

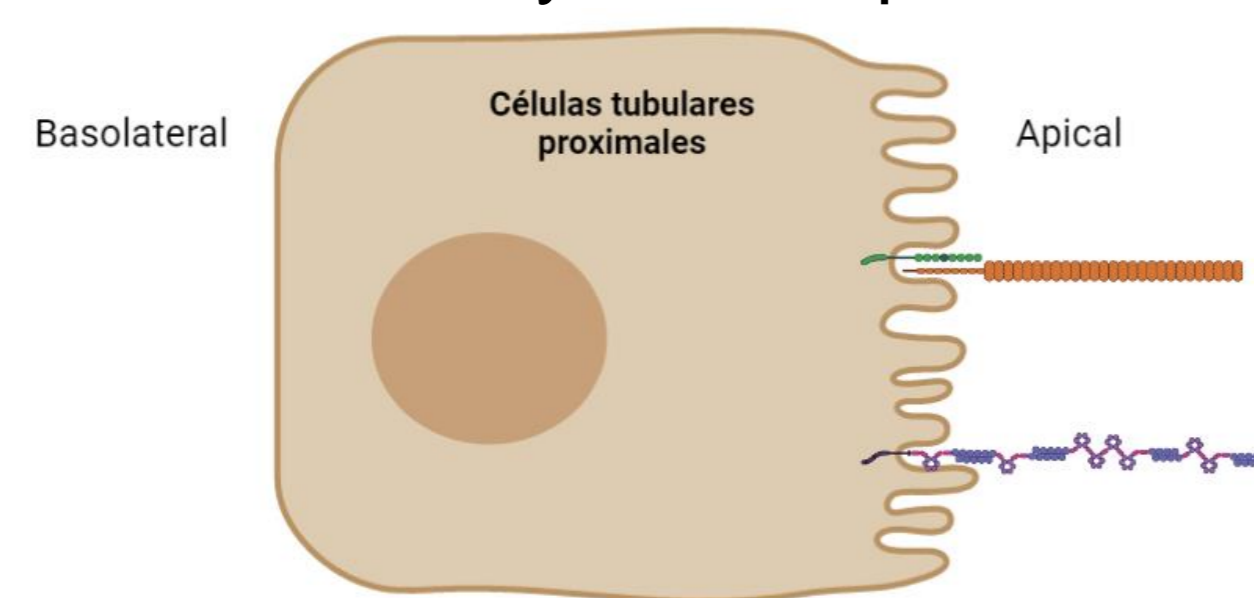
Las células RPTEC/TERT1 cultivadas en monocapa no son adecuadas para valorar la absorción de la Apolipoproteína A-I (ApoA-I) debido a que carecen del complejo Cubilina-Amnionless (CubAm).

Carmen Llorens-Cebrià¹, Mónica Duran², Irene Martínez-Díaz¹, Pamela Domínguez-Báez¹, Yolanda Villena-Ortiz³, Gerard Cantero-Recasens², María José Soler¹, Joan Lopez-Hellín³, Conxita Jacobs-Cachá¹

¹Grupo de Nefrología y Trasplante. Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Vall d'Hebron Hospital Universitari, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus. Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. ²Grupo de Fisiopatología Renal-CIBBIM. Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Vall d'Hebron Hospital Universitari, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus. Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. ³Departamento de Bioquímica Clínica. Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Vall d'Hebron Hospital Universitari, Vall d'Hebron Barcelona Hospital Campus. Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain.

INTRODUCCIÓN

Las células epiteliales del túbulo renal proximal (RPTEC) son responsables de la reabsorción de solutos y proteínas. Se ha descrito que la línea celular RPTEC/TERT1 humana expresa diversos transportadores, incluyendo el complejo cubilina-amnionless-megalina, responsable de la absorción de un amplio rango de proteínas filtradas. Por ello, esta línea celular se considera un referente para realizar ensayos de endocitosis de proteínas mediado por receptor. Muchas lipoproteínas interactúan con megalina para reabsorberse, menos ApoA-I que depende de cubilina-amnionless. En este estudio quisimos confirmar si megalina y el complejo CubAm estaban correctamente expresados y localizados en la membrana celular de las células RPTEC/TERT1 para realizar ensayos de captación de ApoA-I.



MATERIAL Y MÉTODOS

Primero se comprobó la especificidad de los anticuerpos contra cubilina, amnionless y megalina seleccionados (AF3700, AF1860 y MAB9578, respectivamente) mediante inmunofluorescencia usando cortes histológicos de tejido renal humano sano. A continuación, se cultivaron las células RPTEC/TERT1 para confirmar la presencia de cubilina, amnionless y megalina en la membrana celular. Para ello, realizamos dos aproximaciones:

- Cultivo en placas convencionales durante siete días para estudiar la expresión génica mediante RT-PCR y la expresión proteica mediante inmunofluorescencia (Fig. 1A).
- Cultivo en *transwells* durante tres semanas para inducir polarización y estudiar su expresión proteica mediante inmunofluorescencia (Fig. 1B). Como control de polarización se inmunodetectó mucina-1 de forma simultánea (MA106503).

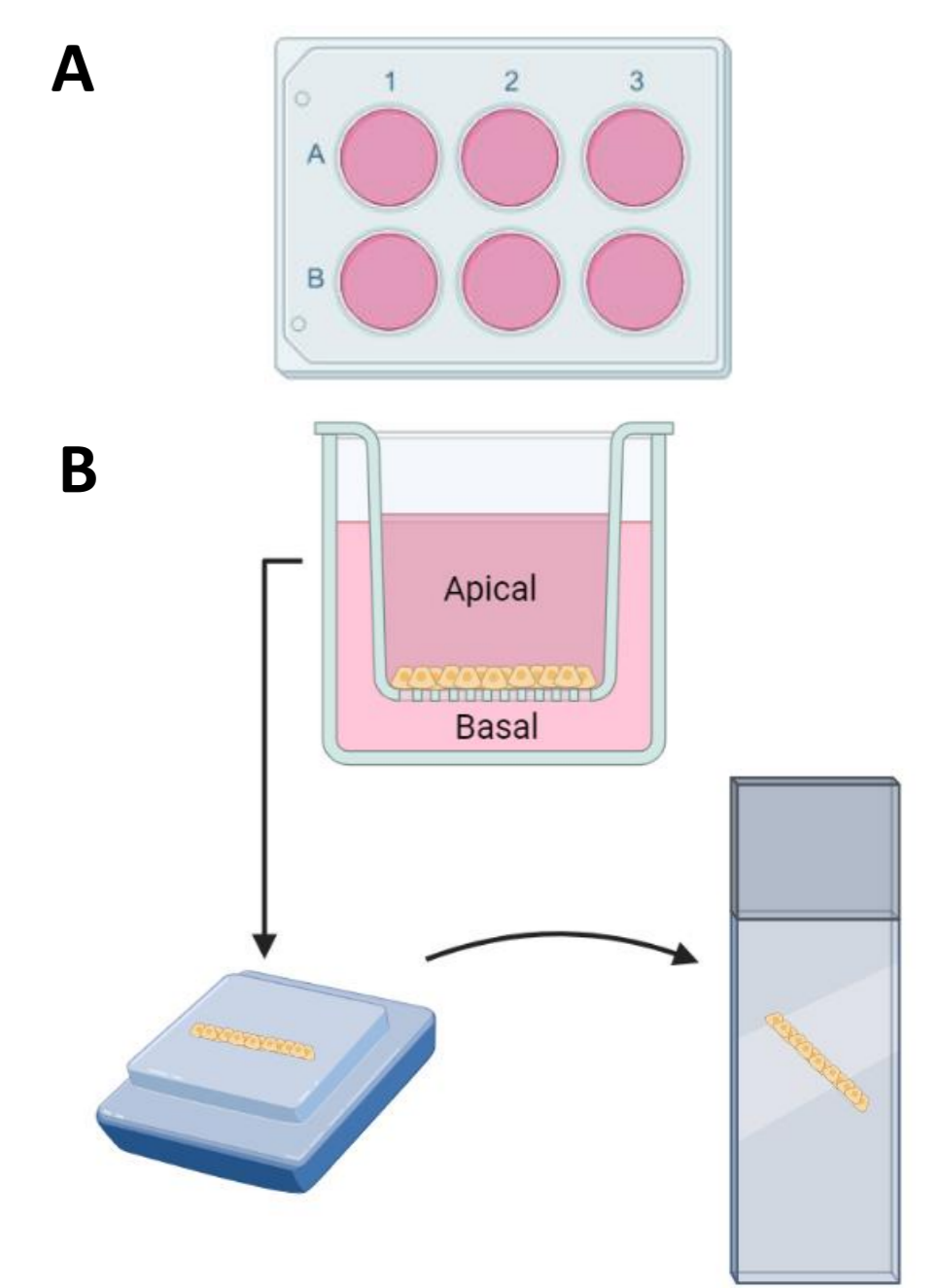


Figura 1. Esquema de las aproximaciones realizadas con células RPTEC/TERT1. A: Cultivo en placas convencionales. B: Cultivo en *transwells* y preparación para su estudio mediante inmunofluorescencia.

RESULTADOS

Para comprobar la especificidad de los anticuerpos contra cubilina, amnionless y megalina realizamos inmunofluorescencia en tejido renal humano sano. Como se esperaba, tanto cubilina, amnionless como megalina se encontraban en el borde apical de células tubulares proximales confirmando la especificidad de los anticuerpos (Fig. 2). Seguidamente se cultivaron células RPTEC/TERT1 en placas convencionales y se analizó tanto la expresión génica como la localización mediante inmunofluorescencia de cubilina, amnionless y megalina. Aunque se pudo detectar expresión génica de cubilina, amnionless y megalina en las células RPTEC/TERT1 (Fig. 3A), los análisis de inmunocitoquímica revelaron que solo megalina se encontraba en la membrana celular mientras que cubilina no se expresaba y amnionless se detectaba en el núcleo (Fig. 3B). Finalmente, para inducir polarización de las células, cultivamos las células RPTEC/TERT1 en *transwells* durante tres semanas. Como se muestra en la Figura 4, las células se polarizaron correctamente dado que mucina se encontraba en la membrana apical de la células. A pesar de esto, ni cubilina ni amnionless, se encontraban en la membrana apical (Fig. 4) sugiriendo que el complejo cubilina-amnionless no es funcional en la línea celular RPTEC/TERT1.

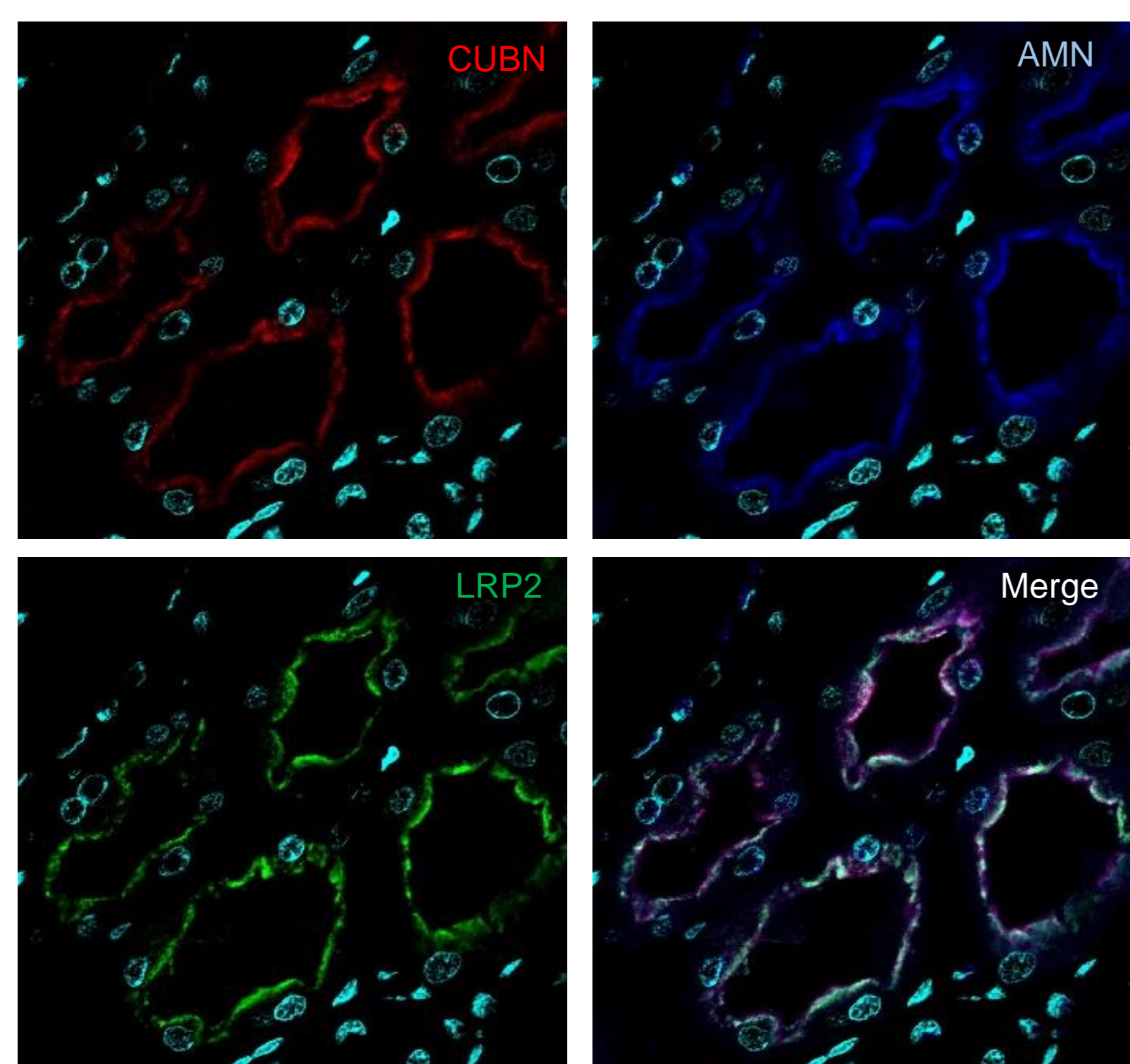


Figura 2. Cubilina (CUBN), amnionless (AMN) y megalina (LRP2) se localizan en el borde apical de las células tubulares proximales de tejido renal humano. CUBN (en rojo), AMN (en azul) y LRP2 (en verde) se detectaron mediante inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos. Los núcleos se marcaron con Hoechst (en cian).

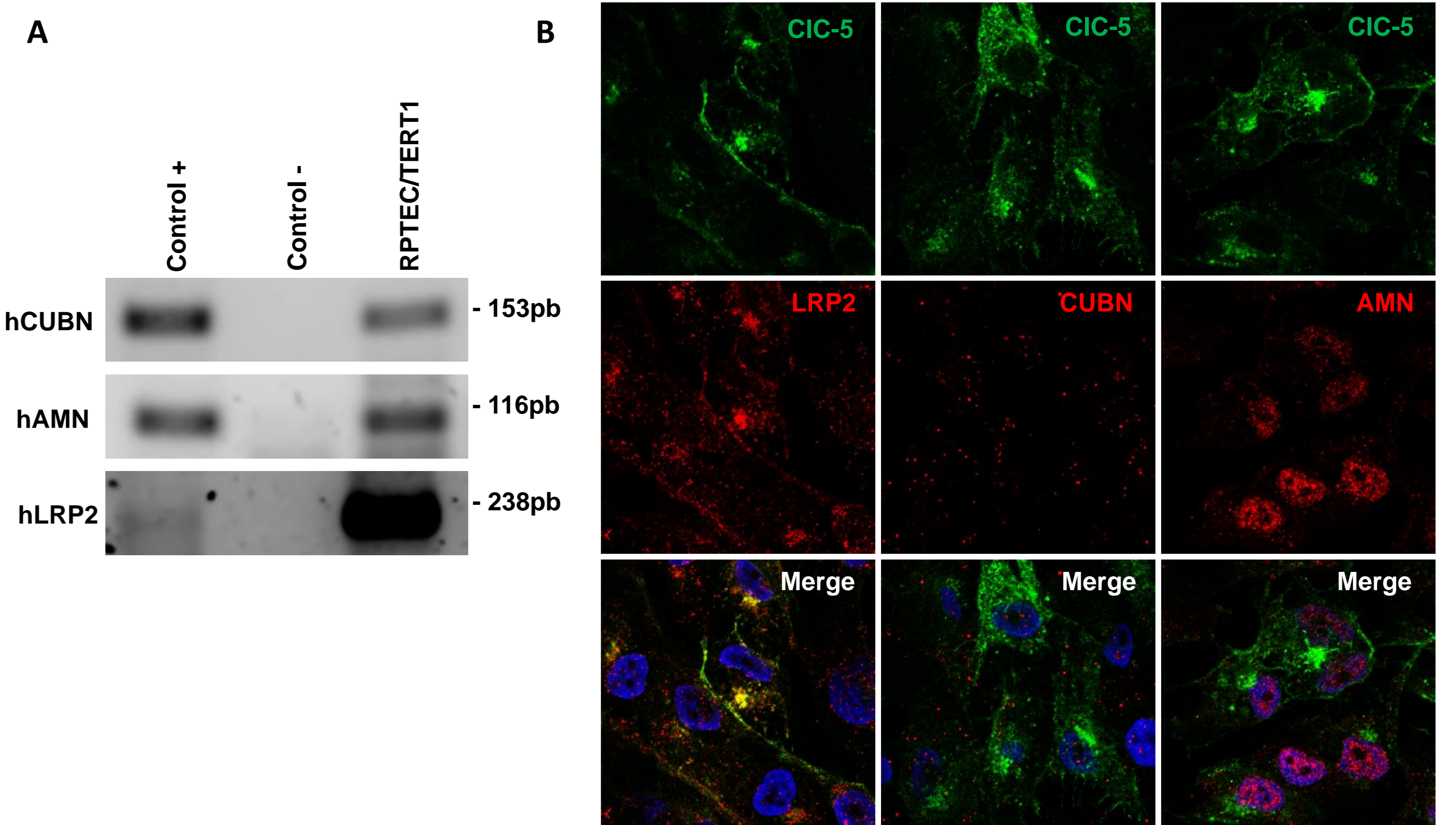


Figura 3. Expresión génica y proteica de megalina (LRP2), cubilina (CUBN) y amnionless (AMN) en RPTEC/TERT1 cultivadas en placas convencionales. A: Expresión génica de megalina (LRP2), cubilina (CUBN) y amnionless (AMN) en el cultivo celular de RPTEC/TERT1 realizado mediante RT-PCR. B: Co-tinción de megalina (LRP2), cubilina (CUBN) y amnionless (AMN) con el canal de cloro 5 (CIC-5) en células tubulares en cultivo RPTEC/TERT1. Megalina, cubilina y amnionless (en rojo) fueron detectadas mediante inmunocitoquímica usando anticuerpos específicos. CIC-5 se detectó para delimitar la célula y marcar la membrana celular (en verde). Los núcleos se marcaron con Hoechst (en azul).

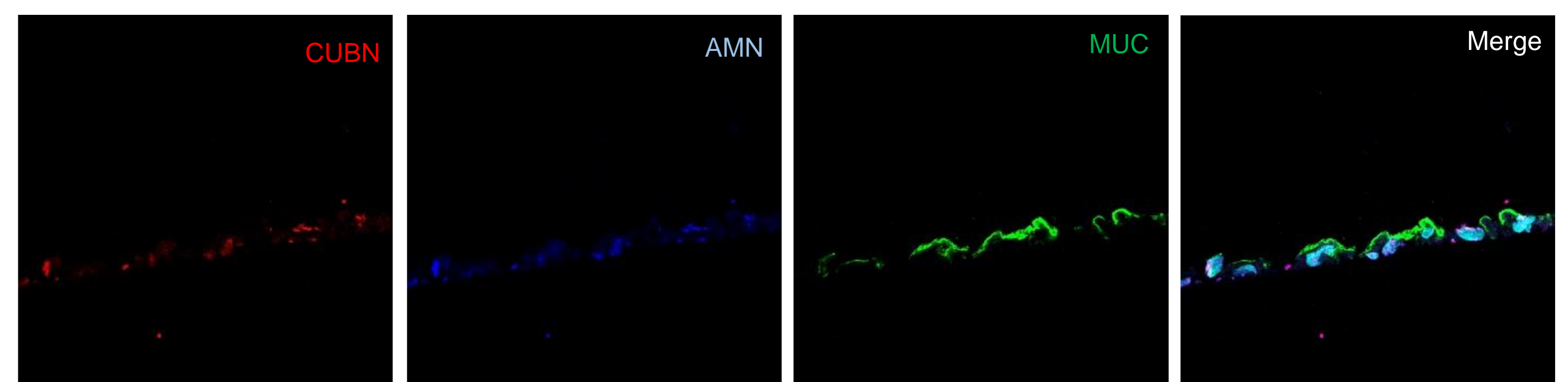


Figura 4. Co-tinción de cubilina (CUBN) y amnionless (AMN) con mucina (MUC) en células tubulares en cultivo *transwell* de RPTEC/TERT1. CUBN (en rojo), AMN (en azul) y MUC (en verde) se detectaron mediante inmunofluorescencia usando anticuerpos específicos. Los núcleos se marcaron con Hoechst (en cian).

CONCLUSIÓN

La línea celular RPTEC/TERT1 expresa cubilina, amnionless y megalina a nivel de RNA, pero solo megalina se pudo localizar en la membrana celular. Aunque más investigación es necesaria, nuestros resultados sugieren que este modelo celular no es adecuado para realizar ensayos de endocitosis de ApoA-I ya que carecen del complejo CubAm en la membrana celular.

