (0,76 M de borato sódico). Los tamaños de los amplicones se calculan por comparación con un marcador de peso molecular *Ibian 100bp DNA ladder no stain 50ug*.

Finalmente se documenta el resultado con un transiluminador UV y una cámara CCD (SYNGENE versión 6.08.04) que nos permitirá ver si ha habido amplificación o no y si hay diferencias entre las células sometidas a flujo y células no sometidas a flujo.

3.3.3 Inmunofluorescencia

Se realizó una inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos específicos frente a tubulina acetilada que es un componente principal del citoesqueleto y del cilio con el fin de comprobar si las células usadas tenían cilio. Para ello se usaron células raTAL no sometidas a flujo cultivadas sobre cubreobjetos y fijadas con PFA 4% en PBS (*Riedel-de Haën*), frente a un control positivo constituido por células en las que la presencia de cilio estaba demostrada.

Se permeabilizan las células con tritón 0,2% en PBS (Sigma), se lavan con PBS, se añade NH_4Cl 50 mM en PBS (Sigma) para reducir la autofluorescencia, se bloquea con PBS + BSA 0,1% + GS (suero de cabra) 10% (Sigma) para evitar la unión inespecífica de anticuerpos y se incuba con anticuerpo primario frente a tubulina acetilada (*Monoclonal anti-acetylated-tubulin clon* de Sigma) *overnight* a 4°C. Después se lava con la solución de bloqueo y se incuba con el anticuerpo secundario (un anticuerpo anti-IgG *goat anti-mouse* conjugado con A546 suministrado por el Unidad de Microscopía del IIS Aragón), se lava y se observa al microscopio invertido Olympus IX81 de la Unidad de Microscopía del IIS Aragón.

4. Resultados y discusión

4.1 Adaptación del cultivo de células a un sistema de medida de TEER

Lo primero que se llevó a cabo fue el cultivo de las células en las membranas semipermeables de dos materiales distintos, con el fin de comparar el crecimiento de las células así como su resistencia al flujo en ambos. Estos dos materiales fueron el policarbonato (PC) y polietilentereftalato (PET), siendo este último en el que las células crecían hasta la confluencia total (Figura 4.1). Además, al someter a las células a flujo tras realizar el montaje completo del dispositivo, las células sembradas en PC no resistían la fuerza del flujo y se levantaban en gran cantidad casi inmediatamente mientras que las células sembradas en el PET no se veían afectadas de ese modo.

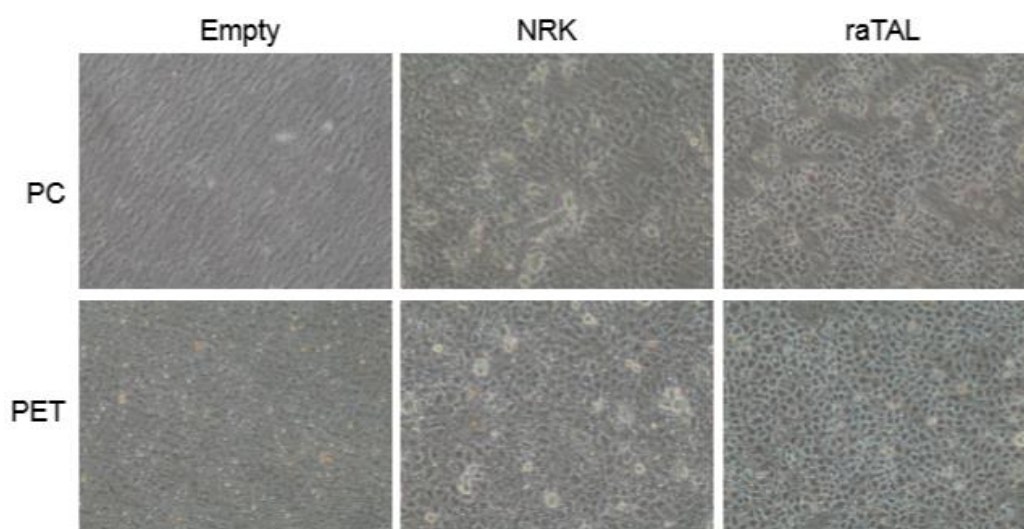


Figura 4.1 Comparación de la siembra de células sobre membranas semipermeables de policarbonato (PC) y polietilentereftalato (PET), a 100 aumentos. El PET es más efectivo como material sobre el que sembrar las células.

Se determinó experimentalmente que la concentración óptima de siembra de las células era de 96000 células/ml, añadiendo 300 μ l de la suspensión celular a cada canal para conseguir una monocapa confluyente a las 48 horas. A partir de ese valor, se pudo estimar la concentración óptima para la siembra en caso de requerir más o menos tiempo para conseguir esa monocapa confluyente.

4.2 Validación del sistema

Para validar el sistema, se llevó a cabo el test de calcio que consistió en lo siguiente: sembrar uno de los canales de la membrana semipermeable con células raTAL, sembrar otro con células NRK y el tercero sin células que usaremos como control; a continuación, se llevaba a cabo el montaje del sistema y se dejaba con un Ringer con calcio hasta que las medidas de TEER fueran estables con el tiempo; después se introducía el Ringer carente de calcio (y con un quelante de calcio), lo cual va a afectar a las uniones estrechas al ser un componente esencial para su estabilidad^{[35], [36]}, y cuando las medidas volviesen a ser estables con el tiempo se volvía a introducir el medio con calcio.

Los resultados obtenidos (Figura 4.2) al llevar a cabo este test permiten validar el sistema por varios motivos. Primero, la resistencia eléctrica que muestran las células raTAL (alrededor de 200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ al inicio) es mucho mayor que la obtenida con las NRK (alrededor de 25 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ al inicio) y esto es lo esperado si tenemos en cuenta que en el riñón de mamífero la permeabilidad paracelular disminuye desde el túbulo proximal hasta el túbulo colector^{[10], [11]} y las células raTAL son de un segmento (el asa de Henle) posterior al de las NRK (el túbulo proximal). Por otro lado, podemos observar que tras introducir el medio pobre en calcio la medida de la resistencia cae y al introducir de nuevo el medio con calcio esta resistencia va recuperándose, por lo que, efectivamente, estamos midiendo la permeabilidad por la ruta paracelular de una monocapa de células (por las uniones estrechas que se ven afectadas ante la falta de calcio) con la medida de la resistencia eléctrica transepitelial.

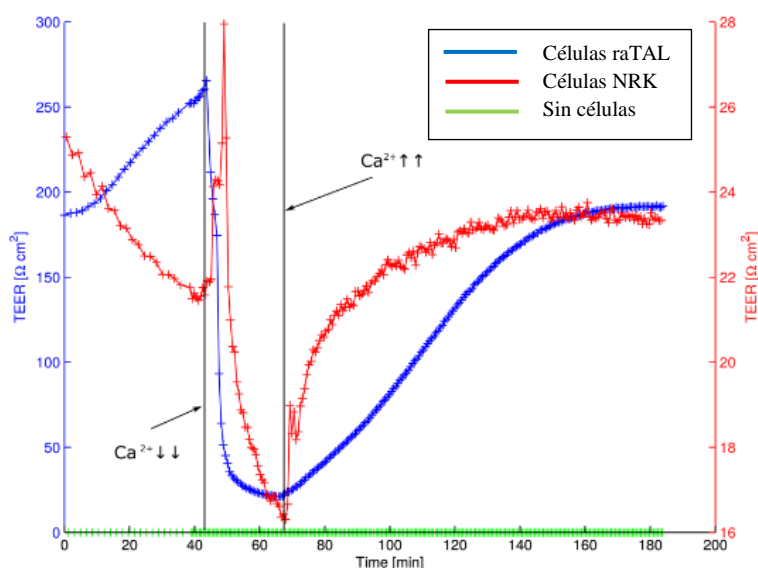


Figura 4.2 Test de Calcio. Canal 1: células raTAL; canal 2: células NRK; canal 3: vacío. Se observa cómo al quitar el calcio el TEER baja considerablemente y al volver a introducir calcio el TEER sube de nuevo hasta valores similares a los iniciales.

4.3 Identificación de parámetros externos que influyen en los valores de TEER

A lo largo de todos los experimentos realizados se han ido observando una serie de parámetros externos a las células que afectan a las medidas realizadas. Todos ellos se ven representados en el experimento que muestra la Figura 4.3. Se trata de un experimento en el que se sembraron células raTAL en los 3 canales, uno de ellos se mantuvo sin flujo, otro con flujo sólo por el compartimento apical y otro por el basal. Se pudo observar que las células sin flujo, al no renovar el medio con el que estaban en contacto, morían a las 24-48 horas como muestran las medidas en las que deja de medirse resistencia y como se pudo comprobar posteriormente con el microscopio invertido. Por otra parte, las células sobrevivieron tanto con sólo flujo apical como con sólo flujo basal, lo cual nos demuestra que la renovación de uno u otro únicamente es suficiente para el mantenimiento de las células.

Por otra parte, se pudo observar que cada vez que el sistema era sacado del incubador, se producía una alteración de las medidas. Como dentro del incubador se mantienen constantes la temperatura y la concentración de CO₂, uno de estos dos parámetros sería el responsable de esos cambios. En un experimento posterior (no mostrado), con las mismas células sembradas y condiciones de flujo, se cortó el suministro de CO₂ del incubador, manteniendo la temperatura constante, pudiendo observarse que el cambio en la concentración de CO₂ no era causante de esos cambios tan bruscos por lo que sería la temperatura lo que afecta a las medidas de nuestro sistema.

Como podemos observar en la Figura 4.3, se varió la frecuencia del registro del TEER para ver si la estimulación eléctrica asociada podía afectar también a las células. Lo que vemos es que el cambio en la frecuencia del estímulo a las células no produce cambios significativos en las medidas. Por tanto, en posteriores experimentos se utilizaron diferentes frecuencias de estimulación según las necesidades de tiempo en obtener medidas a tiempo real de cada uno de los experimentos.

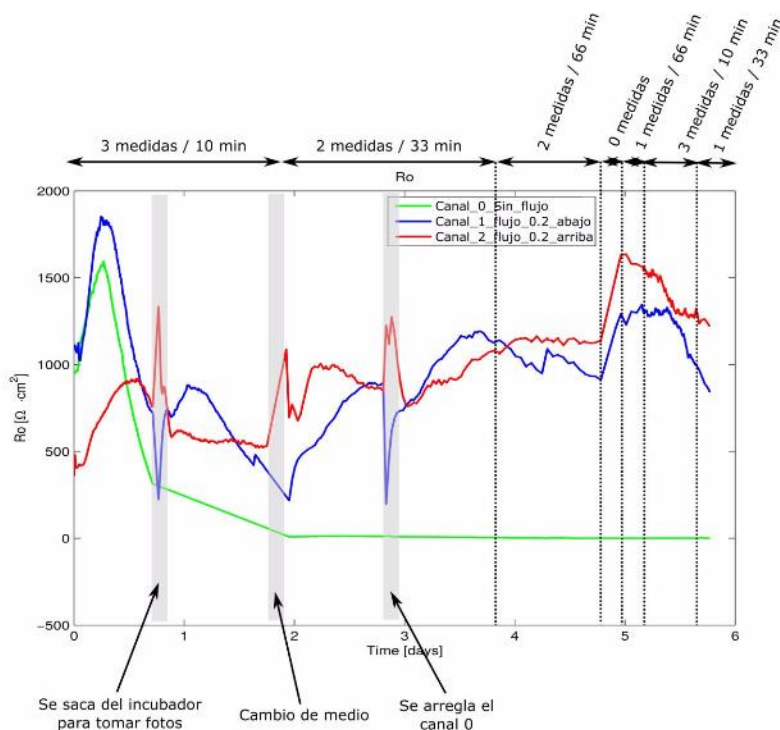


Figura 4.3 Respuesta de las células ante estimulación eléctrica y factores que afectan al TEER. Se aprecian el transitorio inicial, la alteración de las medidas por sacar el sistema del incubador, así como la aparente falta de efecto de una distinta frecuencia de medidas.

Hemos podido observar también un pico inicial en los valores de TEER que ocurre en todos los experimentos y que tiene una duración aproximada de un día. Lo hemos denominado transitorio y podría deberse a una respuesta de las células que se están adaptando al sistema en el que se les acaba de introducir. Como cabía esperar, y hemos podido ir comprobando a lo largo de todos experimentos, también la formación de burbujas altera las medidas al introducirse aire entre los electrodos de medida.

4.4 Efectos de la perfusión sobre los valores de TEER

Como se había observado en experimentos anteriores que con sólo flujo por abajo era suficiente para el mantenimiento de las células, se sometieron las células a flujo por abajo continuo y periodos sin flujo y a ciclos de flujo por arriba para determinar si eso variaba su respuesta y, por tanto, las medidas que obteníamos. Los resultados obtenidos en un experimento de este tipo con los tres canales con células raTAL los tenemos en la figura 4.4. Se pueden ver algunas variaciones en las medidas al parar el flujo o al volverlo a poner, concretamente se ve que sin flujo la resistencia va subiendo y con flujo baja y al volver a quitar el flujo vuelve a subir.

Ante estos resultados, lo siguiente fue llevar a cabo otro experimento, también con células raTAL, en el que se pusiesen distintas tasas de flujo (0,2 ml/min que es la que se puso para todos experimentos, 0,04 ml/min y 0,8 ml/min) para ver si ante mayor *shear stress* esos cambios eran mayores. Sin embargo, como se puede ver en la figura 4.5, no se apreciaban claramente diferentes respuestas ante distintas tasas de flujo, lo que lleva a pensar que no es el *shear stress* lo que está originando cambios medibles en las células. Cabe destacar que las células sembradas en el segundo canal se perdieron durante el montaje del dispositivo como indican las medidas y como se pudo comprobar posteriormente con el microscopio invertido.

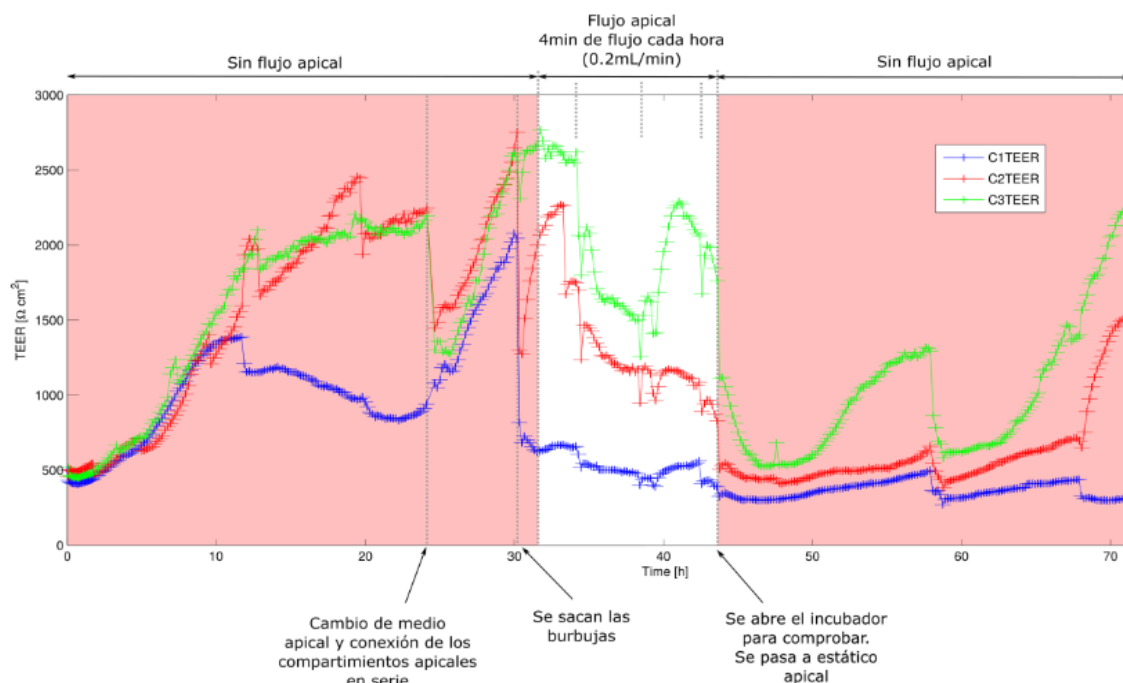


Figura 4.4. Efectos de la perfusión sobre las medidas del dispositivo. Se puede observar que sin flujo la resistencia va subiendo y con flujo baja.

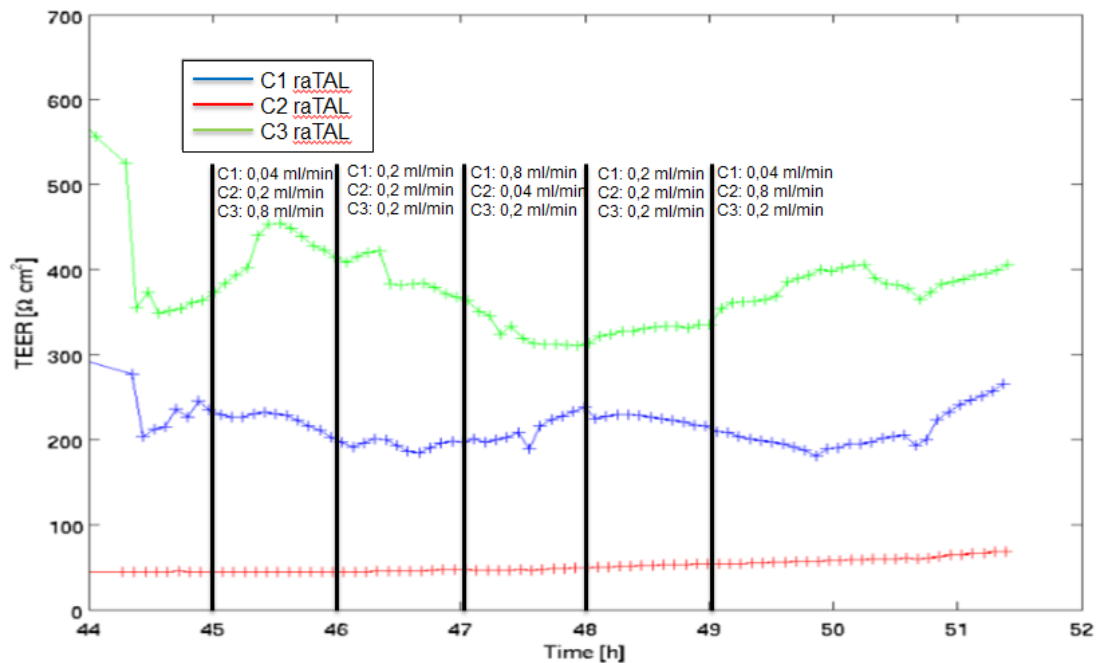


Figura 4.5. Efectos de distintas tasas de flujo sobre las medidas del dispositivo. No se ven diferencias claras entre distintas tasas de flujo, lo que parece indicar que los cambios no son debidos al *shear stress* sobre las células.

4.5. Efectos del *shear stress* sobre la expresión/fenotipo

Se llevó a cabo un estudio de expresión de células raTAL y NRK sometidas a distintos periodos de tiempo de flujo, así como de células raTAL que no habían sido sometidas a flujo. Para ello se aisló el ARN de las células y, tras pasarlo a ADNc, se realizó una PCR de distintos segmentos específicos de algunos genes de interés. Estos genes fueron KSP que es una cadherina específica del riñón, THP que es un marcador de asa de Henle, NKCC2 que también es un marcador de asa de Henle y se había observado que aparece en muestras obtenidas de riñón pero en las células mantenidas en cultivo desaparecía, α -SMA que es un marcador de estirpe mesenquimal (por tanto, de desdiferenciación) y tres claudinas (CL2, CL14 y CL19) que son proteínas de las uniones estrechas.

Los resultados obtenidos aparecen en la figura 4.6. Para las claudinas 14 y 19 vemos las bandas esperadas de 153 pb y 226 pb respectivamente en todos los casos excepto en algunas repeticiones en las que ha podido haber un fallo en la reacción de amplificación (Figura 4.6 D). En el caso de la Claudina 2 obtenemos la banda esperada a 168 pb en todos los casos excepto en la muestra de NRK (Figura 4.6 C) posiblemente por un fallo en la amplificación ya que la Claudina 2 sí que aparece en el túbulo proximal como vemos en la figura 1.1, y para KSP1 sí que vemos la banda esperada a 102 pb para todos los casos por lo que no hay expresión diferencial por efecto del flujo (Figura 4.6 A). En el caso de α -SMA, la banda esperada aparecería a 131pb y no podemos determinar que haya expresión en ningún caso (Figura 4.6 A) y para THP tenemos contaminación por ADN genómico por lo que tampoco podemos determinar que haya expresión (Figura 4.6 C). Por último, en el caso de NKCC2 se usaron primers para amplificar dos fragmentos distintos del gen y no vemos la banda esperada a 210 pb en el primer caso y contaminación por ADN genómico en el segundo (Figura 4.6 B). Por lo tanto, tampoco conseguimos ver claramente efectos del flujo en la expresión de genes de interés por parte de las células.

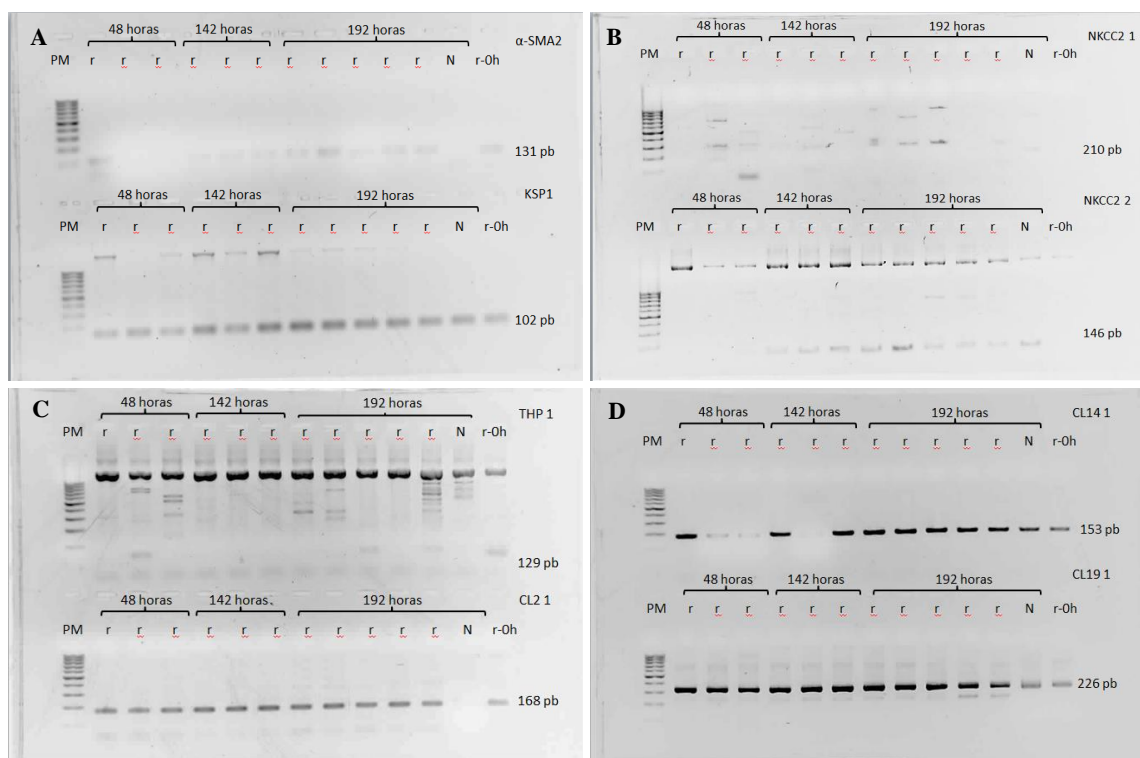


Figura 4.6. Estudio de expresión de células sometidas a flujo durante distintos tiempos. r: muestra de células raTAL sometidas a distintos tiempos de flujo; N: muestra de NRK sometida a 192 horas de flujo; PM: marcador de peso molecular. El tamaño de la banda esperada para cada gen se muestra a la altura a la que debería salir. Se pretendía comprobar si había expresión diferencial de los genes indicados en las células a distintos tiempos de flujo.

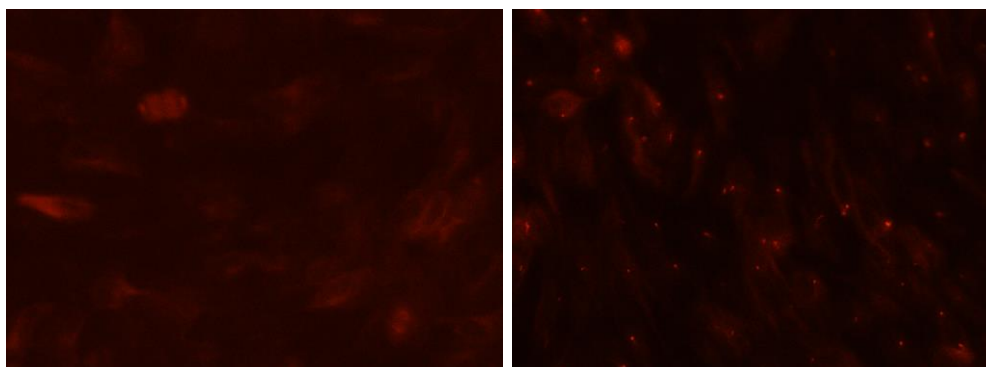


Figura 4.7. Tinción de inmunofluorescencia frente a tubulina acetilada de células raTAL (a la izquierda) frente a un control positivo (a la derecha), a 400 aumentos. Las células raTAL carecen de cilio que se vería como un punto brillante tras esta tinción.

Por último, se hizo una tinción de inmunofluorescencia frente a tubulina acetilada, ya que se había visto que los efectos del flujo pueden modular la estructura del citoesqueleto para reorientación y reestructuración celular^{[2], [23]}. Como la tubulina acetilada es un componente principal del citoesqueleto, también forma parte del cilio de las células que se ve como un punto brillante en este tipo de tinción. Tras el experimento, no se obtuvieron imágenes en las que se viese una tinción específica, lo que hizo sospechar que estas células no tuviesen cilio, así que lo que se hizo fue repetir la técnica usando como control un tipo celular que se había comprobado repetidas veces que sí tenía y

que se veía con esta técnica. Las imágenes obtenidas aparecen en la figura 4.7 y en ellas vemos que en las células raTAL que habían sido usadas para los experimentos con flujo carecen de cilio, frente a las otras en las que se ve claramente. Esta falta de cilio podría explicar la falta de respuesta al flujo ya que se trata del orgánulo que detecta los efectos del flujo produciendo efectos mecanotransductivos en el interior celular.

4.6 Efectos de la perfusión sobre el metabolismo energético de células raTAL

Con la intención de demostrar que este sistema puede servir para llevar a cabo experimentos en los que se pueda generar información sobre las células en cultivo, se llevó a cabo un estudio del metabolismo de las células renales que estaban siendo utilizadas. Para ello se recogían muestras del medio de cultivo tras experimentos en distintas condiciones y se analizaba la concentración de glucosa y lactato del mismo para compararlo con las concentraciones del medio fresco, ya que la producción de lactato es un indicador del metabolismo anaeróbico que llevan a cabo las células.

Las condiciones en las que estaban las células se plantearon para ver si el flujo influía en el metabolismo celular y eran 5 condiciones distintas: hubo células en estático en una placa de cultivo, células que tenían flujo sólo por el compartimento apical y se medían los dos metabolitos que estaban en el canal basal estático, células que tenían flujo sólo por el compartimento basal y se medían los dos metabolitos que estaban en el canal apical estático, células con flujo tanto en el canal apical como en el basal y de las cuales se medían los metabolitos del canal apical o basal independientemente.

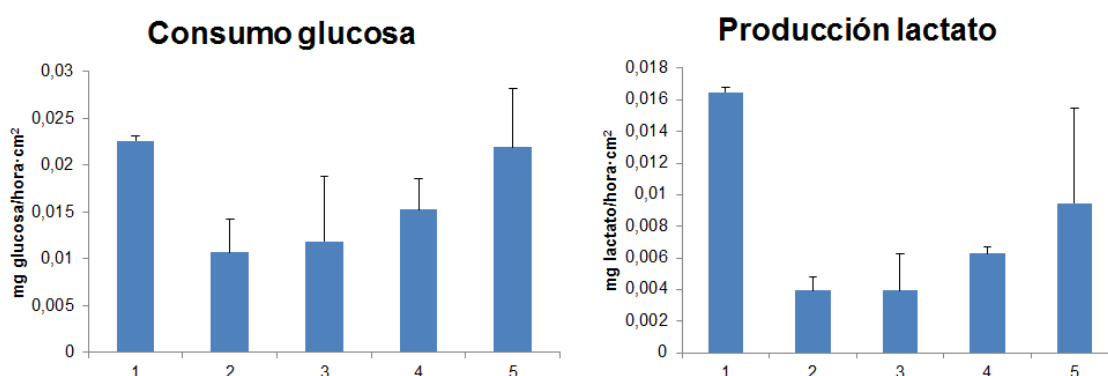


Figura 4.8. Tasas de consumo de glucosa y de producción de lactato de células raTAL en estático, sometidas a flujo sólo por un compartimento o sometidas a flujo por ambos compartimentos. (1) Células en estático, (2) células con flujo apical, (3) células con flujo apical y basal y medición del canal basal, (4) células con flujo basal, (5) células con flujo apical y basal y medición del canal apical. Las células en estático consumen más glucosa y producen más lactato, las células con flujo consumen más glucosa y producen más lactato por su lado apical.

A partir de las concentraciones de glucosa y lactato, el volumen de medio de cultivo, la superficie de células sembrada y el tiempo de exposición a las células, se calcularon las tasas de consumo de glucosa y de producción de lactato, que podemos ver en la figura 4.8. Lo que podemos observar es que tanto el consumo de glucosa como la producción de lactato es mayor en las células en estático que en las células sometidas a flujo y que en las células sometidas a flujo el consumo de glucosa y la producción de lactato es mayor en el lado apical que en el basal. Esto último parece indicar que la monocapa de células se encuentra polarizada a nivel de transportadores de los dos metabolitos teniendo más en el lado apical que en el basal y puede ser debido a que estas células normalmente

crecen en monocapa en frascos de cultivo donde sólo tienen acceso al medio por su lado apical por lo que han podido ser seleccionadas a lo largo de los subcultivos aquellas que captan la glucosa preferentemente por el lado apical.

El consumo en el lado basal es muy parecido tanto si este compartimiento permanece estático (Figura 4.8, condición 2) como si es perfundido (3). Sin embargo, desde el lado apical el consumo de glucosa y producción de lactato aumentan cuando se perfunde el medio (4) en comparación a cuando el medio permanece estático. En los compartimientos sin perfundir, las células tienen acceso a un volumen pequeño de medio en el que va a reducirse rápidamente la concentración de glucosa dificultándose su entrada al interior celular, reduciéndose así el consumo. Sin embargo, al aplicar un flujo, el medio se renueva constantemente permitiendo un mayor consumo, similar al que tienen las células en estático en una placa de cultivo con mayor volumen de medio. Este resultado está de acuerdo con el estrés observado en las medidas de TEER en epitelios sin perfusión apical, y permite concluir que la perfusión de medio contribuye al mantenimiento a largo plazo de un epitelio sano y funcional.

4.7 Medidas de la conductividad y estimación de flujos transepiteliales de iones

Para validar la medida de la conductividad por parte del dispositivo, llevamos a cabo un experimento con distintas soluciones que tenían distinta concentración de NaCl (140 mM y 70 mM de NaCl). El experimento parte de una membrana sembrada con células raTAL en dos canales y células NRK en el tercer canal.

A partir de este montaje, lo que se hacía era poner flujo con el medio con 140 mM de NaCl tanto en el compartimento apical como en el basal y esperar a que las medidas de conductividad que iban apareciendo se estabilizasen con el tiempo, tomando estas medidas como referencia; a continuación se introducía la solución de 70 mM de NaCl en el compartimento apical y se paraba el flujo del mismo compartimento, se cerraban las llaves de paso durante una hora y tras esa hora se recogía el medio del compartimento apical. Posteriormente se reproducía el mismo proceso pero a la inversa, es decir teniendo el medio con 140 mM en el compartimento apical y el de 70 mM en el basal. En el primer caso decimos que se produce un gradiente negativo y en el segundo un gradiente positivo, este proceso queda esquematizado en la Figura 4.9 A.

Con este experimento, se pretendía ver, a través de la medida de la conductividad por parte del dispositivo, si la concentración de iones tendía a equilibrarse a través de la monocapa de células y si lo hacía de forma más rápida en una dirección o en otra, es decir la capacidad de transporte paracelular de iones. Como se habían recogido los medios resultantes del experimento, se pudieron medir las concentraciones de iones con una técnica distinta, por parte de operarios del Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Miguel Servet que desconocían la procedencia de cada muestra, que pudiese confirmar las medidas obtenidas con nuestro sistema.

Lo primero que observamos en las medidas es que la monocapa de células NRK supone una barrera más abierta para el paso de los iones ya que la concentración de NaCl tiende a volver a 140 mM partiendo desde 70 mM mucho más rápido de lo que lo hace cuando la barrera está formada por células raTAL. Esto podemos apreciarlo en la figura 4.9 B en la que vemos cómo la conductividad medida por el dispositivo se acerca mucho más rápido al valor correspondiente a la solución con 140 mM en el canal en el que hay sembradas NRK que en los que hay sembradas raTAL. También podemos apreciarlo en la figura 4.9 C en la que vemos que la concentración alcanzada tras dos horas y media en los compartimentos que partían de 70 mM de NaCl es mayor en aquellos que tenían células NRK que en los que tenían raTAL. Esto era lo esperado ya que, como se ha comentado a lo largo del trabajo, en el riñón de mamífero la permeabilidad paracelular disminuye desde el túbulo proximal

hasta el túbulo colector^{[10], [11]} y las células raTAL son de un segmento (el asa de Henle) posterior al de las NRK (el túbulo proximal).

Además, como podemos ver en la figura 4.9 C, en el caso de una barrera de células raTAL el paso de iones es más rápido desde el compartimento apical al basal que desde el basal al apical, lo que indicaría que la monocapa de células se encuentra polarizada y es capaz de concentrar iones más rápido en un sentido que en otro.

Al medir la concentración de los iones de los medios obtenidos de los experimentos, vemos que los resultados coinciden con los obtenidos con las medidas de conductividad (Figura 4.9 D): tanto el sodio como el cloro tienen una velocidad de aparición (calculada restando la concentración del ion medida menos la concentración inicial que es 70 mM y dividido por el tiempo que ha durado el tránsito de iones) en los compartimentos con 70 mM inicialmente mayor en aquellos con la barrera formada por células NRK que en aquellos con la barrera formada por células raTAL; además, la velocidad de aparición de ambos iones es mayor en el compartimento basal que en el apical cuando hay una monocapa de células raTAL lo que coincide con las medidas anteriores en las que pasaba más rápido del apical al basal. También podemos ver que el cloro parece que pasa más rápido a través de la monocapa de células que el sodio

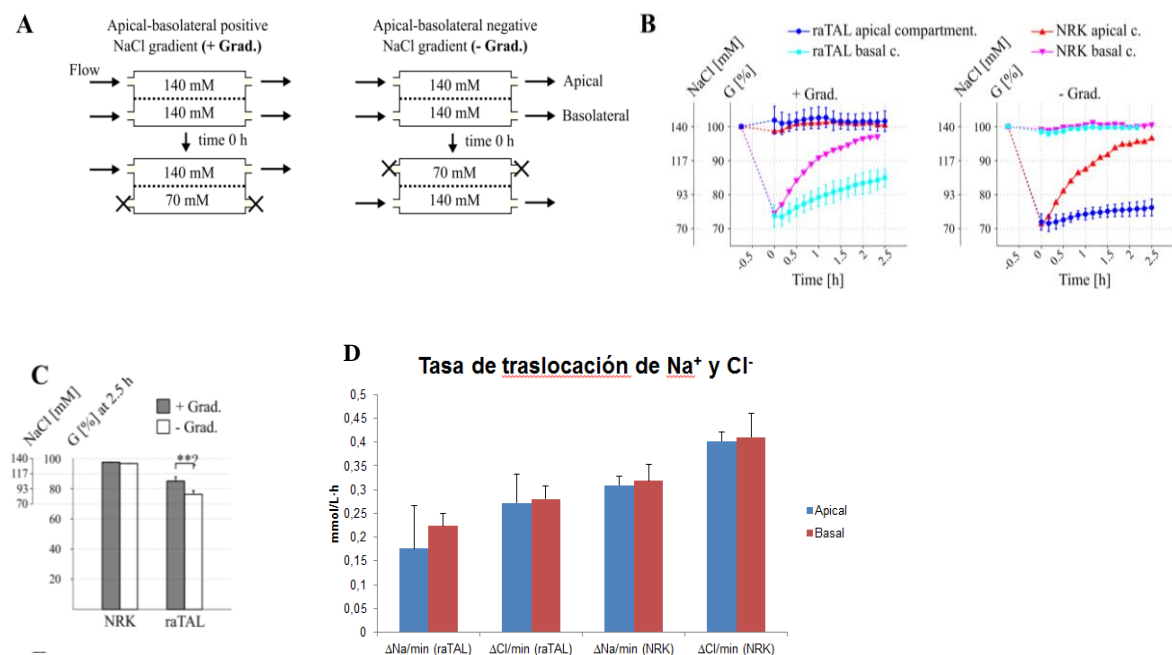


Figura 4.9 Experimento de iones. (A) Esquema del experimento. (B) Medidas de conductividad del dispositivo. (C) Concentración de NaCl alcanzada por el compartimento con 70 mM de NaCl al comienzo del experimento con respecto a su valor de inicio en cada tipo celular. (D) Tasa de traslocación de los iones sodio y cloro en los compartimentos con 70 mM de NaCl inicialmente a través de la monocapa de células NRK o de células raTAL. El paso de iones es más rápido a través de una monocapa de células NRK que a través de una de células raTAL y, en el caso de una monocapa de células raTAL el paso de iones es más rápido desde el compartimento apical al basal que desde el basal al apical.

5. Conclusiones

Para cerrar el trabajo, aquí se recogen las conclusiones obtenidas del mismo:

1. El PET constituye el mejor material para sembrar las células dentro del dispositivo desarrollado y la concentración óptima de siembra de las células es de 96000 células/ml, añadiendo 300 µl de la suspensión celular para conseguir una monocapa confluyente a las 48 horas.
2. El sistema desarrollado es capaz de medir la permeabilidad por la ruta paracelular de una monocapa de células haciendo uso de la medida de la resistencia eléctrica transepitelial.
3. Un sistema con flujo permite el mantenimiento de las células durante un tiempo prolongado.
4. Las variaciones de temperatura y la formación de burbujas constituyen factores que alteran las medidas del sistema desarrollado, pero no la variación de la frecuencia de las medidas o la variación de CO₂.
5. El flujo no parece tener efectos en las células raTAL, ni sobre el TEER ni sobre la expresión de genes de interés, lo cual puede ser debido a que las células raTAL no tienen cilio.
6. El flujo permite que el consumo de glucosa y producción de lactato de las células sea muy parecido al que tendrían con mayor disponibilidad de medio.
7. Las células raTAL forman una monocapa de células polarizada a nivel de transportadores de glucosa y lactato y a nivel de transporte de sodio y cloro en una determinada dirección preferentemente.
8. El sistema desarrollado constituye un método de medida fiable de la integridad de la monocapa así como de la conductividad del medio. También permite generar gran cantidad de datos de distintos aspectos simultáneamente para el estudio de células epiteliales.

5. Conclusions

To conclude the work, here are the conclusions obtained from it:

1. PET is the best material to grow the cells on the device developed and the optimal seed cell density is 96000 cells/ml, adding 300 µl of the cell suspension to obtain a confluent cell layer in 48 hours.
2. The optimized system is able to measure the paracellular permeability of a cell layer by using the measure of transepithelial electrical resistance.
3. A system with flow allows to maintain cells during a large period of time.
4. Variations in temperature and bubbles formation in the chambers modify measures carried out by the device, while variations in CO₂ or in the frequency of the measurements taken do not have that effect.
5. The flow seems to have no effects on the raTAL cells, on the TEER or on the expression of target genes, probably because of the lack of cillium by the raTAL cells.
6. The flow makes the cells to have a similar glucose consumption and lactate production to the one they have when more culture medium is available.
7. The raTAL cells form a polarized cell monolayer in view of the glucose and lactate transporters and of the sodium and chloride ions transport in a preferent direction.
8. The system provides a reliable method to measure the integrity of a cell monolayer and the conductivity of the medium. It also generates a large amount of data regarding to different aspects simultaneously to study epithelial cells,

6. Bibliografía

- [1] González-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2008;1778(3):729-756.
- [2] Zihni C, Mills C, Matter K, Balda M. Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2016;17(9):564-580.
- [3] P.R. Dragsten, R. Blumenthal, J.S. Handler, Membrane asymmetry in epithelia: is the tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? *Nature* 294 (1981) 718-722
- [4] L.J. Mandel, R. Bacallao, G. Zampighi, Uncoupling of the molecular ‘fence’ and paracellular ‘gate’ functions in epithelial tight junctions, *Nature* 361 (1993) 552-555.
- [5] E. Lopez-Bayghen, B.E. Jaramillo, M. Huerta, A- Betanzos, L. Gonzalez-Mariscal, Tight junction proteins that make round trips to the nucleus, in: L. Gonzalez-Mariscal (Ed.), *Tight Junctions*, Landes and Springer Science, Georgetown and New York, 2006, pp. 76-100.
- [6] S. Amasheh, N. Meiri, A.H. Gitter, Claudin-2 forms cation selective pores in tight junctions of epithelial cells, *Gastroenterology* 122 (2002) A18.
- [7] D.B. Simon, Y. Lu, K.A. Choate, H. Velazquez, E. Al Sabban, M. Praga, G. Casari, A. Bettinelli, G. Colussi, J. Rodriguez-Soriano, D. McCredie, D. Milford, S. Sanjad, R.P. Lifton, Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption, *Science* 285 (1999) 103-106.
- [8] A.S. Yu, A.H. Enck, W.I. Lencer, E.E. Schneeberger, Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation, *J. Biol Chem.* 278 (2003) 17350-17359.
- [9] M. Saitou, M. Furuse, H. Sasaki, J.D. Schulzke, M. Fromm, H. Takano, T. Noda, S. Tsukita, Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands, *Mol. Biol. Cell* (2000) 4131-4142.
- [10] Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S: Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 13: 875–886, 2002
- [11] Gonzalez-Mariscal L, Namorado MC, Martin D, Luna J, Alarcon L, Islas S, Valencia L, Muriel P, Ponce L, Reyes JL: Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules. *Kidney Int* 57: 2386– 2402, 2000
- [12] Denker B, Sabath E. The Biology of Epithelial Cell Tight Junctions in the Kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011;22(4):622-625.
- [13] Muto S, Hata M, Taniguchi J, Tsuruoka S, Moriwaki K, Saitou M, Furuse K, Sasaki H, Fujimura A, Imai M, Kusano E, Tsukita S, Furuse M: Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 8011–8016, 2010
- [14] Gunzel D, Haisch L, Pfaffenbach S, Krug SM, Milatz S, Amasheh S, Hunziker W, Muller D: Claudin function in the thick ascending limb of Henle’s loop. *Ann N Y Acad Sci* 1165: 152–162, 2009
- [15] Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP: Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. *Science* 285: 103–106, 1999
- [16] L. Gonzalez-Mariscal, A. Avila, A. Betanzos, The relationship between structure and function of tight junctions, in: M. Cereijido, J.M. Anderson (Eds.), *Tight Junctions*, CRC Press, Boca Raton, 2011, pp. 89-120
- [17] Srinivasan B, Kolli A, Esch M, Abaci H, Shuler M, Hickman J. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. *Journal of Laboratory Automation*. 2015;20(2):107-126.
- [18] Benson K, Cramer S, Galla H. Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond. *Fluids and Barriers of the CNS*. 2013;10(1):5.

- [19] Benson, K.; Cramer, S.; Galla, H. J. Impedance-Based Cell Monitoring: Barrier Properties and Beyond. *Fluids Barriers CNS*. 2013, 10, 5.
- [20] Jovov, B.; Wills, N. K.; Lewis, S. A. A Spectroscopic Method for Assessing Confluence of Epithelial-Cell Cultures. *Am. J. Physiol.* 1991, 261, C1196–C1203.
- [21] Douville, N. J.; Tung, Y. C.; Li, R.; et al. Fabrication of Two-Layered Channel System with Embedded Electrodes to Measure Resistance across Epithelial and Endothelial Barriers. *Anal. Chem.* 2010, 82, 2505–2511
- [22] Siddharthan, V.; Kim, Y. V.; Liu, S.; et al. Human Astrocytes/ Astrocyte-Conditioned Medium and Shear Stress Enhance the Barrier Properties of Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Brain Res.* 2007, 1147, 39–50.
- [23] Galbraith, C. G.; Skalak, R.; Chien, S. Shear Stress Induces Spatial Reorganization of the Endothelial Cell Cytoskeleton. *Cell. Motil. Cytoskeleton.* 1998, 40, 317–330.
- [24] Booth, R.; Kim, H. Characterization of a Microfluidic In Vitro Model of the Blood-Brain Barrier (muBBB). *Lab Chip.* 2012, 12, 1784–1792.
- [25] Kim, H. J.; Huh, D.; Hamilton, G.; et al. Human Gut-on-a-Chip Inhabited by Microbial Flora That Experiences Intestinal Peristalsis-Like Motions and Flow. *Lab Chip.* 2012, 12, 2165–2174.
- [26] Huh, D.; Fujioka, H.; Tung, Y. C.; et al. Acoustically Detectable Cellular-Level Lung Injury Induced by Fluid Mechanical Stresses in Microfluidic Airway Systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007, 104, 18886–18891.
- [27] Douville N, Tung Y, Li R, Wang J, El-Sayed M, Takayama S. Fabrication of Two-Layered Channel System with Embedded Electrodes to Measure Resistance Across Epithelial and Endothelial Barriers. *Analytical Chemistry*. 2010;82(6):2505-2511.
- [28] Ferrell N, Desai R, Fleischman A, Roy S, Humes H, Fissell W. A microfluidic bioreactor with integrated transepithelial electrical resistance (TEER) measurement electrodes for evaluation of renal epithelial cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010;107(4):707-716.
- [29] Huh, D.; Kim, H. J.; Fraser, J. P.; et al. Microfabrication of Human Organs-on-Chips. *Nat. Protoc.* 2013, 8, 2135– 2157
- [30] Zucco, F.; Batto, A. F.; Bises, G.; et al. An Inter-Laboratory Study to Evaluate the Effects of Medium Composition on the Differentiation and Barrier Function of Caco-2 Cell Lines. *Atla- Altern. Lab. Anim.* 2005, 33, 603–618.
- [31] Duan, Y.; Gotoh, N.; Yan, Q. S.; et al. Shear-Induced Reorganization of Renal Proximal Tubule Cell Actin Cytoskeleton and Apical Junctional Complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008, 105, 11418–11423.
- [32] Henry O, Villenave R, Cronic M, Leineweber W, Benz M, Ingber D. Organs-on-chips with integrated electrodes for trans-epithelial electrical resistance (TEER) measurements of human epithelial barrier function. *Lab Chip.* 2017;.
- [33] Maoz B, Herland A, Henry O, Leineweber W, Yadid M, Doyle J et al. Organs-on-Chips with combined multi-electrode array and transepithelial electrical resistance measurement capabilities. *Lab Chip.* 2017;.
- [34] Eng B, Mukhopadhyay S, Vio C, Pedraza P, Hao S, Battula S et al. Characterization of a long-term rat mTAL cell line. *AJP: Renal Physiology*. 2007;293(4):F1413-F1422.
- [35] Cereijido M. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *The Journal of Cell Biology*. 1978;77(3):853-880.
- [36] Martinez-Palomo A. Experimental modulation of occluding junctions in a cultured transporting epithelium. *The Journal of Cell Biology*. 1980;87(3):736-745.

Anexo 1: Composición de los medios

Medio MCR	Concentración
DMEM: F12 MIX	500 ml
Suero fetal bovino	2%
Penicilina-Estreptomicina-Anfotericina B	100 uds/ml-100 uds/ml-25 µg/ml
Insulina	5 µg/ml
Transferrina	5 µg/ml
Selenio	60 nM
Dexametasona	$5 \cdot 10^{-8}$ M
T3	10^{-9} M
EGF	10 ng/ml

	Ringer	No Cl	No Na	No Ca
NaCl	140 mM	-	-	140 mM
KCl	4 mM	-	4 mM	4 mM
NaGluc	-	140 mM	-	-
KGluc	-	4 mM	-	-
NMG-Cl	-	-	140 mM	-
MgCl ₂	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
CaCl ₂	1 mM	1 mM	1 mM	-
Glucosa	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
Hepes	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM

Anexo 2: Secuencias de *primers*

<i>PFKSPRN1</i>	<i>TTCCCAGTTCAGCCTTTACC</i>
<i>PRKSPRN1</i>	<i>TTCAAGGGCATGATCTAGGG</i>
<i>PFASMARN2</i>	<i>TTGACATCAGGAAGGACCTC</i>
<i>PRASMARN2</i>	<i>TATTTGCGTTCTGGAGGAGC</i>
<i>PFTHPRN1</i>	<i>GACTGCGTATCTGATAACGG</i>
<i>PRTHPRN1</i>	<i>AAGCCCAAACCTCTGTAGCTG</i>
<i>PFNK2RN1</i>	<i>AACAGACACCACGTTTCACG</i>
<i>PRNK2RN1</i>	<i>TCCCATCTCCATTAGCAACC</i>
<i>PFNK2RN2</i>	<i>GTTTGTCATCAACTGGTGGG</i>
<i>PRNK2RN2</i>	<i>CCAGAGCATTGTCTAAAGCG</i>
<i>PFCL2RN1</i>	<i>GTTCTTATGTTGGTGCCAGC</i>
<i>PRCL2RN1</i>	<i>ACTGGATGTCACCATCATGG</i>
<i>PFCL14RN1</i>	<i>TAGGCTTCCTGCTTAGCTTC</i>
<i>PRCL14RN1</i>	<i>GATCTGACACTGGTAGATGC</i>
<i>PFCL19RN1</i>	<i>CATATCCAGTCAGCAAGAGC</i>
<i>PRCL19RN1</i>	<i>GGTTGAAGAATTCCTGGGTC</i>