



## TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster Biología Molecular y Celular

# **Cambios en la expresión del metabolismo en células renales del túbulo proximal humano. Efectos del *shear stress*.**

Marina Parres Mercader

Directores:

Dr. Ignacio Giménez López/Dra. Patricia Meade Huerta

Departamento de Fisiología y Farmacología

2020



## INDICE

Resumen.....	1
Abstract .....	2
1. Introducción .....	3
1.1 El túbulo proximal en el riñón .....	3
1.2 Flujo laminar y <i>shear stress</i> .....	4
1.3 Detección del <i>shear stress</i> . El cilio primario.....	6
1.4 Metabolismo energético de las células del túbulo proximal .....	7
1.5 Vías de detección de nutrientes.....	8
1.5.1 Proteína AMPK .....	9
1.5.2 Proteína mTOR .....	9
1.6 <i>Shear stress</i> y cambios en la expresión del metabolismo.....	10
1.7 Edición génica.....	11
2. Hipótesis.....	13
3. Objetivos .....	13
4. Metodología .....	14
4.1 Línea celular .....	14
4.2 Determinación de los cambios en la expresión del metabolismo .....	14
4.2.1 Cultivo de células RPTEC en dispositivos fluídicos .....	14
4.2.2 Sistema de flujo .....	15
4.2.3 Condiciones del cultivo en experimentos de perfusión .....	15
4.2.4 Análisis de la expresión génica por RT-PCR y qPCR.....	17
4.3 Análisis de los niveles de oxígeno en el sistema de flujo.....	19
4.4 Generación <i>knock-out</i> mediante el sistema CRISPR .....	20
4.4.1 Plásmidos empleados .....	20

4.4.2 Transfección mediante liposomas.....	21
4.4.3 Selección mediante FACS .....	22
4.4.4 Selección mediante resistencia antibiótica. Curva sensibilidad a Puromicina.	23
5. Resultados .....	25
5.1 Análisis consumo de oxígeno .....	25
5.2 Análisis de los cambios en la expresión génica .....	27
5.2.1 Comparativa de la expresión entre canales de una misma condición.....	27
5.2.2 Análisis de la expresión de genes relacionados con el metabolismo celular.	29
5.2.3 Análisis de la expresión de genes relacionados con daño y fibrosis celular ..	30
5.3 Generación knock-out mediante el sistema CRISPR/Cas.....	32
5.3.1 Optimización de la transfección .....	32
5.3.2 Selección mediante FACS .....	34
5.3.3 Transfección del sistema CRISPR/Cas.....	36
5.3.4 Curva de sensibilidad de las células RPTEC a Puromicina .....	37
6. Discusión .....	40
7. Conclusiones.....	44
8. Conclusions.....	45
9. Bibliografía.....	46
10. Anexo I. Plásmidos transfecciones .....	54



## RESUMEN

Las células del túbulo proximal renal están continuamente expuestas al estímulo mecánico que genera el filtrado glomerular. Este estímulo, denominada *shear stress*, induce cambios a nivel fenotípico y también funcional, por lo que es de vital importancia reproducir este entorno para estudiar estas células *in vitro*. El siguiente estudio se centra en determinar cambios en la expresión génica del metabolismo de las células RPTEC sometidas a *shear stress*. Se analiza también el consumo de oxígeno y por último se pretende generar un *knock-out* para la proteína AMPK, encargada de regular la homeostasis energética. Los resultados obtenidos muestran un aumento en la captación de oxígeno de las células sometidas a *shear stress*, pudiéndose relacionar con un incremento en la actividad metabólica. Sin embargo, y aunque se detectan ciertos cambios en los niveles de expresión génica, los resultados obtenidos no indican de forma concluyente un aumento del metabolismo. Por último, en este estudio no se logró editar genéticamente las células RPTEC. Este trabajo contribuye en la evidencia de que el estímulo mecánico producido por el *shear stress* tiene efectos relevantes en las células del túbulo proximal, poniendo de manifiesto la necesidad de trabajar con cultivos y dispositivos que mimeticen las condiciones *in vivo* para poder extrapolar de una forma más fiable los resultados obtenidos *in vitro*.

## ABSTRACT

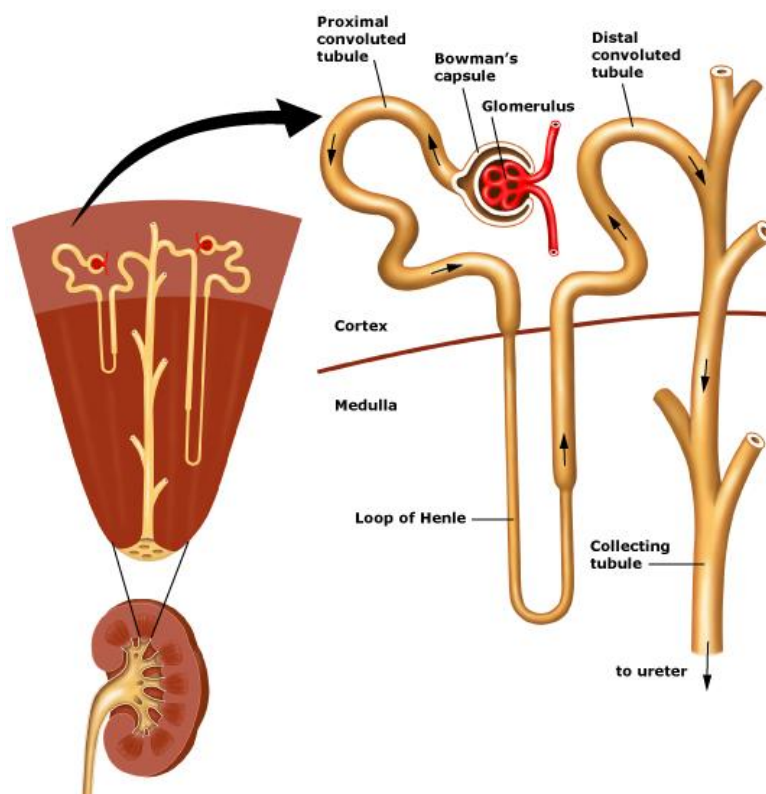
Proximal tubule cells in the kidney are continuously exposed to the mechanical stimulus generated by the glomerular filtrate. This stimulus, called shear stress, induces changes at phenotypic and also functional level, so it is crucial to reproduce this environment to study these cells in vitro. The following study focuses on determining changes in metabolism gene expression of RPTEC cells under shear stress. Oxygen consumption is also analyzed and, finally, it is intended to generate a knock-out for AMPK protein, an energetic homeostasis regulator. The results obtained show an increase in oxygen uptake by cells under shear stress, which can be related to an increase in metabolic activity. However, although certain changes in gene expression levels are detected, the results obtained do not indicate in a conclusively way an increase in metabolism. Finally, in this study it was not possible to genetically edit RPTEC cells. This work contributes to the evidence that the mechanical stimulus produced by shear stress has relevant effects in proximal tubule cells, showing the relevance to use cultures and devices that mimic in vivo conditions in order to extrapolate the results obtained in vitro in a more reliable way.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 El túbulo proximal en el riñón

Los riñones son órganos esenciales en la regulación homeostática del organismo. A través de la filtración del plasma sanguíneo son los encargados de eliminar sustancias de desecho formando la orina y a la vez reabsorber sustancias esenciales como glucosa, aminoácidos, agua e iones.

La unidad estructural y funcional del riñón es la nefrona. Cada riñón contiene alrededor de un millón de nefronas y cada nefrona está constituida por el glomérulo y el sistema tubular. El glomérulo está formado por una red de capilares encargados de la filtración del plasma y a lo largo del túbulo el plasma es procesado y convertido en orina. El túbulo de la nefrona se divide en varios segmentos que presentan diferencias estructurales y funcionales: el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo distal y el túbulo colector (Figura 1).<sup>1,2</sup>



**Figura 1.** Estructura y ubicación de la nefrona. La sangre es filtrada en la cápsula de Bowman a través del glomérulo. A lo largo del túbulo, constituido por los diferentes segmentos representados en la figura, el plasma filtrado es procesado y convertido en orina. Imagen obtenida de “*Assessment of kidney function*” Esley A. Inker and Ronald D. Perrone, 2015, UpToDate.

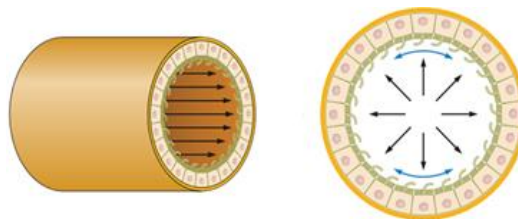


El túbulo proximal, parte en la que se centra este estudio, es el primer tramo tubular y el segmento más largo de la nefrona. Está formado por células epiteliales polarizadas, característica que permite distinguir entre dos zonas bien diferenciadas, la zona apical o luminal y la zona basolateral. La zona apical presenta una estructura denominada borde en cepillo. Esta estructura está formada por microvellosidades que aumentan el área de superficie de las células y favorece procesos como la reabsorción.

En el túbulo proximal tiene lugar la mayor parte de la reabsorción de iones y agua, se reabsorben sustratos importantes como glucosa, aminoácidos y proteínas de bajo peso molecular y se secretan aniones y cationes orgánicos, incluidos fármacos y sustancias tóxicas<sup>3</sup>. De esta forma, las células del túbulo proximal cuentan con múltiples sistemas de transporte y presentan un gran número de mitocondrias que aportan la energía requerida para llevar a cabo las diferentes funciones. Debido a la elevada actividad metabólica y la exposición a toxinas, el túbulo proximal está más expuesto a los fenómenos de hipoxia y toxicidad que otros segmentos de la nefrona. En consecuencia, muchos modelos *in vitro* se han centrado en reproducir la función de este segmento.

## 1.2 Flujo laminar y *shear stress*

Las células del túbulo proximal están constantemente expuestas al flujo del filtrado glomerular que genera una fuerza de cizallamiento o *shear stress* sobre la superficie apical. El movimiento y avance del líquido a través del túbulo ejerce, por un lado una fuerza paralela a su superficie, y por otro lado una tensión radial que puede aumentar el diámetro interno del túbulo (Figura 2).



**Figura 2.** Manifestación del flujo laminar en el túbulo renal. El flujo laminar produce una fuerza de cizallamiento o *shear stress* en las paredes del túbulo (flechas azules). El aumento del flujo también se manifiesta como una fuerza radial en las paredes aumentando el diámetro interno de los túbulos (flechas negras). Imagen obtenida de “*Discerning the role of mechanosensors in regulating proximal tubule function.*” Raghavan V, Weisz OA. Am J Physiol. 2016.

Este estímulo biofísico puede ser detectado mediante estructuras especializadas como las microvellosidades, el glicocálix y los cilios primarios<sup>4</sup>, regulando funciones de las células renales como el transporte de iones<sup>5</sup> y la capacidad endocítica<sup>6</sup> manteniendo así el balance glomerulotubular<sup>7</sup>. Además, también juega un papel importante en la morfología, polarización y diferenciación celular<sup>8,9</sup>.

Las técnicas de cultivo convencionales no logran reproducir el entorno real de las células del túbulo renal, lo que puede explicar la dificultad de traducir los resultados experimentales en aplicaciones a organismos vivos. Definir las condiciones mecánicas en el túbulo proximal es importante para mimetizar con precisión mediante un modelo *in vitro* lo que ocurre en un sistema fisiológico *in vivo*. Con el objetivo de mejorar la reproducibilidad y gracias a la cooperación entre los campos de la biología y la ingeniería se han desarrollado dispositivos que imitan de forma más fiable el entorno fisiológico en el que se encuentran las células en un organismo<sup>10,11</sup>. Por ejemplo, el grupo de J. Lewis ha utilizado el método de bioimpresión para desarrollar un cultivo *in vitro* de túbulos proximales en 3D que además se encuentran en un chip que permite aplicar perfusión<sup>12</sup>.

Gracias a estos avances se ha demostrado que la aplicación del *shear stress* tiene varios efectos sobre el fenotipo y función de las células epiteliales tubulares. Por ejemplo se han visto cambios en la reorganización del citoesqueleto y las uniones celulares<sup>8</sup>, en el aumento de la endocitosis<sup>13</sup>, y en la localización de proteínas transportadoras<sup>14,15</sup>. Además, también se ha demostrado que el *shear stress* puede regular la expresión de varios genes mediante diversas vías de señalización. En un estudio reciente, liderado por Dorien J. M. Peters<sup>16</sup>, se analizó ampliamente el transcriptoma de células del túbulo proximal murino sometidas a un flujo laminar. Los resultados mostraron que la vía de señalización más claramente activada por la fuerza del flujo fue la vía MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Esta vía representa un conjunto de cascadas de transducción de señales intracelulares que regulan una amplia variedad de procesos como la proliferación, diferenciación, apoptosis y respuestas al estrés. También se observó alteración en los niveles de expresión de genes implicados en la glucólisis y el metabolismo del colesterol, en concreto un aumento del *shear stress* reducía la actividad metabólica de las células del túbulo proximal murino.

Estos descubrimientos ponen de manifiesto el efecto que ejerce el flujo en las células del túbulo renal, destacando la importancia de reproducir este entorno mecánico en un sistema *in vitro*.

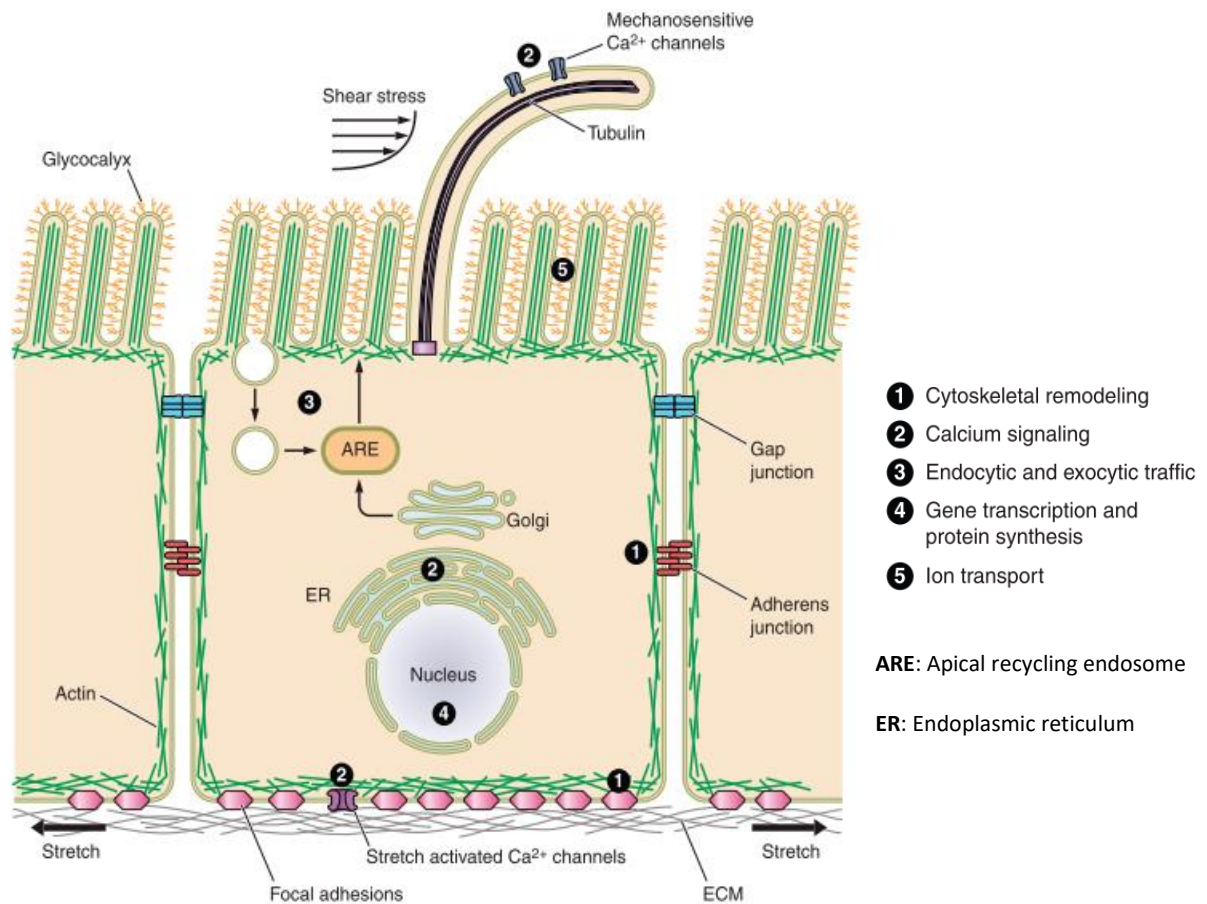
Cabe destacar que las variaciones en las fuerzas hidrodinámicas y el *shear stress* son comunes en las enfermedades renales debido a la hiperfiltración, la dilatación tubular y la obstrucción. Se han asociado varias enfermedades con la hiperfiltración glomerular, como la diabetes mellitus o la enfermedad renal poliquística<sup>17</sup>.

### 1.3 Detección del *shear stress*. El cilio primario.

La fuerza mecánica que produce el *shear stress* puede ser detectada por diferentes estructuras especializadas presentes en la superficie apical de las células epiteliales del riñón como las microvellosidades, el glicocálix y sobre todo el cilio primario<sup>4</sup> (Figura 3).

Los cilios primarios son apéndices o prolongaciones de la membrana plasmática basados en microtúbulos<sup>18</sup>, capaces de detectar variaciones en el entorno extracelular como señales lumínicas, sustancias químicas, proteínas y estímulos mecánicos<sup>19</sup>. En las células del túbulo renal son capaces de detectar variaciones en las velocidades de flujo del ultrafiltrado glomerular<sup>15</sup>, por lo que permite modular la tasa de reabsorción y mantener el balance glomerulotubular<sup>7</sup>.

Se ha demostrado que la flexión de los cilios primarios producida por el *shear stress* da como resultado un aumento de los niveles de calcio intracelular que actúa como mensajero secundario en las vías de señalización que mantienen la función renal<sup>20</sup>. Por lo contrario, la eliminación del cilio anula esta respuesta de detección del flujo, y se ha relacionado con una pérdida de función, una división celular anormal y la enfermedad renal poliquística<sup>21</sup>. De modo que la mecanotransducción a través de estos orgánulos es necesaria para los procesos de desarrollo y una función epitelial normal.



**Figura 3. Mecanosensores del túbulo proximal y vías iniciadas por el shear stress.** El shear stress detectado por las estructuras de la superficie apical desencadena diferentes respuestas como la reorganización del citoesqueleto, la redistribución y activación de transportadores de iones, así como de la capacidad endocítica. La flexión del cilio primario producida por el shear stress aumenta la entrada de calcio que actúa como mensajero secundario e influyen en la regulación de la transcripción génica y síntesis de proteínas. Imagen obtenida de "Discerning the role of mechanosensors in regulating proximal tubule function." Raghavan V, Weisz OA. Am J Physiol. 2016.

### 1.4 Metabolismo energético de las células del túbulo proximal

Las células del túbulo proximal necesitan un elevado nivel de energía para llevar a cabo sus funciones de reabsorción y excreción. Estas células requieren mecanismos de transporte más activos que otros tipos de células renales ya que reabsorben más del 70% de los 180 litros de filtrado diario que pasa a través del glomérulo, además de glucosa, iones y nutrientes<sup>22</sup>.

Existen distintas vías metabólicas que convergen en la producción de adenosina trifosfato o ATP y se llevan a cabo según la disponibilidad de oxígeno y nutrientes. La

fuerza principal de energía metabólica en las células animales se obtiene a partir de la degradación de la glucosa y de los ácidos grasos<sup>23</sup>. Y puede llevarse a cabo mediante la respiración aeróbica o anaeróbica en función del oxígeno disponible.

Debido a la alta demanda energética las células del túbulo proximal contienen una gran cantidad de mitocondrias encargadas de producir ATP a través de la fosforilación oxidativa. De este modo la respiración aeróbica es su mecanismo principal de producción de energía, y preferentemente utilizan ácidos grasos no esterificados a través de la  $\beta$ -oxidación ya que proporcionan un rendimiento energético más elevado que la oxidación de la glucosa, en concreto una sola molécula de palmitato produce 106 moléculas de ATP frente a 36 moléculas de ATP por una de glucosa<sup>24</sup>. Además se ha demostrado que la inhibición de la oxidación de los ácidos grasos en las células epiteliales de los túbulos causó depleción de ATP, muerte celular, dediferenciación y depósito de lípidos intracelulares, fenotipos que son observados en la fibrosis celular<sup>25</sup>.

Debido al alto consumo de oxígeno y la demanda de energía, las células del túbulo proximal son más susceptibles a condiciones de hipoxia<sup>26</sup>, viéndose afectada su función y desencadenando un daño renal. La capacidad de las células para detectar y responder a los cambios en la disponibilidad de nutrientes y la demanda de energía, manteniendo la homeostasis mitocondrial, es fundamental para su adecuado funcionamiento.

## 1.5 Vías de detección de nutrientes

Las células han desarrollado mecanismos para detectar las condiciones externas como la hipoxia, el estrés oxidativo y la disponibilidad de nutrientes de modo que les permite ajustar su comportamiento para mantener sus funciones vitales y adaptarse cuando las condiciones no son favorables<sup>27</sup>.

Existen dos proteínas quinasas conservadas evolutivamente capaces de detectar la energía celular y los niveles de nutrientes de manera que regulan casi todos los aspectos del metabolismo celular: la proteína AMPK (del inglés *Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase*) y la proteína mTOR (del inglés *Mechanistic Target of Rapamycin*)<sup>28</sup>.

### **1.5.1 Proteína AMPK**

La proteína AMPK actúa como un sensor de la energía celular y como un regulador del metabolismo para mantener la homeostasis energética en las células<sup>29</sup>. Se trata de una proteína heterotrimérica que consta de una subunidad catalítica  $\alpha$  y dos subunidades reguladoras  $\beta$  y  $\gamma$ . Cada una de las subunidades presenta distintas isoformas, algunas de ellas distribuidas de forma ubicua y otras específicas de tejido.

Durante el agotamiento de la energía cuando los niveles de AMP o ADP son altos en relación con la concentración de ATP, AMPK activa las vías que proporcionan energía como la captación de glucosa, la glucólisis o la oxidación de ácidos grasos. Simultáneamente, se reduce el gasto energético inhibiendo procesos no esenciales que consumen ATP, como la gluconeogénesis, la lipogénesis o la síntesis de proteínas<sup>30</sup>.

AMPK se expresa abundantemente en toda la nefrona y estudios recientes han revelado numerosas funciones en la fisiología y patología renal<sup>31</sup>. La coordinación del transporte epitelial con el estado metabólico subyacente es fundamental debido al elevado consumo de energía por parte de los transportadores. AMPK regula el transporte de la membrana del túbulo renal y esta regulación puede desempeñar un papel importante en diversas patologías como la isquemia, la enfermedad renal poliquística y la hipertensión<sup>32</sup>. Varios estudios han demostrado un papel esencial en la desregulación de la proteína AMPK en la diabetes y en la enfermedad renal asociada a la obesidad, tanto en modelos experimentales como clínicos<sup>33-35</sup>. Además, también se ha demostrado que la activación de AMPK atenúa la nefropatía diabética y mejora la nefropatía relacionada con la obesidad<sup>36-39</sup>. También se ha visto que el exceso de grasa induce la activación constitutiva de la proteína mTOR y esta inhibe directamente la actividad de AMPK<sup>40,41</sup>.

### **1.5.2 Proteína mTOR**

La proteína mTOR es una quinasa esencial para la biosíntesis de macromoléculas clave como proteínas, lípidos y nucleótidos. Integra las señales de la disponibilidad de nutrientes, factores de crecimiento y estado energético y promueve el crecimiento celular cuando las circunstancias son apropiadas, además, también es capaz de limitar procesos catabólicos como la autofagia<sup>42</sup>. mTOR promueve el gasto energético por lo

que está regulada indirectamente por la proteína AMPK<sup>27</sup>. Esta proteína también juega un papel en diversas enfermedades renales como la nefropatía diabética o la enfermedad renal poliquística<sup>43</sup>.

## 1.6 *Shear stress* y cambios en la expresión del metabolismo

Como se ha descrito anteriormente, la fuerza que ejerce el flujo en las células del túbulo renal tiene diversos efectos en su función. La detección de las variaciones en la velocidad del flujo permite modular la tasa de reabsorción por parte de las células y mantener así el balance glomerulotubular. Estos cambios en las células conllevan unas necesidades energéticas, por lo que es de esperar que el *shear stress* tenga un efecto directo en la expresión y regulación del metabolismo celular.

A pesar del conocimiento del transporte proximal regulado por el flujo<sup>7</sup>, aún no se comprende completamente como las células proximales transducen las señales mecánicas en procesos celulares para controlar el metabolismo.

Recientemente se ha reportado una interacción entre el microambiente físico de las células y la actividad metabólica mediante la activación de la proteína AMPK<sup>44,45</sup>. En células epiteliales de riñón de ratón se ha visto que el *shear stress* a través del cilio primario induce la biogénesis mitocondrial y estimula la autofagia y la lipofagia (una forma de autofagia selectiva para degradar lípidos)<sup>46,47</sup>.

Las variaciones en el flujo también pueden relacionarse con más o menos disponibilidad de oxígeno, por lo que también conlleva un cambio en el metabolismo y expresión celular. Como se ha descrito en un estudio con células del túbulo proximal de zarigüeya el *shear stress* y la consecuente disponibilidad de oxígeno conducen a cambios en el metabolismo celular adaptándose a la condiciones ambientales<sup>48</sup>.

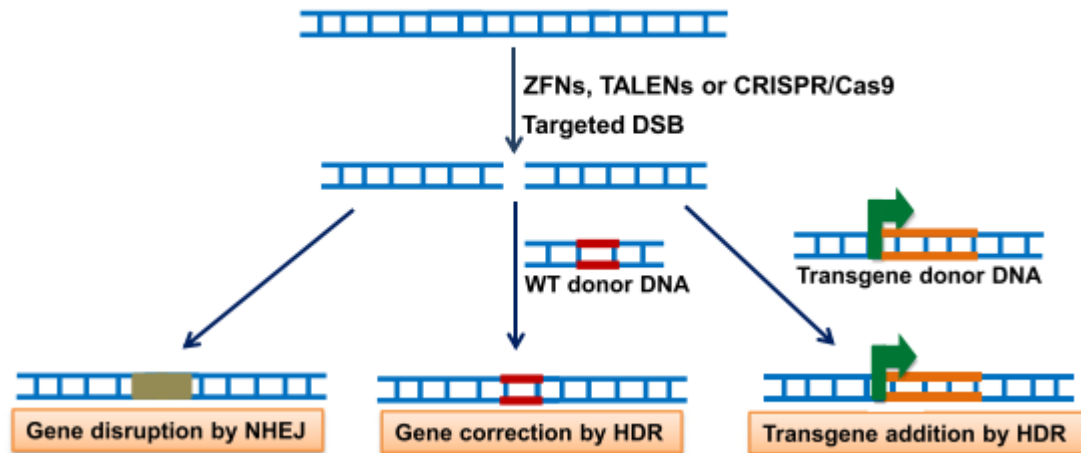
## 1.7 Edición génica

Cuando se pretende estudiar la función de genes y/o las proteínas que codifican una de las estrategias más utilizadas consiste en la inactivación o *knock-out* de la expresión del gen de interés con el objetivo de evaluar el impacto de su pérdida en el funcionamiento de la célula. Para ello se suelen utilizar las técnicas de edición génica.

Existen diferentes técnicas de edición génica basadas en nucleasas<sup>49</sup>: la nucleasa de dedos de Zinc o ZFN (*Zinc Finger Nuclease*), la nucleasa tipo activador de la transcripción o TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) y el sistema CRISPR asociado a la nucleasa Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Estas tres técnicas comparten el mismo mecanismo de acción, reconocen específicamente la secuencia diana de ADN en el genoma y gracias a su actividad nucleasa son capaces de escindir el ADN dando como resultado una rotura de doble cadena o DSB (*Double Strand Break*). Esta rotura activa las vías de reparación endógenas de la célula que dan como resultado una modificación en el genoma. Como se muestra en la Figura 4, la reparación del ADN se puede llevar a cabo por recombinación homóloga o HDR (*Homology Directed Repair*) o mediante la unión de extremos no homólogos o NHEJ (*Non Homologous End Joining*). La recombinación homóloga ocurre con menos frecuencia de forma natural, pero si se introduce un donador de ADN con brazos homólogos permite la introducción de secuencias concretas. En cambio, cuando se unen los extremos no homólogos puede darse la inserción o eliminación de bases nitrogenadas de manera aleatoria de modo que puede llevar a un cambio en el marco de lectura interrumpiendo la expresión del gen o afectando su funcionalidad.



## Genome engineering by ZFNs, TALENs or CRISPR/Cas9



**Figura 4. Edición génica mediante nucleasas.** ZFN, TALEN o CRISPR/Cas producen un corte de doble cadena (DSB) en la secuencia diana de ADN. Este corte activa las vías de reparación endógenas de la célula: la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o la recombinación homóloga (HDR). NHEJ puede llevar a la interrupción del gen mientras que la recombinación homóloga podría usarse para la corrección de genes o para introducir secuencias específicas mediante un donador de ADN con brazos homólogos. Imagen obtenida de *“Origins of programmable nucleases for genome engineering”* Chandrasegaran S., Carroll D., Journal of Molecular Biology 2016.

A pesar de que estas técnicas comparten el mismo mecanismo de acción cada una de ellas tiene características únicas y el sistema CRISPR/Cas presenta grandes ventajas frente a las demás. Las nucleasas ZFN y TALEN precisan del diseño complejo de proteínas para reconocer cada nueva secuencia de interés mientras que CRISPR/Cas solo necesita diseñar una secuencia de ARN guía. Esto hace que sea una herramienta mucho más sencilla de preparar, más asequible y por tanto al alcance de cualquier laboratorio<sup>50</sup>.

Gracias a sus características el sistema CRISPR/Cas es utilizado ampliamente en varios campos de investigación, desde la ciencia básica hasta su aplicación en el diagnóstico y terapia génica de enfermedades, entre muchas otras aplicaciones. En concreto en las células epiteliales renales se ha utilizado para modelar las características de la fisiología del túbulo y enfermedades asociadas, lo que permite dilucidar funciones desconocidas de proteínas además de identificar nuevas dianas terapéuticas<sup>51-54</sup>.

## 2. HIPÓTESIS

Para la realización de este trabajo se parte de la hipótesis de que las células renales del túbulo proximal modulan la expresión de su metabolismo cuando se someten a un flujo laminar simulando las condiciones fisiológicas *in vivo* de *shear stress*.

## 3. OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio son:

1. Determinar los cambios en la expresión del metabolismo de células humanas de túbulo proximal (RPTEC/TERT1) en condiciones de *shear stress*.
2. Generar una línea celular *knock-out* para la subunidad catalítica de la proteína AMPK mediante el sistema CRISPR/Cas.
3. Evaluar los efectos del *shear stress* en la línea celular *knock-out* para AMPK.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Línea celular

La línea celular RPTEC/TERT1 (Evercyte GmbH) son células epiteliales renales del túbulo proximal humano inmortalizadas mediante la expresión de la subunidad catalítica de la enzima telomerasa transcriptasa reversa humana (hTERT) <sup>55</sup>.

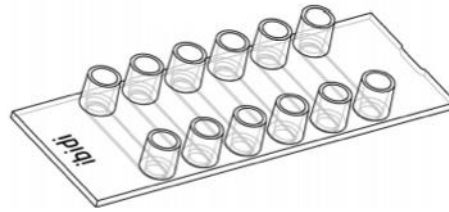
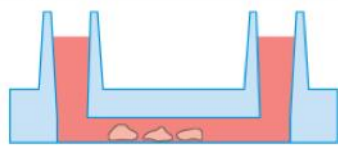
Para el mantenimiento de las células se realizan subcultivos periódicos, se siembran a una densidad de 60000 células/cm<sup>2</sup> y se mantienen en un incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en un medio libre de suero (BW5C). Este medio contiene DMEM-F12 (BioWest) con 5 mM de glucosa, HEPES 10mM, GlutaMax-I 2mM, 10ng/ml de hEGF, T3 5 pM, 3.5 µg/ml de ácido L-ascórbico, 5 µg/ml de Holo Transferrina, 25 ng/ml de prostaglandina E1, 25 ng/ml de hidrocortisona, 8.65 ng/ml de selenito de sodio, 100 µg/ml de antibiótico G418 y 5 µg/ml insulina. Cabe destacar que el medio recomendado por el proveedor de la línea celular contiene una concentración de glucosa 17 mM y en este caso se ha adaptado a 5 mM.

Cuando los cultivos alcanzan una confluencia del 90-95% se someten a tripsinización con tripsina-EDTA 0.05% hasta la separación de las células y se detiene con un inhibidor de tripsina o DTI. Tras el conteo celular se procede a la siembra en los dispositivos para su mantenimiento y la posterior realización de los experimentos.

### 4.2 Determinación de los cambios en la expresión del metabolismo

#### 4.2.1 Cultivo de células RPTEC en dispositivos fluidicos

Se siembran las células RPTEC en el dispositivo fluidoico µSlide VI 0.4 de Ibidi. Estos dispositivos cuentan con 6 canales dispuestos de forma paralela con una superficie individual de 0,6 cm<sup>2</sup> y una altura de 0.4 mm. Los extremos de los canales terminan en dos conectores Luer hembra que funcionan tanto para la conexión del sistema de flujo como reservorios para medio de cultivo mientras el dispositivo no está conectado al sistema. (Figura 5)



**Figura 5.** Dispositivo  $\mu$ Slide VI 0.4 de Ibidi. Imagen obtenida de la casa comercial Ibidi.

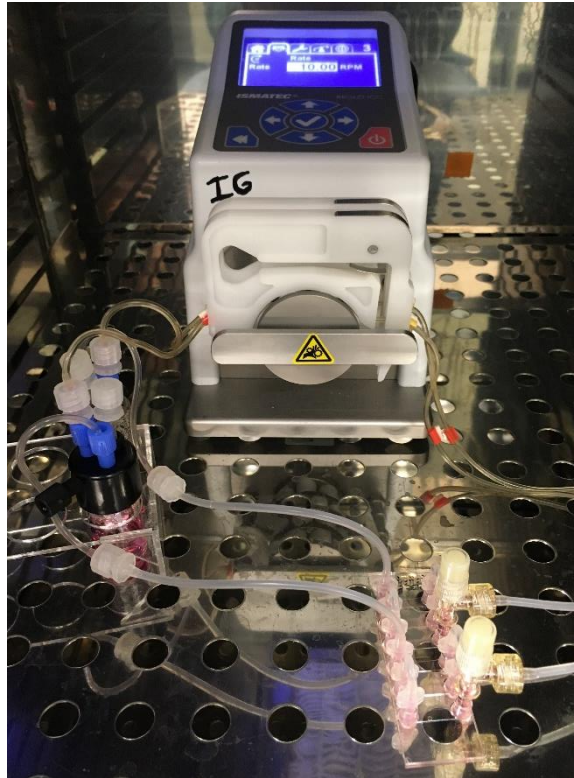
Para la realización de experimentos se siembran las células en el dispositivo  $\mu$ Slide a una concentración de 110000 células/cm<sup>2</sup>. Se añaden 30  $\mu$ L por canal de la solución de células con medio BW5C. Se deja incubando a 37°C durante 4 horas para que las células se adhieran a la superficie. Tras lavar las células no adheridas, el dispositivo se mantiene dentro de una cámara húmeda y esta a su vez dentro del incubador. Cuando las células sembradas llegan a una confluencia del 95-100%, se procede al montaje del sistema de flujo.

#### **4.2.2 Sistema de flujo**

El sistema de flujo está compuesto por el dispositivo  $\mu$ Slide, una botella que contiene el medio de cultivo que alimenta al sistema y los tubos de conexión entre ellos. La perfusión del medio se consigue mediante impulsión por una bomba peristáltica. Para optimizar el uso del dispositivo, se aplican dos sistemas fluídicos simultáneamente, cada uno de ellos conectando tres de los canales en serie. (Figura 6)

#### **4.2.3 Condiciones del cultivo en experimentos de perfusión**

Cuando se procede al montaje del sistema fluídico las células ya no son proliferativas y han llegado a un estado de madurez en el que los factores de crecimiento presentes en el medio ya no son necesarios para su mantenimiento, de modo que se cambia el medio BW5C por el medio BW5 sin factores de crecimiento. Una vez montado el sistema de flujo se mantiene dentro de un incubador a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.



**Figura 6. Componentes del sistema de flujo.** La bomba peristáltica genera el movimiento del medio desde los reservorios (a la izquierda) a través del sistema de tubos y conectores pasando por todos los canales del dispositivo  $\mu$ Slide (a la derecha) dónde se encuentran las células adherentes en monocapa.

En el mismo dispositivo tres canales se someten a un ritmo de perfusión de 10  $\mu$ l/min y los otros tres a una velocidad de 200  $\mu$ l/min. El *shear stress* correspondiente a esas velocidades es aproximadamente de 0.017  $\text{dyn/cm}^2$  y 0.35  $\text{dyn/cm}^2$  respectivamente, solo las células que se someten a la perfusión alta se encuentran dentro del rango fisiológico de *shear stress*. De modo que, las células en perfusión baja sirven de control para las células en perfusión alta. El cálculo del *shear stress* para el dispositivo Ibidi  $\mu$ Slide VI 0.4 viene dado por la siguiente fórmula:

$$\tau = \text{Shear stress (dyn/cm}^2\text{)}$$

$$\eta = \text{viscosidad del medio (dyn} \cdot \text{s/cm}^2\text{)}$$

$$\Phi = \text{velocidad de flujo (ml/min)}$$

$$176.1 = \text{factor dependiente del dispositivo}$$

$$\tau = \eta \cdot 176.1 \cdot \Phi$$

#### **4.2.4 Análisis de la expresión génica por RT-PCR y qPCR**

Para el análisis de la expresión génica se realiza la extracción de ARN de cada uno de los canales de manera independiente, de modo que además de evaluar los cambios en la expresión entre células sometidas a distintas velocidades de flujo, también se analiza si existen diferencias entre canales sometidos a una misma condición. Al tratarse de un circuito en serie las células que se encuentran en la entrada del primer canal y las sucesivas a lo largo del recorrido por los diferentes canales pueden estar recibiendo diferentes condiciones en cuanto a disponibilidad de oxígeno, nutrientes o sustancias de desecho provenientes del metabolismo celular.

Para la extracción de ARN de las células se utiliza Trizol (Invitrogen) siguiendo el protocolo comercial. La cuantificación y determinación de pureza se obtiene con el espectrofotómetro NanoDrop 2000. Para la cuantificación se mide la absorbancia a 260 nm y para la detección de proteína y compuestos fenólicos se mide la absorbancia a 280 nm y 230 nm respectivamente. Una ratio A260/280 por debajo de 1.7 indica la presencia de compuestos aromáticos y en el caso de la relación A260/230 se considera que hay contaminación por debajo de 1.5.

Una vez cuantificado se realiza la síntesis de ADNc (ADN complementario) mediante PCR transcriptasa reversa o RT-PCR. Para ello se utiliza el kit PrimeScript™ RT Master Mix de Takara siguiendo las especificaciones de la casa comercial.

Finalmente se lleva a cabo la PCR cuantitativa o qPCR mediante el kit comercial Premix Ex Taq™ (Probe qPCR) de Takara siguiendo las instrucciones. La qPCR permite la cuantificación relativa de la expresión de los genes de interés frente a un gen endógeno que presenta una expresión constitutiva e invariable.

En este caso se utilizan sondas TaqMan que están formadas por un fluoróforo y un *quencher* (desactivador de fluorescencia). Este tipo de sondas hibridan en una región específica del gen a amplificar, cuando el gen es amplificado se produce la escisión de la sonda y por tanto la emisión de fluorescencia. Tras cada ciclo de amplificación el termociclador mide la señal de fluorescencia que será proporcional a la cantidad de ADN producido.

Se realizan duplicados de cada gen a detectar y la reacción se lleva a cabo en el termociclador Vii7 de Applied Biosystem perteneciente al servicio de Secuenciación y Genómica del IACS/UZ. Las reacciones utilizadas para la amplificación son las siguientes:

95°C _____	3 minutos	} x40 ciclos
95°C _____	15 segundos	
60°C _____	45 segundos	

Los valores que se registran tras cada ciclo de amplificación representan una curva de fluorescencia. En esta curva se fija el punto Ct o ciclo umbral que indica el ciclo a partir del cual se comienza a detectar fluorescencia por encima del ruido de fondo. Por tanto, ciclos de Ct menores se asocian a mayores cantidades de material genético. El análisis de los datos obtenidos se realiza con el propio software del equipo.

Para la cuantificación se utiliza el método de análisis  $\Delta\Delta Ct$ . Primero se normaliza la expresión del gen de interés frente al gen endógeno que se expresa de forma constitutiva e invariable, de modo que permite controlar posibles errores a lo largo del proceso experimental. El nivel de expresión del gen de interés se compara con la expresión del gen en la condición control, en este caso las células sometidas a una perfusión alta se comparan con las de perfusión baja. De modo que el parámetro  $\Delta\Delta Ct$  nos indica la expresión relativa frente a un control.

Los genes analizados están relacionados con el metabolismo celular, así como marcadores de daño renal, fibrosis y diferenciación celular. Cada uno de los cebadores que amplifican tanto los genes de interés como el gen endógeno han sido validados previamente. Los cebadores utilizados se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1. Cebadores para qPCR**

Gen	Casa Comercial	ID Assay	Ref Seq #
AMPK $\alpha$ 1	IDT	Hs.PT.58.700639	NM_006251
AMPK $\alpha$ 2	IDT	Hs.PT.58.3219579	NM_006252
GADPH	IDT	Hs.PT.39a.22214836	NM_002046
mTOR	IDT	Hs.PT.58.45414861	NM_004958
HIF1 $\alpha$	IDT	Hs.PT.58.534274	NM_001099414
HIF2 $\alpha$	IDT	Hs.PT.58.2273374	NM_005564
KIM1	IDT	Hs.PT.58.3472	NM_001099414
Colágeno IV	IDT	Hs.PT.58.15679435	NM_001845
Fibronectina	IDT	Hs.PT.58.27951369	NM_145235
Vimentina	IDT	Hs.PT.58.3448582	NM_001017921
$\alpha$ SMA	IDT	Hs.PT.56a.2542642	NM_001141945
RPLP0	IDT	Hs.PT.39a.22214824	NM_000194

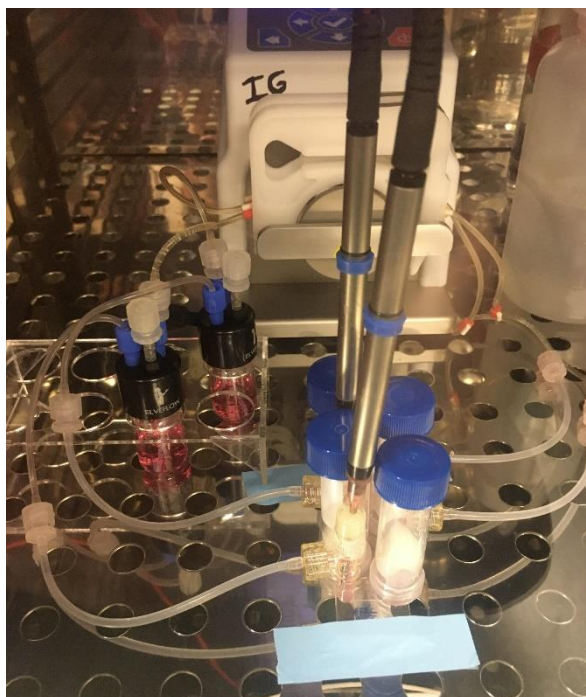
### 4.3 Análisis de los niveles de oxígeno en el sistema de flujo

Se usan sensores ópticos de oxígeno para determinar el consumo de oxígeno por parte de las células RPTEC sometidas a flujos de distintas velocidades. Para ello se realiza un análisis de los niveles de oxígeno tanto en la entrada de los canales como en la salida.

Se utilizan los sensores ópticos de FireSting pro de PyroScience. Estos sensores ópticos de alta sensibilidad y resolución permiten detectar la concentración de O<sub>2</sub> en un medio líquido y se pueden adaptar fácilmente al sistema de flujo empleado. (Figura 7)

Antes de adaptar los sensores al sistema estos son calibrados en una solución libre de oxígeno tratada con sulfito de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>). Durante el registro se mantuvieron las velocidades de flujo a las que las células habían estado sometidas las 72 horas previas. El equipo de registro calcula la concentración de oxígeno disuelto compensando los cambios en la temperatura y la presión ambiental. Los datos se recogen y analizan con el mismo software de la casa comercial.

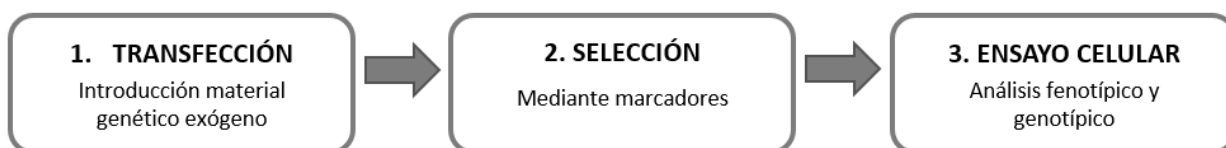




**Figura 7. Sensores de oxígeno adaptados al sistema fluídico.** En la medición de oxígeno se mantienen todos los componentes del sistema fluídico. Los sensores permiten su adaptación sin necesidad de variar las condiciones de velocidad por lo que permite registrar los cambios de forma continua en el tiempo.

#### 4.4 Generación *knock-out* mediante el sistema CRISPR

El flujo de trabajo para realizar un *knock-out* para una proteína de interés se resume en la Figura 8.



**Figura 8. Diagrama de flujo para la generación y validación de *knock-out***

##### 4.4.1 Plásmidos empleados

#### PLÁSMIDOS EMPLEADOS EN OPTIMIZACIÓN TRANSFECCIÓN

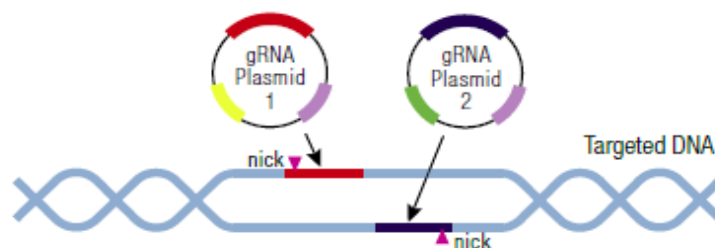
Para la puesta a punto y la optimización de la transfección se utilizaron los plásmidos, pKSP-eGFP<sup>56</sup> y pIRES-N2, este último se trata de un constructo, realizado por

el grupo FISIOPREN, resultante de la unión del plásmido comercial pRESpuro3 de Clontech y la secuencia del gen que codifica para el transportador NKCC2 (ver Anexo I). La elección de estos dos plásmidos viene dada por la estrategia que se utilizará del sistema CRISPR/Cas.

Los plásmidos pKSP-eGFP y pIRES-N2 expresan la proteína verde fluorescente GFP y resistencia a puromicina respectivamente. Estos métodos de selección son los mismos que expresan los plásmidos comerciales AMPK  $\alpha$ 1 Double Nickase. De manera que la co-transfección de ambos plásmidos nos permite poner a punto el proceso de transfección, así como la selección de las células que han sido transfectadas.

#### PLÁSMIDOS EMPLEADOS EN DELECCIÓN GÉNICA AMPK

Existen varias estrategias para la generación de un *knock-out* para un gen de interés mediante el sistema CRISPR/Cas. En este caso se elige la estrategia de doble *nickase*<sup>57</sup>. Para ello se va a utilizar los plásmidos comerciales AMPK $\alpha$ 1 Double Nickase Plasmid de Santa Cruz Biotechnology (ver Anexo I). Esta estrategia consiste en transfectar conjuntamente dos plásmidos. Cada plásmido codifica una secuencia guía de ARN y cada una de ellas se dirige a la cadena opuesta del ADN diana como se muestra en la Figura 9.



**Figura 9. Estrategia de doble *nickase* mediante el sistema CRISPR/Cas.** Cada plásmido codifica una secuencia guía de ARN y cada una de ellas presenta complementariedad a una de las cadenas de ADN diana. Se genera un corte de cadena simple en distintos puntos de cada cadena. Imagen obtenida de Santa Cruz Biotechnology, INC.

#### **4.4.2 Transfección mediante liposomas**

La siembra de las células RPTEC para la realización de los experimentos de edición génica se lleva a cabo en placas de 6 pocillos a una densidad de 60000 células/cm<sup>2</sup>.

Cuando las células llegan a una confluencia del 70-80%, se procede a la transfección de los plásmidos.

Para la introducción de los plásmidos en las células se llevó a cabo el proceso de transfección mediante liposomas<sup>58</sup>. Este método consiste en introducir material genético exógeno en una célula mediante lípidos catiónicos o liposomas. Estos lípidos forman complejos con el material genético, empaquetándolo en su interior, y mediante interacciones electrostáticas con la membrana facilitan su entrada. El primer paso consistió en verificar que las células RPTEC son transfectables mediante liposomas, luego se buscaron las condiciones óptimas para conseguir la mayor eficiencia de transfección.

Las transfecciones se realizaron con Lipofectamine 3000 de Invitrogen siguiendo el protocolo comercial. La proporción entre los componentes del kit comercial y la cantidad de ADN plasmídico a transfectar debe determinarse empíricamente ya que puede variar en función de la línea celular. Para ello se empleó el plásmido pKSP-eGFP y se utilizaron distintas ratios de ADN y lipofectamina. La eficiencia de la transfección se determinó mediante observación en el microscopio de fluorescencia.

Una vez se establecieron las condiciones óptimas se procedió a la transfección del sistema CRISPR/Cas. Para la transfección del sistema CRISPR/Cas se utilizó el plásmido AMPK $\alpha$ 1 Double Nickase Plasmid diseñado para interrumpir la expresión del gen humano PRKAA1. Las transfecciones se realizaron con Lipofectamine 3000 y también con Ultracruz Transfection Reagent de Santa Cruz Biotechnology siguiendo el protocolo comercial.

#### **4.4.3 Selección mediante FACS**

Una vez realizada la transfección debemos seleccionar las células que han incorporado ambos plásmidos en su interior. Las células que incorporen el plásmido pKSP-eGFP y lo expresen correctamente podrán ser visualizadas en el microscopio de fluorescencia. Esto nos permite determinar la eficiencia de la transfección y además decidir cuándo se produce la mayor expresión de fluorescencia, momento óptimo para su selección. La selección de las células transfectadas se realiza mediante clasificación celular activada por fluorescencia o FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*).

En primer lugar, las células se someten a una tripsinización con tripsina-EDTA 0.05% hasta que se encuentren en suspensión. Se añade el inhibidor de tripsina o DTI y se recogen las células con medio BW5C. Se centrifuga a 170 rcf durante 5 minutos y se elimina el medio que contiene tripsina. Por último, se resuspende el pellet de células en medio BW5C y se filtran por un poro de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro.

La clasificación celular mediante FACS permite seleccionar aquellas células que expresen la proteína fluorescente GFP. Para ello se utiliza el Cell Sorter SH800S, la longitud de onda de excitación es de 488 nm y se recoge la emisión de fluorescencia mediante filtros de 520/550 nm. Aquellas células que emitan fluorescencia serán seleccionadas y clasificadas en un tubo colector con medio BW5C. Tras la clasificación las células se centrifugan y se siembran en placas de 96 pocillos.

#### ***4.4.4 Selección mediante resistencia antibiótica. Curva sensibilidad a Puromicina.***

Además de seleccionar las células que expresen la proteína GFP debemos seleccionar aquellas que incorporen el plásmido pIRES-N2. Este plásmido contiene un cassette de resistencia al antibiótico Puromicina (puromicina N-acetil-transferasa), de manera que aquellas células que incorporen y expresen el plásmido correctamente son capaces de sobrevivir en un medio con Puromicina y contrariamente todas aquellas que no se han transfectado mueren.

Antes de someter las células transfectadas a un medio con Puromicina debemos determinar la sensibilidad de nuestro cultivo de RPTEC frente a este antibiótico de modo que nos permita definir la dosis más adecuada para su selección. Para ello se realizaron ensayos de viabilidad celular con diferentes dosis del antibiótico.

Para establecer la curva de sensibilidad de las RPTEC frente a Puromicina se siembran las células a una concentración de 120000 células/cm<sup>2</sup> en placas de 96 pocillos. Pasadas 24 horas, cuando las células llegan a una confluencia del 70-80 %, se cambia el medio y se añade BW5C con distintas concentraciones de Puromicina, des de 0 hasta 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para evaluar la viabilidad celular se realizan ensayos con PrestoBlue (PB) y Cristal Violeta (CV).

El reactivo PrestoBlue es en una solución de resazurina, un compuesto no tóxico de color azul no fluorescente con permeabilidad de membrana. Cuando se agrega a las

células vivas gracias a su poder reductor el compuesto se reduce a resafurina, un compuesto de color rojo y fluorescente que será detectable mediante absorbancia y fluorescencia. La concentración de resafurina será proporcional a la viabilidad celular.

Se realizan ensayos de PrestoBlue a las 24 y 48 horas de añadir el medio con puromicina. Primero se retira el medio de las células, se añade la solución PB al 5% en BW5C y se deja incubar a 37°C durante 20 minutos. Posteriormente se lee la fluorescencia a 590nm con el lector de placas (BioTek Synergy HT) previamente temperado a 37°C. La lectura consiste en 4 mediciones cada 7 minutos.

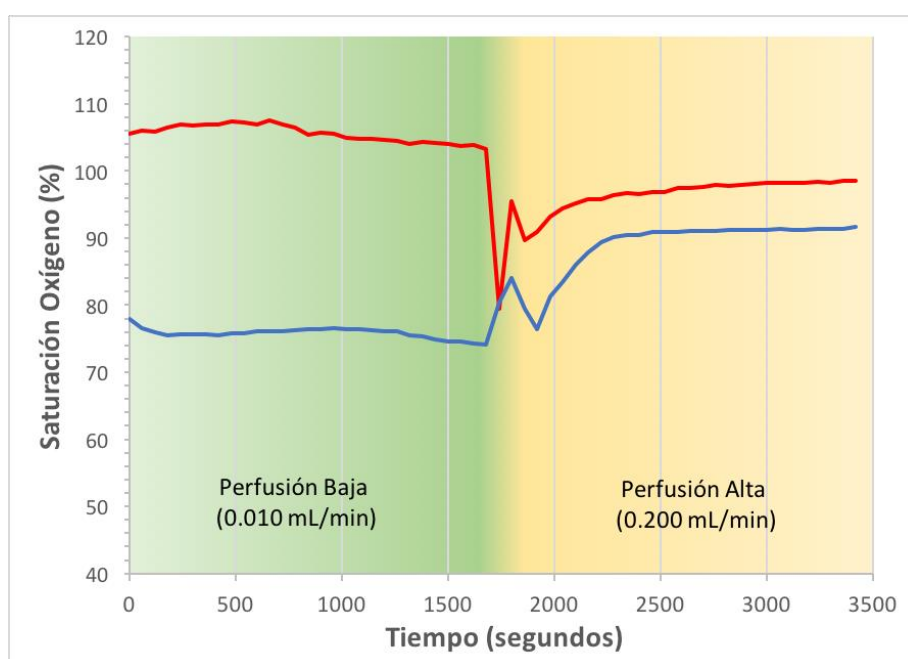
La tinción con Cristal Violeta nos permite determinar la densidad celular. Este colorante interacciona con el ADN y por tanto nos indica las células vivas. El ensayo se realiza a las 48 horas de añadir el medio con puromicina, después del ensayo de PrestoBlue. Para ello es necesario fijar las células con metanol, añadir el Cristal Violeta e incubar durante 30 minutos. A continuación, se lava con agua destilada y se añade ácido acético durante 20 minutos en agitación para disolver los cristales formados. Por último, se mide la absorbancia a 590 nm en el lector de placas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análisis consumo de oxígeno

Con el objetivo de evaluar si existe una diferencia en la actividad metabólica en las células RPTEC sometidas a diferentes velocidades de flujo, se procede a analizar las cantidades de oxígeno disuelto en el medio de cultivo del sistema fluídico.

El experimento consiste en determinar la captación de oxígeno por las células RPTEC que, durante 72 horas previas al registro, habían sido sometidas a una velocidad de perfusión baja (0.01 ml/min) o alta (0.2 ml/min).



**Figura 10.** Saturación de oxígeno disuelto en el medio de cultivo en el sistema fluídico. Se mide el oxígeno presente en la entrada del sistema de flujo (trazo rojo) y en la salida del último canal (trazo azul). Durante la primera media hora se registra la entrada y salida de oxígeno del sistema de baja perfusión (en verde), pasado este tiempo se trasladan los sensores del mismo modo al sistema de perfusión alta. n=1.

La gráfica (Figura 10) muestra la saturación de oxígeno disuelto en el medio de cultivo justo antes de la entrada a los canales fluídicos (trazo rojo) y justo a la salida del último canal (trazo azul). Los sensores de oxígeno se colocan primero a la entrada y salida del sistema de baja perfusión (en verde), y tras media hora de registro, se trasladan del mismo modo al sistema de alta perfusión (en amarillo).

Se calcula la concentración de oxígeno disuelto a partir de la saturación de oxígeno y las condiciones del experimento (temperatura y presión atmosférica). Con este valor y el flujo aplicado en cada uno de los sistemas se calcula la cantidad de oxígeno que entra y sale de los cultivos celulares por minuto. La diferencia entre la entrada y la salida es el oxígeno captado por las células. Estos valores se recogen en la Tabla 2.

**Tabla 2. Valores de oxígeno en el sistema fluídico.**

	<b>Flujo (mL/min)</b>	<b>Entrada [O<sub>2</sub>] (ug/mL)</b>	<b>Salida [O<sub>2</sub>] (ug/mL)</b>	<b>O2 entra (ng/min)</b>	<b>O2 sale (ng/min)</b>	<b>O2 captado (ng/min)</b>
Bajo	0.01	7.496	5.377	74.96	53.77	21.19
Alto	0.2	6.861	6.373	1372.2	1274.6	97.6

Estos resultados demuestran que las células que fueron expuestas previamente a flujo alto durante 72 horas captaron 4 veces más oxígeno que las células expuestas a flujo bajo (97.6 ng/ml frente a 21.19 ng/ml). Esto sugiere que la aplicación de un estrés mecánico fisiológico induce un cambio en el metabolismo energético de las células RPTEC.

Otra posible explicación a esta diferencia en el consumo de oxígeno es que las células que se encuentran en el segundo o tercer canal en el sistema de perfusión bajo experimenten cierto grado de hipoxia y eso induzca un cambio al metabolismo anaeróbico. Sin embargo, la concentración de oxígeno en el medio de salida (76% de saturación) es todavía suficiente para sostener normalmente un metabolismo aerobio (la respuesta a hipoxia no se observa hasta saturaciones por debajo de 5% o inferiores). Otra posibilidad es que hubiera mayor densidad de células en los canales perfundidos a flujo alto, aunque la evidencia que se tiene de otros estudios del mismo grupo no apoyaría esta explicación (imágenes de microscopía, viabilidad celular-presto blue o cantidad de ADN-cristal violeta). Además, los datos obtenidos en la qPCR, detallados más adelante, muestran que no hay diferencias aparentes en el metabolismo de las células que se encuentran en cada uno de los canales.

Para tratar de explicar las diferencias en cuanto al consumo de oxígeno y profundizar en el conocimiento de los cambios metabólicos inducidos por el *shear stress* se procedió al análisis a nivel genotípico.

## 5.2 Análisis de los cambios en la expresión génica

### 5.2.1 Comparativa de la expresión entre canales de una misma condición

Para comparar la expresión génica entre células sometidas a distintos flujos, primero es necesario definir si las células bajo una misma condición de velocidad de perfusión presentan diferencias entre los distintos canales. Hay que tener en cuenta que, al tratarse de un circuito en serie, las células en su posición dentro del sistema podrían estar recibiendo diferentes condiciones de flujo en cuanto a oxígeno, nutrientes o desechos del metabolismo celular.

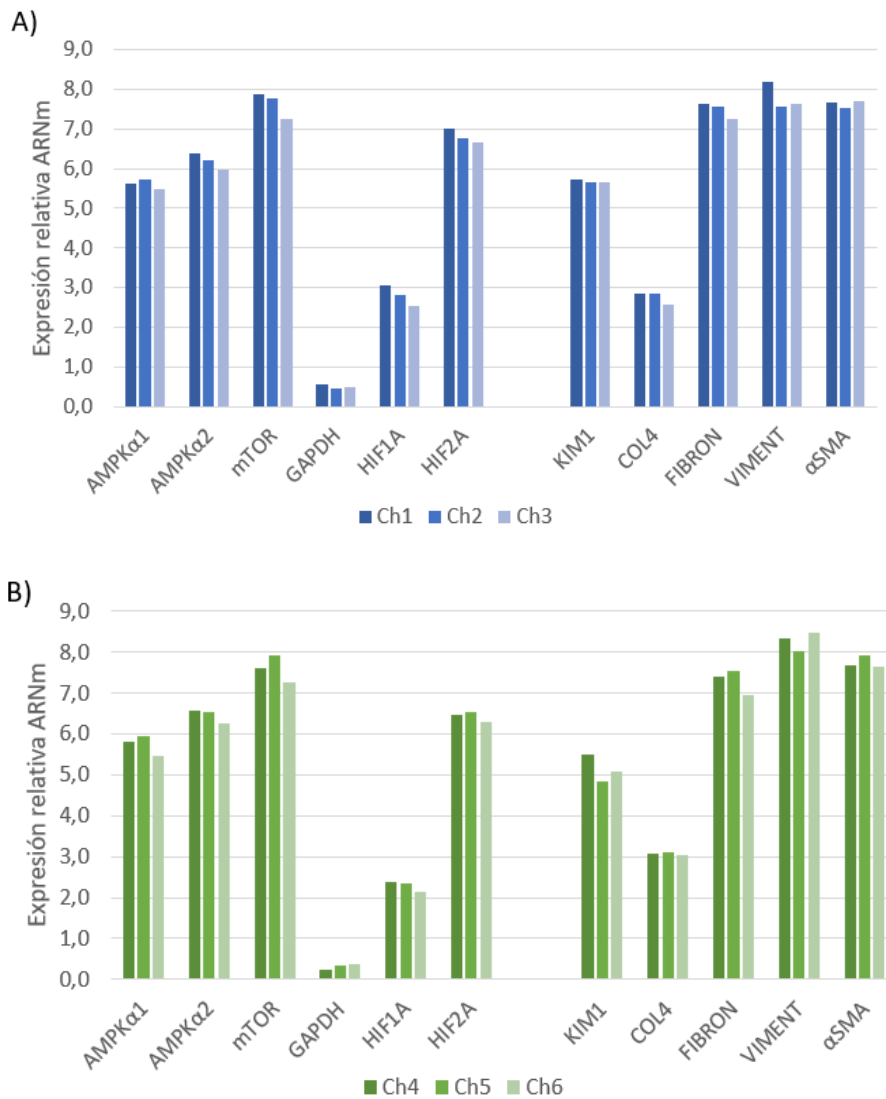
En la siguiente Figura 11 se muestran los resultados de la expresión génica en los diferentes canales. La gráfica A corresponde a la expresión de las células de los canales 1, 2 y 3 sometidas a un flujo bajo, equivalente a un *shear stress* de  $0.017 \text{ dyn/cm}^2$ , y la gráfica B corresponde a las células de los canales 4, 5 y 6 sometidas a un flujo alto, equivalente a un *shear stress* de  $0.35 \text{ dyn/cm}^2$ . En ambos casos se analizan los mismos genes relacionados con el metabolismo celular y con el daño renal cuyas funciones y relevancia en el análisis se detallarán más adelante.

Los niveles de expresión representados en la Figura 11 se han obtenido normalizando los valores Ct del gen de interés frente los niveles Ct del gen endógeno RPLP0, de modo que se representan los valores  $\Delta\text{Ct}$ . El gen RPLP0 codifica una proteína ribosomal que forma parte de la subunidad 60S del ribosoma. Su eficacia como control endógeno ha sido verificada anteriormente para el tipo celular con el que se trabaja.

Como se observa en los resultados la expresión relativa entre canales de una misma condición no difiere mucho entre ellos. Este resultado se observa para todos los genes analizados tanto en células sometidas a una velocidad baja (Figura 11A) como en células expuestas a una velocidad elevada (Figura 11B). Estos resultados muestran que el sistema fluídico en serie no genera diferencias en la expresión génica entre células



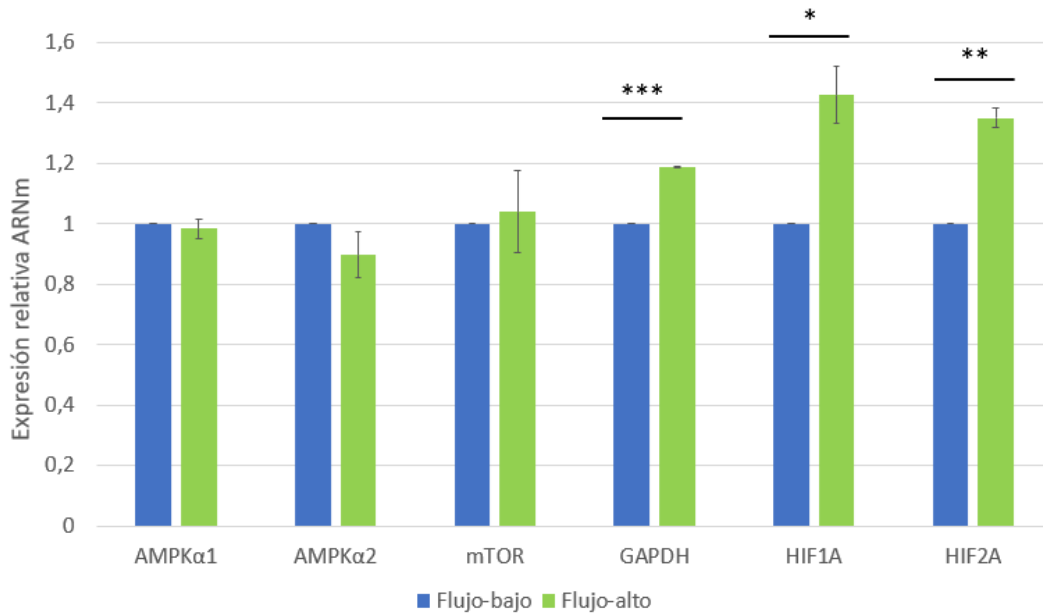
que se encuentran bajo las mismas condiciones pero en distintos puntos del recorrido. De este modo se asume que las pequeñas diferencias observadas no son significativas y se puede realizar una comparativa a distintas velocidades tomando los datos de los canales conjuntamente, sin necesidad de realizar análisis independientes de cada canal.



**Figura 11.** Expresión génica relativa de las células RPTEC en los diferentes canales de un mismo dispositivo fluídico. A) Expresión relativa de genes relacionados con el metabolismo y el daño renal de las células correspondientes a los canales 1, 2 y 3 sometidas a una velocidad de flujo bajo. B) Expresión relativa de genes relacionados con el metabolismo y el daño renal de las células correspondientes a los canales 4, 5 y 6 sometidas a una velocidad de flujo alto. La expresión relativa corresponde al valor Ct para cada gen diana normalizado frente al control endógeno RPLP0. n=1.

### 5.2.2 Análisis de la expresión de genes relacionados con el metabolismo celular

La Figura 12 muestra los cambios en la expresión de genes relacionados con el metabolismo celular relacionados con la magnitud del flujo.



**Figura 12.** Expresión relativa de genes relacionados con el metabolismo en células RPTEC sometidas a *shear stress*. Los niveles de expresión génica de las células sometidas a un flujo alto correspondiente a un *shear stress* de 0.35 dyn/cm<sup>2</sup> son comparados frente al flujo control, aplicando el método  $\Delta\Delta Ct$ . Media  $\pm$ SD, n=2, \* p $\leq$ 0.5, \*\* p $\leq$ 0.01, \*\*\* p $\leq$ 0.001.

En primer lugar, los resultados muestran que los niveles de expresión para la subunidad catalítica  $\alpha 1$  de la proteína AMPK son muy parecidos cuando las células se encuentran a velocidades de flujo bajas y velocidades más elevadas, simulando un *shear stress* fisiológico. De manera parecida la subunidad AMPK $\alpha 2$  no muestra diferencias significativas en su nivel de expresión. La subunidad catalítica  $\alpha 1$  se expresa de manera más amplia en el riñón que la subunidad  $\alpha 2$ . En condiciones donde hay un déficit en la expresión de  $\alpha 1$ , se activa la isoforma  $\alpha 2$  como mecanismo compensatorio. En estos resultados observamos como sus niveles son muy parecidos.

En cuanto a la expresión de mTOR, proteína encargada de regular la biosíntesis de macromoléculas y estimular el crecimiento celular, tampoco se observan diferencias significativas. Cabe destacar que mTOR promueve el gasto energético, y por tanto puede estar regulada negativamente por la proteína AMPK.

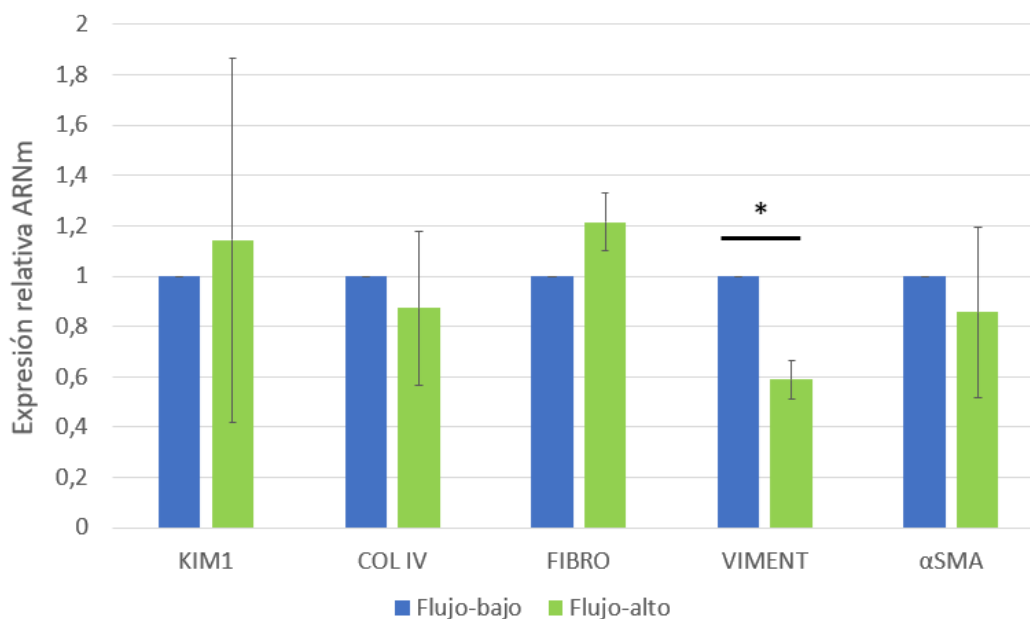
Los resultados en la expresión de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa o GAPDH muestran diferencias significativas, aumentando su expresión en condiciones de *shear stress* comparado con un flujo de menor velocidad. GAPDH es una enzima citosólica cuya función más conocida es su participación en la glucólisis.

Por último, en los resultados se puede observar cómo en condiciones de *shear stress* la expresión de la subunidad  $\alpha$  de la proteína HIF se ve aumentada tanto para el subtipo HIF1 como el subtipo HIF2, ambas con diferencias significativas. La proteína HIF (*hypoxia-inducible factor*) es el principal regulador de la transcripción de genes en situaciones de hipoxia. Sin embargo, su expresión también puede estar regulada por otras vías en condiciones de normoxia.

### **5.2.3 Análisis de la expresión de genes relacionados con daño y fibrosis celular**

Los resultados que se muestran a continuación corresponden a la expresión relativa de genes relacionados con el daño y fibrosis celular (Figura 13). Del mismo modo que los resultados anteriores, la expresión de los genes se han calculado con el método  $\Delta\Delta Ct$ , normalizando frente el control endógeno RPLP0 y tomando como calibrador la expresión de los genes en condiciones de velocidad de flujo bajo.

Para empezar, como se observa en los resultados la expresión de KIM-1 presenta una gran variación entre los experimentos. KIM-1 (*kidney injury molecule-1*) es una glicoproteína transmembrana cuya expresión aumenta considerablemente cuando existe un daño renal. Participa en la remodelación del epitelio por lo que es ampliamente utilizado como marcador de daño en el riñón<sup>59</sup>. La variación de su expresión en estos resultados pone de manifiesto diferencias, en cuanto a daño celular, entre las células de los distintos experimentos analizados. De modo que, unas células indican daño mientras que las otras no. Estas diferencias pueden deberse a la dificultad técnica del experimento. El manejo del sistema fluídico junto a la susceptibilidad de las células hace que la reproducibilidad de los resultados se vea comprometida. Por ejemplo, estas diferencias observadas podrían deberse a posibles contaminaciones no detectadas por lo que sería necesario llevar a cabo nuevos experimentos para sacar conclusiones apropiadas.



**Figura 13.** Expresión relativa de genes relacionados con el daño celular en células RPTEC sometidas a *shear stress*. Los niveles de expresión génica de las células sometidas a un flujo alto correspondiente a un *shear stress* de 0.35 dyn/cm<sup>2</sup> son comparados frente al flujo bajo. Media ±SD, n=2, \* p≤0.5.

La expresión de colágeno IV bajo condiciones de flujo alto es menor en el promedio de los experimentos pero presenta una elevada variación entre ellos. El colágeno IV forma parte de la matriz extracelular, principalmente contribuye en la integridad estructural además de participar en la diferenciación celular, el crecimiento y la adhesión. Este colágeno tipo IV es el más abundante en las membranas basales de las células renales, sin embargo, su expresión puede verse notablemente aumentada en condiciones patológicas<sup>60</sup>. En concreto el experimento que muestra una sobreexpresión del marcador KIM-1 también indica mayor expresión de colágeno IV.

Por otro lado, se analiza la expresión de otra proteína que forma parte de la matriz extracelular, la fibronectina. En este caso los resultados muestran un aumento en la expresión de fibronectina cuando las células se someten a más velocidad de flujo, sin embargo, las diferencias no son significativas. De nuevo el experimento donde la expresión de KIM-1 es más elevada también se observa un ligero aumento de fibronectina comparado con el otro experimento.

En cuanto a la expresión de vimentina, los resultados muestran como las células sometidas a un flujo alto reprimen su expresión en comparación a las células sometidas a una menor velocidad de flujo. La expresión de esta proteína fibrosa está relacionada con la desdiferenciación celular hacia un fenotipo mesenquimal.

Por último, la expresión génica de la proteína  $\alpha$ SMA también se ve reducida cuando las células se encuentran en condiciones de flujo de mayor velocidad. Al igual que la vimentina,  $\alpha$ SMA se considera un marcador mesenquimal. En este caso la diferencia no es significativa debido a la variación de los resultados de los diferentes experimentos. De nuevo, las células cuyo experimento muestran una sobreexpresión de KIM-1 también tienen un nivel de expresión de  $\alpha$ SMA mayor, pudiéndose relacionar la señal de daño renal de ese experimento con la diferenciación a un fenotipo mesenquimal relacionado con la reparación tisular.

## 5.3 Generación knock-out mediante el sistema CRISPR/Cas

### 5.3.1 Optimización de la transfección

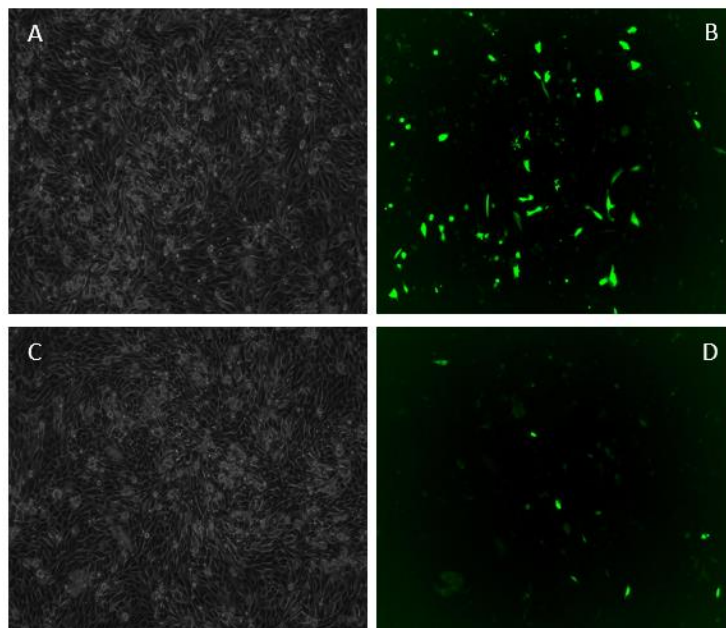
En primer lugar, es necesario determinar cuál es la proporción más adecuada para nuestro tipo celular entre los componentes del kit comercial Lipofectamine 3000 y la cantidad de ADN plasmídico a transfectar. Para ello se transfectan las células RPTEC con el vector pKSP-eGFP con distintos ratios de ADN y el reactivo lipofectamina tal y como indica el protocolo comercial. Para establecer la ratio que proporciona mayor eficiencia de transfección se observan las células transfectadas al microscopio de fluorescencia. Constatamos que las células RPTEC son transfectables y expresan el plásmido introducido, aun así, el número de células transfectadas es muy bajo. La ratio ADN:lipofectamina con la que vamos a trabajar es de 1:3.

Con el objetivo de mejorar la eficiencia, antes del proceso de transfección se realiza una tripsinización breve (30 segundos) de las células con tripsina-EDTA 0.05% para que se rompan las uniones celulares, pero sin que se desprendan de la superficie a la que se adhieren. De este modo se consigue disponer de más superficie celular para que los liposomas interactúen con la membrana, aumentando la posibilidad de transfección. Como se muestra en la Figura 14, realizando una tripsinización parcial

previa (Figura 14B) la eficiencia de la transfección aumenta en comparación a la transfección sin tripsinizar (Figura 14D).

Una vez optimizado el proceso pasamos a transfectar de manera conjunta el plásmido pKSP-eGFP y pIRES-N2. Como ya se ha mencionado anteriormente, la necesidad de la doble transfección viene dada por la estrategia del sistema CRISPR/Cas elegida. Para co-transfectar los plásmidos se mezclan en proporciones equivalentes manteniendo la cantidad de ADN establecida experimentalmente.

La eficiencia de la transfección únicamente con pKSP-eGFP o conjuntamente con pIRES-N2 es parecida al visualizar las células en el microscopio de fluorescencia. Se observan diferencias en la intensidad siendo mayor cuando se transfecta el plásmido de manera individual. Esto puede ser debido a que la cantidad pKSP-eGFP es menor cuando se transfecta conjuntamente con pIRES-N2 por tanto el número de plásmidos introducidos en las células disminuye y consecuentemente hay menos expresión de la proteína GFP.



**Figura 14.** Transfección células RPTEC con pKSP-eGFP. Los paneles A y B, campo claro y fluorescencia respectivamente, muestran las células RPTEC transfectadas realizando previamente una tripsinización leve. Los paneles C y D, campo claro y fluorescencia respectivamente, pertenecen a las células RPTEC transfectadas sin tripsinizar. Imágenes obtenidas con microscopio PAULA de Leica Microsystems.

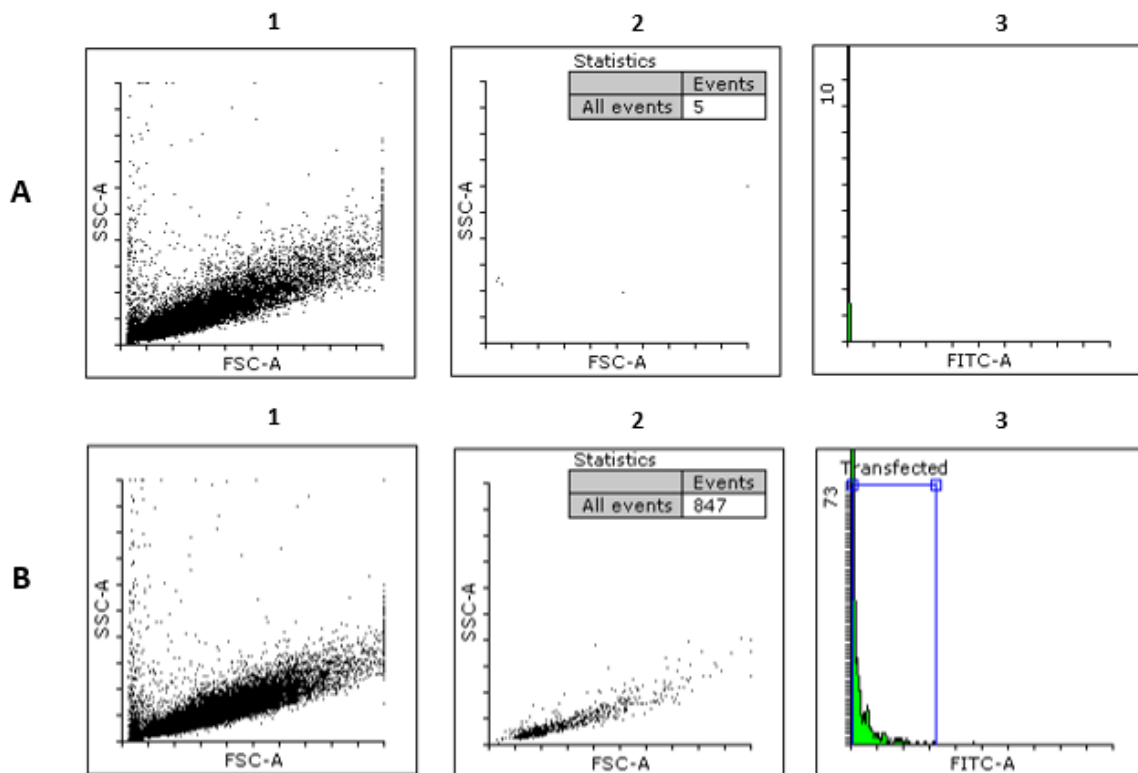
### 5.3.2 Selección mediante FACS

Para seleccionar las células transfectadas debemos determinar el momento óptimo de selección. El número de células que expresen la proteína GFP tiene que ser máximo, así como la intensidad de la fluorescencia que emiten, es decir la cantidad de GFP que estén expresando. Esto es importante para que el citómetro de flujo sea capaz de detectar el mayor número de células transfectadas y puedan ser clasificadas mediante FACS. Si la expresión de GFP por parte de las células transfectadas es débil también lo será la intensidad de la fluorescencia emitida y por tanto pueden ser descartadas en el proceso de selección.

Mediante la observación en microscopio de fluorescencia se establece que la expresión de fluorescencia es mayor y más intensa a partir de las 48 horas de la transfección.

Se seleccionan por separado células transfectadas con pKSP-eGFP y células transfectadas con pKSP-eGFP y pIRES-N2 de manera conjunta. Se obtiene un mayor número de células GFP positivas cuando se transfecta pKSP-eGFP individualmente que simultáneamente con pIRES-N2. Esto coincide con la observación de las diferencias en la intensidad de la fluorescencia comentadas en el apartado anterior.

En la Figura 15 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en el citómetro de flujo. Por un lado, se muestran células sin transfectar (15A) y por otro, células transfectadas con el plásmido pKSP-eGFP (15B). Las gráficas número 1 representan la población total de células clasificadas según sus características físicas: el tamaño celular, determinado por el parámetro FSC o *forward scatter*, y la complejidad celular, determinado por SSC o *side scatter*. Las gráficas centrales, número 2, muestran solo las células que emiten fluorescencia correspondiendo así a las células transfectadas. El número concreto de células positivas para GFP aparece en la tabla dentro de esta misma gráfica. Y por último, en las gráficas número 3 se observa la fluorescencia que se emite en el canal FITC-A (que coincide con la fluorescencia de la proteína GFP). La región delimitada incluye las células a partir de un determinado nivel de fluorescencia, las células que se encuentren en esta región serán las seleccionadas dentro de toda la población, dando como resultado la gráfica número 2.



**Figura 15. Selección células transfectadas mediante FACS. A)** Células sin transfectar. **B)** Células transfectadas con el plásmido pKSP-eGFP. **1)** Población total de las células clasificadas según sus parámetros físicos FSC y SSC. **2)** Células transfectadas seleccionadas, positivas para GFP. En la tabla dentro de la gráfica aparece el número de células seleccionadas. **3)** Expresión de la fluorescencia en el canal FITC-A para seleccionar las células GFP+. La región delimitada selecciona las células de la población que están dentro de ese nivel de fluorescencia determinado. El resultado de la selección se representa en el gráfico 2.

Tras la selección se sembraron todas las células en un solo pocillo de 96 para tratar de alcanzar la densidad que usamos siempre y que es crítica para el desarrollo normal de las RPTEC. Aunque las células mostraron dificultades para crecer y muchas de ellas morían, algunas colonias llegaron a desarrollarse. De estas, solo algunas células fueron capaces de incorporar el plásmido de manera estable, manteniendo la fluorescencia y transmitiéndola a la descendencia. Sin embargo, la gran mayoría perdieron la expresión de GFP indicando que la transfección fue transitoria.



### **5.3.3 Transfección del sistema CRISPR/Cas**

Simultáneamente a los experimentos para poner a punto el aislamiento y crecimiento de células transfectadas, se procedió a establecer las condiciones para la transfección del sistema CRISPR/Cas. Teniendo en cuenta que el plásmido CRISPR/Cas está diseñado para facilitar la selección y, a diferencia del plásmido pKSP-eGFP, presenta un promotor fuerte que promueve su transcripción, esperábamos obtener una mayor expresión de la proteína GFP facilitando así el proceso de selección.

Siguiendo el protocolo definido experimentalmente con Lipofectamine 3000 la transfección del plásmido CRISPR/Cas no funcionó. Debido a estos resultados se decidió poner a prueba la transfección del plásmido con el reactivo de la misma casa comercial: Ultracruz Transfection Reagent de Santa Cruz Biotechnology. Del mismo modo, los resultados fueron negativos.

Para comprobar la funcionalidad de este nuevo reactivo de transfección se transfectaron células con KSP-eGFP y la expresión de este plásmido fue mayor que con el plásmido CRISPR/Cas.

Del mismo modo que con Lipofectamine 3000, se realizaron tripsinizaciones leves previas a la transfección. Los resultados mostraron de nuevo que aumenta la eficiencia de la transfección para el plásmido KSP-eGFP pero los resultados para CRISPR/Cas no presentaron cambios significativos.

Dado que las transfecciones con KSP-GFP con ambos reactivos funcionan y la expresión del plásmido CRISPR/Cas es prácticamente nula es probable que exista un problema en la expresión de este plásmido por parte de las células RPTEC. Además, también puede presentar problemas en su internalización tanto a nivel plasmático como a nivel nuclear, imposibilitando así su expresión por parte de la célula.

La Tabla 3 muestra de forma resumida los principales problemas encontrados a lo largo de todo este proceso y las soluciones que se intentaron para solventarlos.

**Tabla 3. Problemas y soluciones en el proceso de generación del *knock-out***

Problemas encontrados	Soluciones intentadas
<b>Optimización de la transfección y selección de células transfectadas</b>	
Baja eficiencia de la transfección	La tripsinización leve antes de la transfección aumenta la eficiencia
Escaso crecimiento celular tras la selección	Mejorar las condiciones de recogida de las células durante el <i>sorting</i> Añadir medio condicionado (procedente de otros cultivos celulares sanos)
Desaparición de las células GFP+ en el cambio del medio de cultivo (solo las células no transfectadas permanecían adheridas)	Retirada del medio con micropipeta en lugar de aspiración
Contaminación del cultivo tras la selección	Reforzar el control de la esterilidad en la selección mediante FACS
<b>Plásmido CRISPR/Cas</b>	
Con el reactivo Lipofectamine 3000 no se produce transfección	Utilizar el medio de transfección Ultracruz Transfection Reagent (recomendado por la misma casa comercial del plásmido)
Con el reactivo Ultracruz Transfection no se produce transfección	Se evalúa la funcionalidad del reactivo transfectando con el plásmido KSP. La transfección es positiva.

Debido a esta problemática y al tiempo limitante para hallar una solución y/o alternativa se decide finalizar los experimentos para la generación de un *knock-out*. En consecuencia, no se pudo abordar el objetivo 3 en el que se planteaba evaluar los efectos del *shear stress* en la línea celular *knock-out* para AMPK.

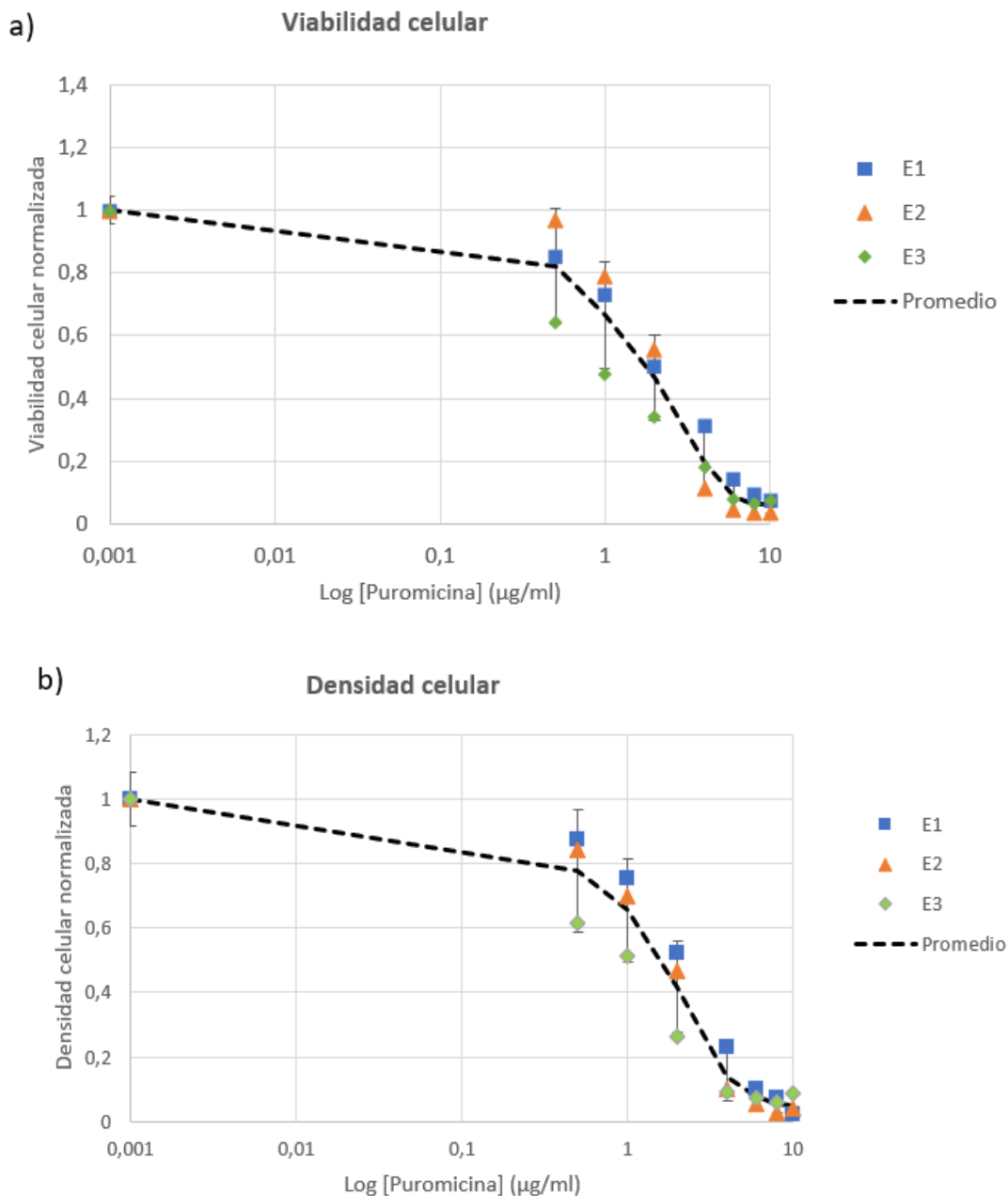
#### **5.3.4 Curva de sensibilidad de las células RPTEC a Puromicina**

De forma paralela a los experimentos anteriores se realizaron ensayos de viabilidad celular para determinar la sensibilidad de las RPTEC a diferentes dosis de Puromicina. El objetivo es poder seleccionar aquellas células que incorporen el plásmido con resistencia a este antibiótico, de modo que sólo sobrevivan las células transfectadas correctamente. Para ello es necesario determinar cuál es la concentración que produce

el 50% del efecto máximo, conocido como  $EC_{50}$ , dicho de otro modo, la concentración que produce el 50% de mortalidad en las células. Para establecer una curva dosis-respuesta se realizaron ensayos con PrestoBlue y Cristal Violeta.

Los ensayos de PrestoBlue se realizaron a las 24 y 48 horas de la exposición al antibiótico. Una de las ventajas que presenta este compuesto de resazurina es que no es tóxico para las células de modo que puede emplearse para determinar la viabilidad celular sin comprometer su continuidad para experimentos o ensayos posteriores. De esta manera se observó que, con las concentraciones de Puromicina empleadas es necesario que pasen 48 horas tras la exposición para establecer una curva dosis-respuesta (Figura 16a). Tras 48 horas y posterior al ensayo PrestoBlue se realizaron tinciones con Cristal Violeta para determinar la densidad celular (Figura 16b).

Los resultados, representados en la Figura 16, muestran que la concentración de Puromicina que produce el 50% de muerte celular está entorno a una concentración de 2  $\mu\text{g/ml}$ , tanto en la viabilidad como en la densidad celular.



## 6. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo se ha centrado en determinar los cambios en el metabolismo de las células RPTEC/TERT1 sometidas a un *shear stress*, condición en las que se encuentran las células del túbulo proximal en un sistema *in vivo*. De este modo se esperaría reproducir de una forma más fiable lo que ocurre en un sistema fisiológico en cuanto a las fuerzas mecánicas a las que está sometido.

Las células renales del túbulo proximal, debido a su función de absorción y excreción de sustancias y en consecuencia la elevada expresión de transportadores para llevar a cabo esta función, son células que requieren un gasto energético muy elevado. Sometiendo las células a una condición que pretende mimetizar lo que ocurre en un sistema *in vivo* se espera que las células se comporten de modo similar a como lo hacen en el organismo. Por tanto sería de esperar que su actividad transportadora de sustancias así como su capacidad endocítica fuera más elevada, tal y como se demuestra en diferentes estudios<sup>5,14,61</sup>, promoviendo un mayor gasto energético y en consecuencia precisar un aumento de las vías productoras de ATP. La proteína AMPK es la encargada de orquestar la energía disponible en las células y activar vías para la restauración de los niveles de ATP, por lo que sería de esperar que su expresión fuera aumentada en condiciones de *shear stress*. Diversos estudios muestran como la aplicación de una fuerza mecánica tiene un efecto en la activación de la proteína AMPK, mediante la fosforilación de su residuo treonina 172 por parte de la proteína LKB1 (*liver kinase B1*). Por ejemplo en células endoteliales vasculares se ha demostrado que la activación de AMPK inducida por el *shear stress* regula la homeostasis vascular<sup>62</sup>, y en células epiteliales la fuerza aplicada a la E-cadherina también promueve la activación de esta proteína<sup>44</sup>. A pesar de estas evidencias, los resultados obtenidos en este estudio no muestran diferencias significativas en la expresión de AMPK cuando las células se someten a un flujo laminar, de modo que no podemos correlacionar una mayor expresión con un aumento en la activación de esta proteína.

Por otro lado, los resultados obtenidos en cuanto a la expresión de la proteína mTOR tampoco muestran diferencias significativas en su expresión. Esta proteína además de promover el crecimiento y la biosíntesis de macromoléculas también juega un papel importante en la represión de la autofagia<sup>63</sup>. Este proceso se activa como

respuesta adaptativa a situaciones de estrés en las células por ejemplo cuando las condiciones energéticas son pobres. En la autofagia se lleva a cabo la degradación de orgánulos y macromoléculas intracelulares que luego se utilizan para sintetizar proteínas, orgánulos y energía que requiere la célula. De este modo, un nivel bajo en la expresión de mTOR puede ser indicativo de condiciones de estrés extracelular o intracelular. Otros estudios han demostrado que el *shear stress* tiene efectos en el tamaño celular y en el proceso de autofagia mediante vías reguladas por mTOR<sup>64,65</sup>. Asimismo se ha visto que el flujo modula cambios dependientes de mTOR en la biogénesis mitocondrial y lisosomal, y además, se ha sugerido que el papel de esta proteína en la regulación de la capacidad endocítica del túbulo proximal también puede ser dependiente del *shear stress*<sup>61</sup>. Aun así, nuestro modelo no muestra variaciones en la expresión de esta proteína.

En cuanto a la expresión de GAPDH los resultados sí que muestran un aumento significativo cuando las células se someten a un flujo laminar. La enzima GAPDH participa en la glucólisis de modo que un aumento de esta proteína podría relacionarse con una mayor actividad metabólica en el proceso de oxidación de la glucosa para obtener energía. Este resultado puede relacionarse con el aumento de los niveles de ATP celular descritos al aplicarse una fuerza mecánica<sup>44</sup>. Sin embargo, GAPDH participa en otros procesos celulares y sus niveles pueden verse aumentados bajo múltiples condiciones de estrés<sup>66</sup>.

Otro de los efectos del *shear stress* observados en este estudio es el aumento en la expresión de la subunidad  $\alpha$  de las proteínas HIF. HIF es ampliamente conocida por su función como regulador de la expresión de genes en situaciones de hipoxia. Cuando la célula se encuentra en unas condiciones de oxígeno normales la subunidad HIF $\alpha$  es degradada en el proteosoma, mientras que en condiciones de hipoxia se vuelve estable y se transloca al núcleo. Una vez en el núcleo dimeriza con la subunidad HIF $\beta$  y llevan a cabo la activación de genes para dar respuesta a la falta de oxígeno. De modo que, la regulación y estabilidad de HIF $\alpha$  en respuesta a la hipoxia ocurre principalmente a nivel postraducciona. Por otra parte, la expresión de HIF $\alpha$  también puede estar regulada indirectamente por situaciones de estrés, citocinas, hormonas o factores de crecimiento que activan su transcripción en condiciones de normoxia<sup>67</sup>. Esto nos indica que un

aumento en su expresión no tiene por qué estar relacionada únicamente con unas condiciones limitantes de oxígeno. Además, la expresión a nivel de ARN de la subunidad  $\alpha$  no implica que la proteína sea estable y funcional. Para ello se debería de complementar estos resultados con otra técnica que permita determinar si hay expresión a nivel proteico, como por ejemplo la técnica de Western Blot.

Asimismo, los resultados obtenidos en el consumo de oxígeno demuestran que la captación de  $O_2$  es 4 veces mayor en las células RPTEC sometidas a un flujo alto que a un flujo bajo, por lo que la expresión de HIF no parece estar relacionada con un fenómeno de hipoxia.

Del mismo modo que se ha demostrado en otros estudios<sup>9</sup>, la baja expresión de los marcadores mesenquimales como la vimentina y  $\alpha$ SMA en condiciones de flujo alto sugieren que dicha condición revertiría la desdiferenciación celular. La transición epitelio-mesénquima (EMT)<sup>68</sup> es un mecanismo celular importante en el desarrollo embrionario y la reparación de tejidos. Durante este proceso las células epiteliales pierden sus características de polarización como el borde en cepillo y las uniones estrechas, por ejemplo disminuye la expresión de marcadores como la E-cadherina o la unión estrecha ZO-1 (zónula occludens-1), y aumenta la expresión de marcadores mesenquimales como la vimentina y la  $\alpha$ -actina del músculo liso o  $\alpha$ SMA. La expresión de estas proteínas puede relacionarse con la reparación de daño epitelial.

Por último, en cuanto a la expresión del marcador de daño renal KIM-1, los resultados han sido distintos entre los experimentos y en consecuencia la variabilidad de los datos ha sido destacable. En el experimento dónde KIM-1 es sobreexpresado también cuentan con una mayor expresión el colágeno IV y el marcador  $\alpha$ SMA. Esto por un lado nos indica que uno de los experimentos ha sufrido un daño no detectado antes de proceder con el análisis de la expresión y por otro pone de manifiesto la dificultad de reproducir los resultados.

El difícil manejo de los sistemas fluídicos junto con la susceptibilidad de las células es uno de los principales inconvenientes en la reproducibilidad de los datos. Sin embargo, debido a los efectos demostrados del *shear stress* junto con la necesidad de obtener resultados que puedan extrapolarse de manera más fiable a organismos vivos,

es inevitable un direccionamiento hacia nuevos sistemas de cultivo capaces de mimetizar las condiciones *in vivo*.

Aparte del objetivo principal, otro propósito planteado en este estudio ha sido la generación de una línea celular *knock-out* para la proteína AMPK y evaluar su efecto en condiciones de *shear stress*. Los resultados obtenidos han demostrado dos limitaciones principales, por un lado, la dificultad del crecimiento celular después de la selección mediante FACS y por otro lado, la imposibilidad de transfectar con el plásmido CRISPR/Cas pese a conseguir optimizar el proceso de transfección con el plásmido pKSP-eGFP.

A pesar de los numerosos estudios dónde se ha llevado a cabo la edición génica en células renales<sup>69</sup>, sólo existen dos estudios en células RPTEC/TERT1 en los que se ha utilizado el sistema CRISPR/Cas. En uno de ellos consiguieron generar un *knock-out* de la proteína CD46 demostrando que se pueden utilizar este tipo de células para la edición génica sin perder las características primarias de las células maternas<sup>70</sup>. No obstante en el otro estudio, dónde se pretendió generar un *knock-in* mediante la introducción de un gen reportero, no se consiguió en las células RPTEC pero sí en otro tipo de células del túbulo proximal, HK-2<sup>71</sup>. Aun consiguiendo una buena eficiencia de transfección, el principal problema que se encontraron con las células RPTEC fue la dificultad de seleccionarlas y aislar los clones resistentes a puromicina.

La técnica de edición génica mediante el sistema CRISPR/Cas es una herramienta muy útil y reciente<sup>50</sup> que puede proporcionar mucha información en cualquier línea de investigación. Su uso será aún más simplificado y mejorado de manera que en un futuro podría usarse como técnica de rutina en cualquier laboratorio.



## 7. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se extraen las siguientes conclusiones:

1. El consumo de oxígeno por parte de las células RPTEC sometidas a una perfusión alta (0.2 ml/min) es hasta 4 veces mayor que en un flujo bajo (0.01 ml/min).
2. En el sistema fluídico empleado, las células RPTEC de diferentes canales que se encuentran bajo las mismas condiciones de *shear stress* no presentan diferencias a nivel de expresión génica.
3. Las condiciones de *shear stress* tienen un efecto en las células RPTEC a nivel de expresión de varios genes relacionados con el metabolismo y la dediferenciación celular. Existen diferencias significativas en la expresión de los genes: GAPDH, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  y vimentina.
4. Existe una dificultad asociada a la manipulación del sistema de flujo que junto con la susceptibilidad de las células hace que la obtención de los resultados sea costosa y, en muchos casos, difíciles de reproducir. Es necesaria la optimización de la técnica para que las células no experimenten cambios que puedan comprometer los resultados.
5. Las células RPTEC son transfectables mediante liposomas, pueden introducir material genético exógeno y expresarlo sin afectar su viabilidad.
6. Realizar una tripsinización parcial antes del proceso de transfección aumenta la eficiencia de la transfección en células RPTEC/TERT1.
7. Tras la selección de las células transfectadas su crecimiento se ve limitado por el número de células presentes en el cultivo. Aumentar la eficiencia de transfección y optimizar el proceso de selección es indispensable para conseguir la densidad mínima en la que las células RPTEC se desarrollan con normalidad

## 8. CONCLUSIONS

The following conclusions are drawn from the results obtained in this study:

1. Oxygen consumption by RPTEC cells subjected to high perfusion (0.2 ml/min) is up to 4 times higher than at low flow (0.01 ml/min).
2. In the fluidic system used, RPTEC cells from different channels under the same shear stress conditions do not show differences in gene expression.
3. Shear stress conditions have an effect on RPTEC cells at the level of expression of several genes related to metabolism and cell dedifferentiation. There are significant differences in the expression of the genes: GAPDH, HIF1 $\alpha$ , HIF2 $\alpha$  and vimentin.
4. There is a difficulty associated to the manipulation of the flow system that together with the susceptibility of the cells makes the process complex and, in many cases, difficult to reproduce. It is necessary to optimize the technique so that the cells do not undergo changes that could compromise the results.
5. RPTEC cells are amenable to transfection by liposomes, they can introduce exogenous genetic material and express it without affecting its viability.
6. Performing a mild trypsinization before the transfection process increases the efficiency of transfection into RPTEC/TERT1 cells.
7. After selection of the transfected cells, their growth is limited by the number of cells present in the culture. Increasing the transfection efficiency and optimizing the selection process is essential to achieve the minimum density at which RPTEC cells develop normally.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Lote CJ. *Principles of Renal Physiology*. Springer New York; 2013. doi:10.1007/978-1-4614-3785-7
2. Moorthy AV, Blichfeldt TC. Anatomy and Physiology of the Kidney. In: *Pathophysiology of Kidney Disease and Hypertension*. Elsevier Inc.; 2009:1-15. doi:10.1016/B978-1-4160-4391-1.50007-2
3. Zhuo JL, Li XC. Proximal nephron. *Compr Physiol*. 2013;3(3):1079-1123. doi:10.1002/cphy.c110061
4. Raghavan V, Weisz OA. Discerning the role of mechanosensors in regulating proximal tubule function. *Am J Physiol Physiol*. 2016;310(1):F1-F5. doi:10.1152/ajprenal.00373.2015
5. Du Z, Yan Q, Duan Y, Weinbaum S, Weinstein AM, Wang T. Axial flow modulates proximal tubule NHE3 and H-ATPase activities by changing microvillus bending moments. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2006;290(2). doi:10.1152/ajprenal.00255.2005
6. Raghavan V, Rbaibi Y, Pastor-Soler NM, Carattino MD, Weisz OA. Shear stress-dependent regulation of apical endocytosis in renal proximal tubule cells mediated by primary cilia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(23):8506-8511. doi:10.1073/pnas.1402195111
7. Wang T, Weinbaum S, Weinstein AM. Regulation of glomerulotubular balance: flow-activated proximal tubule function. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2017;469(5-6):643-654. doi:10.1007/s00424-017-1960-8
8. Duan Y, Gotoh N, Yan Q, et al. Shear-induced reorganization of renal proximal tubule cell actin cytoskeleton and apical junctional complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(32):11418-11423. doi:10.1073/pnas.0804954105
9. Maggiorani D, Dissard R, Belloy M, et al. Shear stress-induced alteration of epithelial organization in human renal tubular cells. *PLoS One*. 2015;10(7):131416. doi:10.1371/journal.pone.0131416
10. Zanetti F. Kidney-on-a-chip. In: *Organ-on-a-Chip: Engineered Microenvironments*

*for Safety and Efficacy Testing*. Elsevier; 2019:233-253. doi:10.1016/B978-0-12-817202-5.00007-3

11. Wilmer MJ, Ng CP, Lanz HL, Vulto P, Suter-Dick L, Masereeuw R. Kidney-on-a-Chip Technology for Drug-Induced Nephrotoxicity Screening. *Trends Biotechnol.* 2016;34(2):156-170. doi:10.1016/j.tibtech.2015.11.001
12. Homan KA, Kolesky DB, Skylar-Scott MA, et al. Bioprinting of 3D Convulated Renal Proximal Tubules on Perfusable Chips. *Sci Rep.* 2016;6(1):1-13. doi:10.1038/srep34845
13. Raghavan V, Weisz OA. Flow stimulated endocytosis in the proximal tubule. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015;24(4):359-365. doi:10.1097/MNH.0000000000000135
14. Duan Y, Weinstein AM, Weinbaum S, Wang T. Shear stress-induced changes of membrane transporter localization and expression in mouse proximal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(50):21860-21865. doi:10.1073/pnas.1015751107
15. Jang KJ, Cho HS, Kang DH, Bae WG, Kwon TH, Suh KY. Fluid-shear-stress-induced translocation of aquaporin-2 and reorganization of actin cytoskeleton in renal tubular epithelial cells. *Integr Biol.* 2011;3(2):134-141. doi:10.1039/c0ib00018c
16. Kunnen SJ, Malas TB, Semeins CM, Bakker AD, Peters DJM. Comprehensive transcriptome analysis of fluid shear stress altered gene expression in renal epithelial cells. *J Cell Physiol.* 2018;233(4):3615-3628. doi:10.1002/jcp.26222
17. Sharma A, Mucino MJ, Ronco C. Renal functional reserve and renal recovery after acute kidney injury. In: *Nephron - Clinical Practice*. Vol 127. S. Karger AG; 2014:94-100. doi:10.1159/000363721
18. Satir P, Christensen ST. Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annu Rev Physiol.* 2007;69:377-400. doi:10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236
19. Malicki JJ, Johnson CA. The Cilium: Cellular Antenna and Central Processing Unit. *Trends Cell Biol.* 2017;27:126-140. doi:10.1016/j.tcb.2016.08.002

20. Praetorius HA. The primary cilium as sensor of fluid flow: New building blocks to the model. A review in the theme: Cell signaling: Proteins, pathways and mechanisms. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2015;308(3):C198-C208. doi:10.1152/ajpcell.00336.2014
21. H. Kathem S, M. Mohieldin A, M. Nauli S. The Roles of Primary cilia in Polycystic Kidney Disease. *AIMS Mol Sci.* 2013;1(1):27-46. doi:10.3934/molsci.2013.1.27
22. Park J, Dhillon P, Hurtado C, et al. Renal proximal tubule cell state and metabolism are coupled by nuclear receptors. *bioRxiv.* September 2020:2020.09.21.307231. doi:10.1101/2020.09.21.307231
23. Lodish H, Berk A, Zipursky SL et al. *Molecular Cell Biology 5th Ed.*; 2000. [https://www.academia.edu/4622734/Molecular\\_Cell\\_Biology\\_5th\\_ed\\_Lodish\\_et\\_al](https://www.academia.edu/4622734/Molecular_Cell_Biology_5th_ed_Lodish_et_al). Accessed November 28, 2020.
24. Bhargava P, Schnellmann RG. Mitochondrial energetics in the kidney. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(10):629-646. doi:10.1038/nrneph.2017.107
25. Kang HM, Ahn SH, Choi P, et al. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nat Med.* 2015;21(1):37-46. doi:10.1038/nm.3762
26. Turman MA, Bates CM. Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia: Effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells. *Ren Fail.* 1997;19(1):47-60. doi:10.3109/08860229709026259
27. Yuan HX, Xiong Y, Guan KL. Nutrient Sensing, Metabolism, and Cell Growth Control. *Mol Cell.* 2013;49(3):379-387. doi:10.1016/j.molcel.2013.01.019
28. Sukumaran A, Choi K, Dasgupta B. Insight on Transcriptional Regulation of the Energy Sensing AMPK and Biosynthetic mTOR Pathway Genes. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:671. doi:10.3389/fcell.2020.00671
29. Lin SC, Hardie DG. AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. *Cell Metab.* 2018;27(2):299-313. doi:10.1016/j.cmet.2017.10.009
30. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(4):251-262.

doi:10.1038/nrm3311

31. Hallows KR, Mount PF, Pastor-Soler NM, Power DA. Role of the energy sensor AMP-activated protein kinase in renal physiology and disease. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2010;298(5). doi:10.1152/ajprenal.00005.2010
32. Pastor-Soler NM, Hallows KR. AMP-activated protein kinase regulation of kidney tubular transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2012;21(5):523-533. doi:10.1097/MNH.0b013e3283562390
33. Li L, Wang C, Yang H, et al. Metabolomics reveal mitochondrial and fatty acid metabolism disorders that contribute to the development of DKD in T2DM patients. *Mol Biosyst.* 2017;13(11):2392-2400. doi:10.1039/c7mb00167c
34. Dugan LL, You YH, Ali SS, et al. AMPK dysregulation promotes diabetes-related reduction of superoxide and mitochondrial function. *J Clin Invest.* 2013;123(11):4888-4899. doi:10.1172/JCI66218
35. Han SH, Malaga-Dleguez L, Chinga F, et al. Deletion of Lkb1 in renal tubular epithelial cells leads to CKD by altering metabolism. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(2):439-453. doi:10.1681/ASN.2014121181
36. Habib SL, Yadav A, Kidane D, Weiss RH, Liang S. Novel protective mechanism of reducing renal cell damage in diabetes: Activation AMPK by AICAR increased NRF2/OGG1 proteins and reduced oxidative DNA damage. *Cell Cycle.* 2016;15(22):3048-3059. doi:10.1080/15384101.2016.1231259
37. Zhou X, Muise ES, Haimbach R, et al. Pan-AMPK activation improves renal function in a rat model of progressive diabetic nephropathy. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019;371(1):45-55. doi:10.1124/jpet.119.258244
38. Hasanvand A, Amini-Khoei H, Jahanabadi S, et al. Metformin attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats through activation of AMPK signaling pathway. *J Nephropathol.* 2018;7(1):37-42. doi:10.15171/jnp.2018.11
39. Declèves AE, Zolkipli Z, Satriano J, et al. Regulation of lipid accumulation by AMK-Activated kinase in high fat diet-induced kidney injury. *Kidney Int.* 2014;85(3):611-623. doi:10.1038/ki.2013.462

40. Li H, Min Q, Ouyang C, et al. AMPK activation prevents excess nutrient-induced hepatic lipid accumulation by inhibiting mTORC1 signaling and endoplasmic reticulum stress response. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2014;1842(9):1844-1854. doi:10.1016/j.bbadis.2014.07.002
41. Ling NXY, Kaczmarek A, Hoque A, et al. mTORC1 directly inhibits AMPK to promote cell proliferation under nutrient stress. *Nat Metab.* 2020;2(1):41-49. doi:10.1038/s42255-019-0157-1
42. Liu GY, Sabatini DM. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(4):183-203. doi:10.1038/s41580-019-0199-y
43. Fantus D, Rogers NM, Grahammer F, Huber TB, Thomson AW. Roles of mTOR complexes in the kidney: Implications for renal disease and transplantation. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12(10):587-609. doi:10.1038/nrneph.2016.108
44. Bays JL, Campbell HK, Heidema C, Sebbagh M, Demali KA. Linking E-cadherin mechanotransduction to cell metabolism through force-mediated activation of AMPK. *Nat Cell Biol.* 2017;19(6):724-731. doi:10.1038/ncb3537
45. Guo Y, Steele HE, Li BY, Na S. Fluid flow-induced activation of subcellular AMPK and its interaction with FAK and Src. *Arch Biochem Biophys.* 2020;679. doi:10.1016/j.abb.2019.108208
46. Orhon I, Dupont N, Zaidan M, et al. Primary-cilium-dependent autophagy controls epithelial cell volume in response to fluid flow. *Nat Cell Biol.* 2016;18(6):657-667. doi:10.1038/ncb3360
47. Miceli C, Roccio F, Penalva-Mousset L, et al. The primary cilium and lipophagy translate mechanical forces to direct metabolic adaptation of kidney epithelial cells. *Nat Cell Biol.* 2020;22(9):1091-1102. doi:10.1038/s41556-020-0566-0
48. Ren Q, Gliozzi ML, Rittenhouse NL, et al. Shear stress and oxygen availability drive differential changes in opossum kidney proximal tubule cell metabolism and endocytosis. *Traffic.* 2019;20(6):448-459. doi:10.1111/tra.12648
49. Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013;31(7):397-405.

- doi:10.1016/j.tibtech.2013.04.004
50. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (80- )*. 2014;346(6213). doi:10.1126/science.1258096
  51. Simoff I, Karlgren M, Backlund M, et al. Complete Knockout of Endogenous Mdr1 (Abcb1) in MDCK Cells by CRISPR-Cas9. *J Pharm Sci*. 2016;105(2):1017-1021. doi:10.1016/S0022-3549(15)00171-9
  52. Van Itallie CM, Tietgens AJ, Krystofiak E, Kachar B, Anderson JM. A complex of ZO-1 and the BAR-domain protein TOCA-1 regulates actin assembly at the tight junction. *Mol Biol Cell*. 2015;26(15):2769-2787. doi:10.1091/mbc.E15-04-0232
  53. Porath B, Gainullin VG, Cornec-Le Gall E, et al. Mutations in GANAB, Encoding the Glucosidase II $\alpha$  Subunit, Cause Autosomal-Dominant Polycystic Kidney and Liver Disease. *Am J Hum Genet*. 2016;98(6):1193-1207. doi:10.1016/j.ajhg.2016.05.004
  54. Cruz NM, Freedman BS. CRISPR Gene Editing in the Kidney HHS Public Access. 2018;71(6):874-883. doi:10.1053/j.ajkd.2018.02.347
  55. Wieser M, Stadler G, Jennings P, et al. hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2008;295:1365-1375. doi:10.1152/ajprenal.90405.2008.-Telomere-dependent
  56. Shao X, Johnson JE, Richardson JA, Hiesberger T, Igarashi P. A minimal Ksp-cadherin promoter linked to a green fluorescent protein reporter gene exhibits tissue-specific expression in the developing kidney and genitourinary tract. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(7):1824-1836. doi:10.1097/01.ASN.0000016443.50138.CD
  57. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013;154(6):1380-1389. doi:10.1016/j.cell.2013.08.021
  58. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(21):7413-7417. doi:10.1073/pnas.84.21.7413
  59. Bonventre J V. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): A specific and sensitive

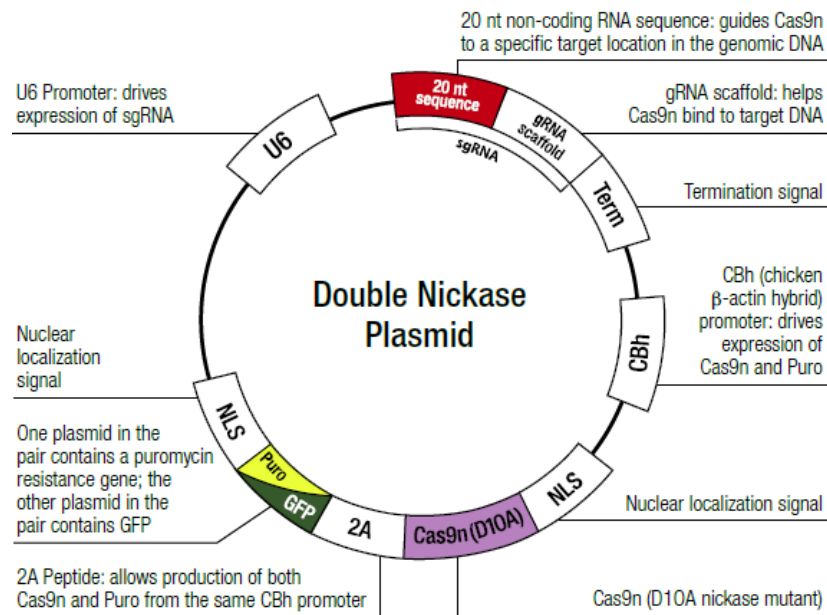


- biomarker of kidney injury. In: *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. Vol 68. Scand J Clin Lab Invest Suppl; 2008:78-83. doi:10.1080/00365510802145059
60. Alexakis C, Maxwell P, Bou-Gharios G. Organ-Specific Collagen Expression: Implications for Renal Disease. *Nephron Exp Nephrol*. 2005;102(3-4):e71-e75. doi:10.1159/000089684
  61. Long KR, Shipman KE, Rbaibi Y, et al. Proximal tubule apical endocytosis is modulated by fluid shear stress via an mTOR-dependent pathway. *Mol Biol Cell*. 2017;28(19):2508-2517. doi:10.1091/mbc.E17-04-0211
  62. Zhang Y, Lee TS, Kolb EM, et al. AMP-activated protein kinase is involved in endothelial NO synthase activation in response to shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(6):1281-1287. doi:10.1161/01.ATV.0000221230.08596.98
  63. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017;168(6):960-976. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004
  64. Boehlke C, Kotsis F, Patel V, et al. Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1. *Nat Cell Biol*. 2010;12(11):1115-1122. doi:10.1038/ncb2117
  65. Orhon I, Dupont N, Zaidan M, et al. Primary-cilium-dependent autophagy controls epithelial cell volume in response to fluid flow. *Nat Cell Biol*. 2016;18(6):657-667. doi:10.1038/ncb3360
  66. Nicholls C, Li H, Liu JP. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012;39(8):674-679. doi:10.1111/j.1440-1681.2011.05599.x
  67. Kietzmann T, Mennerich D, Dimova EY. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and phosphorylation: Impact on stability, localization, and transactivity. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4(FEB). doi:10.3389/fcell.2016.00011
  68. Cruz-Solbes AS, Youker K. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) and endothelial to mesenchymal transition (EndMT): Role and implications in kidney fibrosis. In: *Results and Problems in Cell Differentiation*. Vol 60. Springer Verlag;

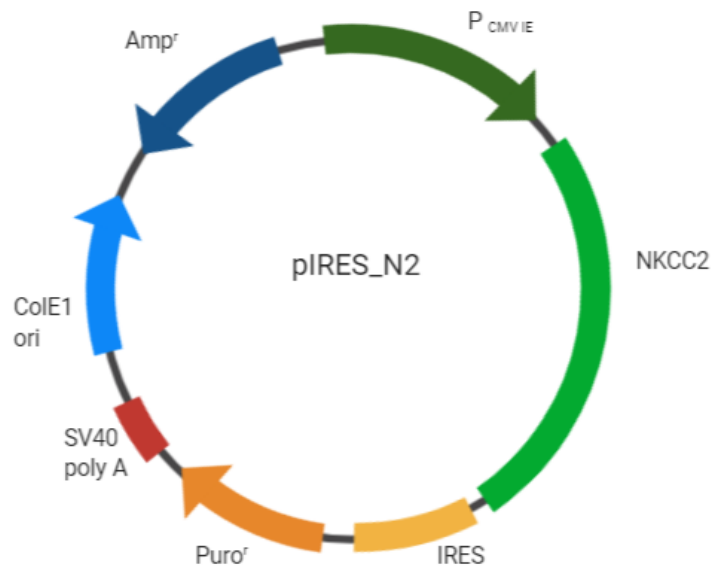
2017:345-372. doi:10.1007/978-3-319-51436-9\_13

69. WareJoncas Z, Campbell JM, Martínez-Gálvez G, et al. Precision gene editing technology and applications in nephrology. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14(11):663-677. doi:10.1038/s41581-018-0047-x
70. Wieser M, Francisci T, Lackner D, et al. CD46 knock-out using CRISPR/Cas9 editing of hTERT immortalized human cells modulates complement activation. *PLoS One.* 2019;14(4):1-13. doi:10.1371/journal.pone.0214514
71. Veach RA, Wilson MH. CRISPR/Cas9 engineering of a KIM-1 reporter human proximal tubule cell line. *PLoS One.* 2018;13(9):e0204487. doi:10.1371/journal.pone.0204487

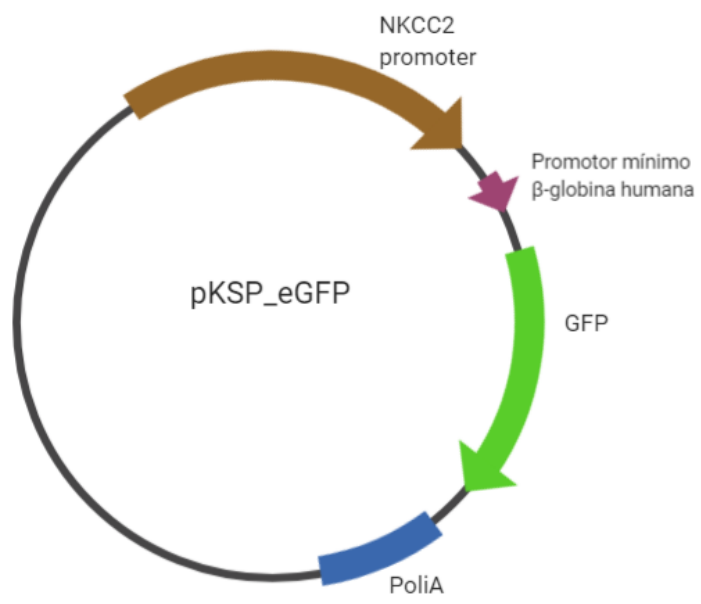
## 10. ANEXO I. PLÁSMIDOS TRANSFECCIONES



Plásmido CRISPR/Cas Doble Nickase de Santa Cruz Biotechnology. Imagen obtenida de la casa comercial.



Plásmido pIRES\_N2 realizado por el grupo de Fisiopren



Plásmido pKSP-eGFP descrito por el grupo de Igarashi <sup>56</sup>

