

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE POSTGRADO



“EFECTO DEL MERCURIO SOBRE EL TRANSPORTE
TRANSEPTHELIAL DE SEROALBUMINA BOVINA
POR EPITELIOS DE CELULAS OK”

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA
CELULAR

PRESENTADA POR

María del Pilar Carranza Rosales

San Nicolás de los Garza, N. L., México Diciembre de 1997

TM

Z5320

FCB

1997

C3

1997

María del Pilar Carranza Rosales

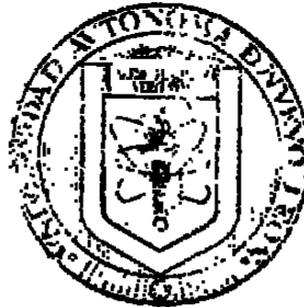


1020121308

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE POSTGRADO



**"EFECTO DEL MERCURIO SOBRE EL TRANSPORTE
TRANSEMEMBRAL DE SEROALBUMINA BOVINA
POR EPITELIOS DE CELULAS OK"**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA
CELULAR**

PRESENTADA POR

María del Pilar Carranza Rosales

San Nicolás de los Garza, N.L., México Diciembre de 1997

TM
25320
FCB
1997
C3

0131-18660

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE POSTGRADO**



**“EFECTO DEL MERCURIO SOBRE EL TRANSPORTE
TRANSEPITELIAL DE SEROALBUMINA BOVINA POR
EPITELIOS DE CELULAS OK”**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA CELULAR**

PRESENTADA POR

María del Pilar Carranza Rosales

San Nicolás de los Garza, N.L., México

Diciembre de 1997



FONDO TESIS

**“EFECTO DEL MERCURIO SOBRE EL TRANSPORTE TRANSEPITELIAL DE
SEROALBUMINA BOVINA POR EPITELIOS DE CELULAS OK”**

El Comité de Tesis que revisó y aprobó el trabajo:

Dr. Salvador Said y Fernández
Presidente

Dra. Adriana Elizondo Herrera
Secretario

Dr. Mario R. Morales Vallarta
Vocal

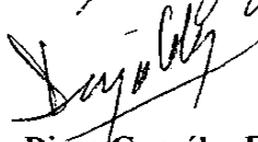
Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez
Vocal

Dr. Javier Vargas Villarreal
Vocal

ASESORES



Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez



Dr. Diego González Ramírez



Dr. Javier Vargas Villarreal



Dra. Adriana Elizondo Herrera

El presente trabajo se realizó en los Laboratorios de Biología Celular y Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección del Dr. Salvador Said y Fernández.

AGRADECIMIENTOS

Al *Dr. Salvador Said y Fernández*, por la excelente dirección académica y por el apoyo e interés manifestado a este proyecto de principio a fin. Por la buena disposición que mostró para ayudarme cuando requerí de ello.

A la *Comisión de Tesis, Doctores Herminia G. Martínez Rodríguez, Mario R. Morales Vallarta, Javier Vargas Villarreal y Diego González Ramírez*, por sus acertadas sugerencias, por los consejos dados durante la etapa experimental y también en la revisión de esta Tesis. En especial, a Javier Vargas por haberme mostrado de manera sencilla la iodinación de proteínas y a la *Dra. Herminia Martínez*, porque desde su casa y desde su laboratorio en la ULIEG, tuvo una brillante participación académica en el desarrollo de este trabajo.

A La *Dra. Ma. Julia Verde Star*, de la Subdirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L., por su apoyo en los tiempos críticos.

Al *Dr. Gonzalo Bazán Varela* y a la *Q.F.B. Ma. de Jesús Guerra Rosales*, del Departamento de Medicina Nuclear del Hospital Regional de Especialidades # 25 del IMSS, por la amabilidad que mostraron cada vez que necesitábamos radiomarcarnos proteínas.

A la *Dra. Ma. Teresa González Garza y Barrón*, Jefe del Departamento de Biología Celular y Molecular del CIBIN-IMSS, por las facilidades brindadas para realizar la mayor parte del trabajo experimental en su laboratorio y por el espacio físico que ahí ocupó.

A la *Sra. Ma. del Refugio Mendoza Ríos* y al *Sr. Abel Navarro Patiño*, de la Biblioteca del CIBIN-IMSS, por la eficiente recuperación de material bibliográfico y además por los buenos momentos.

Al *Q.B.P. Guillermo González Quiroga*, del Departamento de Genética del CIBIN-IMSS, por su apreciable ayuda en la etapa de cromatografía.

Al *Dr. Antonio Luna de la Rosa*, por su valioso trabajo de fotografía y revelado de las autorradiografías

Al *Personal Administrativo y de Apoyo del CIBIN-IMSS*, porque con su trabajo contribuyeron indirectamente para con el mío.

A los *Compañeros del CIBIN-IMSS* que hacen gratos los momentos ahí vividos.

Al *Q.F.B. Isaías Balderas Rentería*, por su ayuda en la preparación de material para seminarios y presentaciones; por los dibujos, por las discusiones académicas, y también por los almuerzos.

A los *M. en C. Norma Esther Guerra Rodríguez* y *J. Claudio Moreno Rocha*, de la ULIEG (Fac. Medicina, U.A.N.L.), por toda la ayuda brindada y por su valiosa amistad.

A la *L.I.A. Claudia Gaytán Pedraza*, por haberme prestado su ACER™ cuando la necesité para comenzar a dar orden a la información que dió forma escrita a esta Tesis.

Al *Q.F.B. Antonio Narro Juárez*, por las facilidades brindadas para imprimir éste documento, por su amistad.

A *Ma. del Socorro Miranda Sustaita*, por el apoyo incondicional brindado en todo momento.

A *mis Amigos*: los que creen... y hacen.

A DIOS, porque todavía soy.

DEDICATORIA

Por lo que ha significado, esta Tesis me la dedico a mí...

y para el Amor de mis amores, por supuesto.

***No obstante me atavío de colorido plumaje, como que por mí ha salido el sol.
(Netzahuacoyotl, el Rey Poeta)***

**A Mi Mamá,
a mis Hermanos, todos...
a la memoria de mi Padre.**

INDICE

Página

AGRADECIMIENTOS -----	i
DEDICATORIA -----	ii
INDICE -----	iii
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS UTILIZADOS -----	iv
LISTA DE FIGURAS -----	v
RESUMEN - -----	1
INTRODUCCION -----	3
El riñón: órgano blanco de diversos compuestos -----	3
Características anatómicas y fisiológicas del riñón -----	4
El mercurio como contaminante ambiental y como agente nefrotóxico -----	7
Proteinuria -----	9
ANTECEDENTES DIRECTOS -----	11
Efecto del mercurio sobre la excreción renal de proteínas -----	12
Aspectos generales del transporte en epitelios -----	13
Modelos <i>in vitro</i> para el estudio de nefrotoxicidad -----	16
a) Riñones completos -----	16
b) Rebanadas de riñón -----	17
c) Suspensiones de túbulos -----	17
d) Suspensiones celulares -----	17
e) Cultivos celulares -----	18
f) Células OK -----	18
ORIGINALIDAD -----	20
HIPOTESIS -----	20
OBJETIVOS -----	21

MATERIALES

	Página
1. Origen de los Reactivos -----	22
2. Material Biológico	
Línea celular-----	24
3. Preparación del medio de cultivo y suero-----	25
Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM)-----	25
Preparación y almacenamiento del MEM completo -----	25
Obtención y almacenamiento del suero para cultivo-----	25
Decomplementación y filtración del suero para cultivo-----	25
4. Composición y preparación de las soluciones-----	27
Amortiguador de Dulbecco -----	27
Amortiguador de pH isotónico de Tris 1 X (Salino TD) -----	27
Amortiguador salino de fosfatos (PBS) -----	27
Antibióticos. Mezcla 100 X [Penicilina (200,000 UI) y Estreptomina (0.5 g)]-----	27
Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio] a 2 mg/ml (MTT) -----	28
Coctel de Centelleo para muestras líquidas-----	28
Estándar de Seroalbúmina Bovina de 1 mg/ml -----	28
Isopropanol ácido (HCl 0.04 M en isopropanol) -----	28
Metasulfato de Fenazina a 3.5 mg/ml (PMS) -----	28
Mezcla de aminoácidos-----	29
Ninhidrina -----	29
Rojo de fenol. Solución al 1 % -----	29
Solución Salina Balanceada de Hanks (SSB 1X)-----	29
Tripsina. Concentrado al 2.5% -----	29
Tripsina-TD 0.25% (1X) -----	30

METODOS

Tratamiento del material para cultivo

Lavado del material-----	31
1. Limpieza de la incubadora de CO ₂ -----	31
2. Cultivo de células OK -----	32
3. Resiembra y mantenimiento de las células-----	32
4. Criopreservación de las células-----	33
5. Descongelamiento de las células-----	33
6. Curva de crecimiento de las células OK-----	34

Modelo Experimental

a) Montaje del Modelo-----	35
b) Relación temporal de la formación de monocapas de células OK cultivadas sobre insertos-----	36
c) Marcaje de seroalbúmina con ¹³¹ I-----	38
i) Preparación de los tubos de reacción con iodogen-----	38
ii) Iodinación -----	38

	Página
iii) Determinación de radiactividad en las fracciones colectadas-----	38
iv) Autorradiografía -----	39
v) Cuantificación de proteínas en la muestra iodinada-----	39
vi) Determinación de la Actividad Específica de la [¹³¹ I]-SAB-----	39
d) Transporte de [¹³¹ I]-SAB y [³ H]-inulina en sentidos apical-basolateral y basolateral-apical -----	41
e) Electroforesis en geles de poliacrilamida y cromatografía en papel-----	43
f) Digestión de [¹³¹ I]-SAB con tripsina-----	44
g) Determinación del efecto de dosis variables de mercurio sobre la viabilidad de las células OK-----	44
h) Determinación del efecto del mercurio sobre la resistencia transepitelial de las monocapas de células OK-----	45
i) Determinación del efecto del mercurio sobre el transporte transepitelial-----	46

RESULTADOS

a) Relación temporal del crecimiento <i>in vitro</i> de las células OK-----	47
b) Relación temporal de la formación de monocapas de las células OK cultivadas sobre insertos-----	48
c) Radiomarcaje de seroalbúmina -----	49
d) Difusión de radiactividad asociada a [³ H]-inulina a través del espacio paracelular de monocapas de células OK-----	50
e) Transporte transepitelial del equivalente de seroalbúmina o sus productos de hidrólisis por monocapas de células OK-----	51
f) Direccionalidad del transporte-----	52
g) Radiactividad acumulada por las monocapas-----	53
h) Radiactividad asociada a aminoácidos y péptidos de [¹³¹ I]-SAB hidrolizada durante el transporte transepitelial-----	54
i) Cromatografía de [¹³¹ I]-SAB digerida con tripsina -----	55
j) Efecto del cloruro mercúrico sobre la viabilidad de las células OK-----	56
k) Efecto del cloruro mercúrico sobre la resistencia transepitelial de monocapas de células OK-----	57
l) Efecto del cloruro mercúrico sobre el transporte transepitelial del equivalente de seroalbúmina-----	58

DISCUSION-----	59
CONCLUSIONES-----	66
PERSPECTIVAS-----	68
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS-----	71

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS UTILIZADOS

Amortiguador Salino de Fosfatos	PBS
Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio	MTT
Centímetro cuadrado	cm ²
Cloruro Mercúrico	HgCl ₂
Concentración con respecto a la solución de trabajo	X
Desviación estándar	DE
Dimetilsulfóxido	DMSO
Geis	X g
Grados Centígrados	°C
Gramos	g
Horas	h
Inulina marcada con Tritio	[³ H]-inulina
Kilodaltones	kDa
Litro	l
Medio Esencial Mínimo de Eagle	MEM
Metasulfato de Fenazina	PMS
Microcuries	μCi
Microgramos	μg
Microlitro	μl
Micromolar	μM
Milicuries	mCi
Mililitro	ml
Milimolar	mM
Minutos	min
Milivolts	mV
Molaridad	M
Nanogramos	ng
Nanometro	nm
Nanomoles	nmol
Normalidad	N
Ohms	Ω
Picomoles	pmol
Porcentaje	%
Potencial de Hidrógeno	pH
Revoluciones por minuto	rpm
Resistencia Eléctrica Transepitelial	RTE
Radioinmunoensayo	RIA
Seroalbúmina Bovina marcada con ¹³¹ I	[¹³¹ I]-SAB
Solución Salina Balanceada de Hanks	SSB
Unión Hermética	UH
Concentración con respecto a la solución de trabajo	X

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1 Rutas en el compartimento endosomal de las células epiteliales-----	6
Fig. 2 Funciones de “portón” y “cerca” de las uniones herméticas-----	14
Fig. 3 Modelo Experimental. Diseño a escala del inserto-----	35
Fig. 4 Modelo Experimental. Forma de medir la resistencia eléctrica transepitelial utilizando el ohmetro (Millicell-ERS)-----	37
Fig. 5 Relación temporal del crecimiento <i>in vitro</i> de las células OK-----	47
Fig. 6 Relación temporal de la formación de monocapas de las células OK cultivadas sobre insertos-----	48
Fig. 7 Radiomarcaje de seroalbúmina-----	49
Fig. 8 Difusión de radiactividad asociada a [³ H]-inulina a través del espacio paracelular de monocapas de células OK-----	50
Fig. 9 Transporte transepitelial del equivalente de seroalbúmina o sus productos de hidrólisis por monocapas de células OK-----	51
Fig. 10 Direccionalidad del transporte-----	52
Fig. 11 Radiactividad acumulada por las monocapas-----	53
Fig. 12 Radiactividad asociada a aminoácidos y péptidos de [¹³¹ I]-SAB hidrolizada durante el transporte transepitelial-----	54
Fig. 13 Cromatografía de [¹³¹ I]-SAB digerida con tripsina-----	55
Fig. 14 Efecto del cloruro mercúrico sobre la viabilidad de las células OK-----	56
Fig. 15 Efecto del cloruro mercúrico sobre la resistencia transepitelial de monocapas de células OK-----	57
Fig. 16 Efecto del cloruro mercúrico sobre el transporte transepitelial del equivalente de seroalbúmina-----	58

RESUMEN

Prácticamente en cualquier lugar de nuestro planeta se acumulan diariamente numerosas sustancias nocivas para la vida, conocidas como xenobióticos. Actualmente se considera que hay más de 200, 000 xenobióticos que son producidos por el hombre y que están perjudicando seriamente a la biósfera. Desde el punto de vista médico, los agentes xenobióticos más importantes son diversos medicamentos, aditivos para alimentos, pesticidas y desechos o materias primas industriales. La mayor parte de los xenobióticos producen sus efectos actuando directamente en el organismo, donde causan lesiones a nivel celular o molecular y producen o liberan moléculas características, que pueden ser casi siempre detectadas en los laboratorios. A las moléculas indicativas de problemas causados por xenobióticos se les llama *biomarcadores*. La importancia médica de los biomarcadores consiste en que su detección oportuna en el hombre o en los animales permite pronosticar el grado de riesgo hacia una enfermedad particular en poblaciones expuestas a algún xenobiótico, así como hacer una evaluación de la gravedad de los daños ocasionados por los mismos, o para valorar procedimientos terapéuticos.

El mercurio puede ser considerado un xenobiótico. Este metal se ha utilizado desde la antigüedad con diversos fines. Su nefrotoxicidad está relacionada con su acumulación en las células del glomérulo y de los túbulos contorneados proximales, donde causa severos daños estructurales y funcionales. Entre estos últimos es característica la proteinuria. Dicho signo clínico está muy relacionado con trastornos en la excreción y la reabsorción de proteínas de alto y bajo peso molecular. Además, se le ha asociado con episodios de intoxicación grave en poblaciones humanas numerosas, como el desastre ocurrido en la ciudad de Minamata, en Japón .

Nosotros dirigimos nuestro interés al estudio de los efectos nefrotóxicos del mercurio, como parte de un proyecto encaminado a identificar moléculas que sirvan como biomarcador para detectar disfunción renal antes de que hayan ocurrido daños irreversibles a nivel del túbulo contorneado proximal. Para lograr esto, implementamos en nuestro laboratorio un modelo *in vitro* de transporte de seroalbúmina con células OK, a las cuales intoxicamos por diferentes tiempos con dosis variables de mercurio, y

determinamos los cambios ocurridos con respecto a las células no tratadas. En este modelo las células se cultivan sobre membranas permeables (insertos). Una vez implementado el modelo experimental, determinamos que las células OK formaron monocapas con resistencia transepitelial máxima ($50-53 \Omega/\text{cm}^2$) a los 8 días de cultivo, esta característica eléctrica nos indicó el momento adecuado para efectuar los experimentos de transporte. Respecto a esto, las células transportaron transepitelialmente seroalbúmina bovina, la dirección del transporte fue del lado apical al basolateral y fue directamente proporcional al tiempo de incubación, correspondió a $18 \text{ pmoles}/\text{cm}^2$ a los 90 min de incubación. Los productos transportados al lado basolateral fueron caracterizados posteriormente y se estableció que correspondieron a péptidos y aminoácidos, los cuales provenían de la digestión de la proteína completa. El HgCl_2 tuvo un claro efecto inhibitorio sobre la viabilidad celular, así como sobre la resistencia transepitelial.

Con respecto al efecto del mercurio sobre el transporte de seroalbúmina en cultivos *in vitro* de células provenientes de túbulo contorneado proximal intoxicadas con mercurio, este se inhibe con dosis subletales. Por esta razón, la determinación cuantitativa del transporte transepitelial de albúmina por células OK puede ser útil como una nueva herramienta para pronosticar el potencial efecto nefrotóxico de mercurio y otros xenobióticos y en la búsqueda de biomarcadores de daño renal temprano,

INTRODUCCION

La exposición ocupacional o en el ambiente general a agentes xenobióticos constituye un problema grave de Salud Pública. Sus efectos sobre la salud humana se están estudiando intensamente. El uso de biomarcadores ha mostrado ser muy útil para estos fines y para detectar oportunamente procesos patológicos o valorar procedimientos terapéuticos. Tradicionalmente, el uso de animales de experimentación ha sido indispensable para la detección y validación de biomarcadores, para el estudio de los efectos tóxicos de agentes xenobióticos, de procesos patológicos o para el desarrollo de nuevos medicamentos. Sin embargo, restricciones éticas y limitaciones técnicas han hecho necesario el uso de modelos alternativos de investigación *in vitro*. Las células aisladas de organismos y las líneas celulares en cultivos constituyen una de las mejores alternativas (Said-Fernández *et al*, 1997)

El riñón: órgano blanco de diversos compuestos.

El riñón es un órgano complejo, formado entre otros elementos por componentes tubulares y vasculares. Es susceptible al efecto tóxico de diversos agentes químicos, tales como disolventes orgánicos, metales pesados y medicamentos (Tarloff y Goldstein, 1994). La razón de la susceptibilidad del riñón es que es un órgano altamente dinámico, el flujo sanguíneo renal es muy alto: los dos riñones reciben cerca del 25% del gasto cardíaco. Aproximadamente un tercio del agua del plasma que llega al riñón es filtrada, y de este material, el 98-99% de sales y agua son reabsorbidas. El alto flujo sanguíneo hacia el riñón es el responsable de la liberación de grandes cantidades de cualquier sustancia presente en la sangre. Por esta razón, el riñón puede acumular grandes cantidades de un compuesto químico si este atraviesa con facilidad las diferentes membranas biológicas. Además, la acumulación pasiva de grandes cantidades de compuestos potencialmente nefrotóxicos puede originar elevadas concentraciones intracelulares de éstos, lo cual altera la función renal (Berndt, 1994).

Otros factores fisiológicos son también importantes. Por ejemplo, la capacidad del riñón para producir una orina muy concentrada. Cualquier sustancia presente en el

filtrado glomerular, puede potencialmente aumentar como consecuencia del proceso normal de concentración urinaria, un xenobiótico tan concentrado puede ejercer efectos indeseables sobre las membranas tubulares, lo cual facilita la difusión de tal sustancia hacia la células del epitelio tubular renal. Un tercero, e igualmente importante mecanismo que favorece el desarrollo de nefrotoxicidad, es la capacidad de las células de los túbulos renales para transportar una gran variedad de compuestos del filtrado glomerular hacia las células. Este proceso, junto con el elevado flujo sanguíneo, puede explicar el porqué muchos agentes nefrotóxicos ejercen su efecto inicial en los túbulos proximales, la mayoría del flujo sanguíneo llega a la corteza, donde se localizan prácticamente los segmentos iniciales de los túbulos proximales (Berndt, 1994).

Características anatómicas y fisiológicas del riñón.

La unidad fisiológica y anatómica del riñón es la nefrona, que consiste del glomérulo renal, el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle, el túbulo contorneado distal y el túbulo colector. En forma simplificada se puede decir que el glomérulo es un ovillo formado por un vaso aferente y otro eferente, incluidos en una cápsula. En condiciones normales, la sangre fluye por los vasos aferente y eferente del glomérulo renal. Es en esta porción de la nefrona donde se lleva a cabo la filtración glomerular (Guyton, A. C., 1988).

El túbulo contorneado proximal se encuentra contiguo al glomérulo y recibe el filtrado glomerular, el cual pasa por el asa de Henle. Después de pasar por ahí, el líquido entra en el túbulo contorneado distal. A continuación, entran en coalescencia hasta ocho de los túbulos distales para formar el túbulo colector, cuyo extremo se aparta de la corteza renal y pasa hacia abajo por el espesor de la médula, sitio en el que se convierte en conducto colector. Los conductos colectores se vacían en la pelvicilla renal. Al fluir el filtrado glomerular por los túbulos, cerca de 99% de su agua y cantidades variables de sus solutos se reabsorben normalmente hacia el sistema vascular, y también se secretan

cantidades pequeñas de algunas sustancias hacia los túbulos. El agua tubular restante y las sustancias disueltas en ella se convierten en orina (Guyton, A. C., 1988).

A nivel tubular, la nefrona tiene entre otras, una función secretora. Mediante este mecanismo se transportan en forma activa sustancias que se suman al filtrado que se encuentra en la luz del túbulo. Este proceso de secreción tubular es más notable y eficaz en la región del túbulo contorneado proximal. Los solutos útiles al organismo son reabsorbidos a lo largo de los túbulos contorneados proximal y distal, pero principalmente a nivel del contorneado proximal (Guyton, A. C., 1988).

El filtrado glomerular contiene numerosas y pequeñas proteínas que se reabsorben casi completamente en los túbulos proximales (Carone, F. A *et al*, 1979; Gauthier, C. *et al*, 1984). El contenido de proteína es del rango de mg/l (Rosenberg y Hostetter, 1992; Van Liew *et al*, 1970). La cantidad de proteína filtrada en seres humanos es de varios cientos de mg por día y gran parte de ella es albúmina (Maack *et al*, 1992). La albúmina es responsable en gran parte del mantenimiento de la presión oncótica del plasma y líquido intersticial y sirve como acarreador de moléculas importantes tales como ácidos grasos (Hutter, J. F., *et al*, 1984), testosterona y estradiol (Corvol y Bardin, 1973), hormonas tiroideas y bilirrubina (Brodersen, R., 1978), etc. La albúmina es la principal proteína urinaria de origen plasmático, debido a su tamaño (radio molecular: 3.6 nm) y su carga fuertemente negativa; esta proteína se retiene casi completamente en la barrera glomerular. Las pequeñas cantidades que a pesar de eso escapan al filtro glomerular son reabsorbidas por los túbulos proximales con una eficiencia cercana al 99% (Bernard y Lauwerys, 1991). En el riñón, se evita la pérdida de la albúmina filtrada mediante la reabsorción, vía endocitosis, en el túbulo proximal. La endocitosis de la albúmina ocurre por un proceso selectivo mediado por receptores. Una vez internalizada, las vesículas endocíticas se fusionan con los lisosomas para formar fagolisosomas, donde la albúmina se digiere (Camargo, 1984).

En general, la etapa inicial en la endocitosis adsorptiva en los túbulos contorneados proximales del riñón es la unión de las proteínas a la membrana luminal; las etapas siguientes consisten en la internalización en vacuolas endocíticas y reciclamiento de los receptores hacia la membrana plasmática. Finalmente, las proteínas son transferidas a los lisosomas secundarios para su degradación (*Figura 1*).

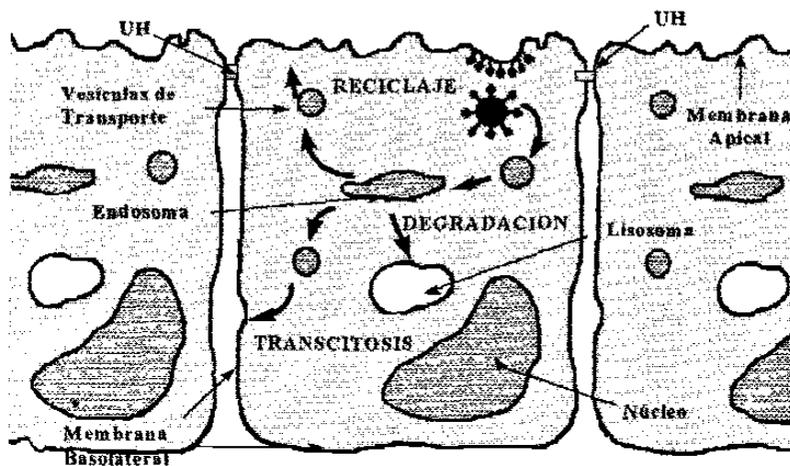


Figura 1. Rutas en el compartimento endosomal de las células epiteliales (UH = Unión hermética).

En condiciones normales solamente una pequeña fracción de proteínas de bajo peso molecular escapa a la reabsorción tubular. Su concentración en la orina es tan pequeña que la sensibilidad de los métodos analíticos no es suficiente para detectarlas o cuantificarlas con precisión (Grossman *et al*, 1974; Koch, 1992).

Otra función importante de los túbulos proximales del riñón es reabsorber y degradar péptidos y proteínas que son filtradas por el glomérulo. Esto se logra mediante los siguientes mecanismos: a) endocitosis en la superficie del lumen de la membrana celular; b) proteólisis intralisosomal y c) transporte de los productos (principalmente aminoácidos libres) a través de la membrana lisosomal (Carone *et al*, 1979; Rabkin *et al*, 1989). Aunque la tasa de moléculas no filtrables de la membrana basal del glomérulo para proteínas es alto en individuos sanos, un daño leve al glomérulo causa escape masivo de albúmina hacia el lumen tubular debido a su elevada concentración en el plasma. Sin embargo, solo se observa albuminuria en estados de daño glomerular evidente. La cantidad de albúmina excretada se eleva casi linealmente con la permeabilidad del glomérulo. Por esta razón, la albúmina ha atraído la atención como un sustrato modelo para estudiar la reabsorción de proteínas por el epitelio de los túbulos renales (Dennis y Robinson, 1985).

El mercurio como contaminante ambiental y como agente nefrotóxico.

Ningún otro metal representa mejor la diversidad de efectos causados por diferentes formas químicas como el mercurio. En base a sus características toxicológicas, existen tres formas: elemental, inorgánico y orgánico. La fuente principal de mercurio es la evaporación natural de la corteza terrestre, incluyendo las áreas terrestres, ríos y océanos. Se ha estimado en el orden de 25,000 a 150,000 toneladas por año (WHO, 1976; Goldwater y Stopford, 1977; NRCC, 1979). El mercurio metálico en la atmósfera representa la ruta principal de transporte global de mercurio. Aunque las fuentes antropogénicas de mercurio han alcanzado 8,000 a 10,000 toneladas por año desde 1973, las fuentes no antropogénicas son los factores predominantes. Sin embargo, la minería, fundición y descarga industrial fueron los factores responsables de la contaminación ambiental en el pasado. Los usos industriales más comunes son: en las plantas productoras de cloro-álcalis, en la industria del papel, en la industria de los combustibles (productos del petróleo y gas natural). Otros usos incluyen la preparación de amalgamas dentales, en la industria de lámparas de mercurio, fabricación de termómetros, de

fungicidas y de baterías, por mencionar algunos. Un tercio del mercurio atmosférico puede ser debido a la liberación industrial de formas orgánicas o inorgánicas. Independientemente de la fuente, tanto las formas orgánicas como inorgánicas pueden sufrir transformación ambiental. El mercurio metálico puede ser oxidado a mercurio inorgánico divalente, principalmente en presencia de material orgánico, tal como el que se halla en el medio acuático. El mercurio inorgánico divalente puede, a su vez, ser reducido a mercurio metálico bajo condiciones que favorecen este tipo de reacciones. Otro tipo importante de conversión es la transformación del mercurio divalente a dimetil mercurio por bacterias anaeróbicas; este puede difundirse hacia la atmósfera y regresar a la corteza de la tierra o cuerpos de agua como metilmercurio en el agua de lluvia. Si este es tomado por peces de la cadena alimenticia, puede reciclarse al ser humano (Goyer, R. A., 1986).

El mercurio metálico tiene una alta presión de vapor, y por lo tanto se mezcla a temperatura ambiente rápida y eficazmente con los componentes del aire, de donde es absorbido por los seres vivos (Aposhian *et al*, 1995). El metilmercurio se absorbe fácilmente por el organismo. Ambas formas del metal se acumulan en diversos órganos, pero preferentemente en el riñón donde puede producir toxicidad renal (WHO, 1991). Se ha sugerido que ésta se debe a una vasoconstricción y a un daño celular directo. El sitio más susceptible al efecto tóxico del mercurio en la nefrona es la *pars recta* del túbulo contorneado proximal; pero si se usan dosis de mercurio mayores que las que afectan a las *pars recta* resultará afectada toda la parte proximal de la nefrona (Hook y Hewitt, 1986). Estas lesiones se manifiestan por proteinuria (microalbuminuria y excreción por orina de proteínas de bajo peso molecular).

Proteinuria.

El mercurio y otros metales pesados como el cadmio y el plomo producen daño renal y uno de los signos indicadores es la proteinuria (Piscator, 1989). La proteinuria puede deberse las siguientes causas: a) que ha disminuído la capacidad de las células de los túbulos proximal y distal para recuperar proteínas, principalmente de bajo peso molecular que son liberadas a nivel del glomérulo, b) que la membrana plasmática de las células de la nefrona ha sido lesionada y libera proteínas, c) a la presencia de proteínas de alto peso molecular, como la albúmina; d) a daño de la membrana basal del glomérulo, e) o a una combinación de las causas mencionadas (Herrera, G., 1994). Otros signos y síntomas que son producidos por la mayoría de los metales pesados, a dosis relativamente bajas, son aminoaciduria, glucosuria y poliuria. Si se incrementa la dosis del metal se incrementa el nitrógeno de la urea, también se observa anuria, necrosis renal y puede ocurrir la muerte (Goyer, R. A., 1986).

En sujetos sanos y jóvenes, las proteínas del plasma contribuyen con un 10-20% de la proteinuria. Los principales componentes de la proteinuria normal son la glicoproteína de Tamm-Horsfall y proteínas que provienen de la descamación del epitelio que recubre al tracto urogenital. Cuando existe daño o enfermedad renal, el aumento de las proteínas plasmáticas se incrementa considerablemente y en el caso del síndrome nefrótico, excede del 90% con respecto a la concentración basal. Si se omiten las enfermedades malignas, la proteinuria patológica resulta principalmente del aumento en el escape de las proteínas plasmáticas en la orina (Bernard y Lauwerys, 1991).

Una albuminuria elevada puede reflejar un aumento en la liberación de proteínas a nivel glomerular o un defecto en la reabsorción tubular de la albúmina filtrada. Cuando la albuminuria es masiva (proteinuria mayor de 3.5 g/día) y está asociada con edema (síndrome nefrótico) se debe a una salida excesivamente elevada de albúmina a nivel glomerular. Si la albuminuria es menos importante, pero clínicamente significativa (> 0.5 g/día) lo más probable es que sea debida a un aumento en la filtración glomerular.

En estas circunstancias, el incremento relativo en la excreción urinaria es mayor de lo esperado cuando existe falla completa en la reabsorción tubular (Mogensen y Solling, 1977).

Cuando la albuminuria es menor de 0.5 g/día, ésta se denomina microalbuminuria o paucialbuminuria, y se le asocia con frecuencia a formas crónicas de nefropatías desarrolladas como consecuencia de una intoxicación (Trivin y Giraudet, 1988). Cuando la microalbuminuria se acompaña de un aumento en la excreción urinaria de proteínas de bajo peso molecular, el problema se debe parcial o totalmente a una mala reabsorción tubular (Peterson *et al*, 1969). Si la microalbuminuria no se acompaña de proteínas de bajo peso molecular, puede ser debida a una elevada permeabilidad del glomérulo (Bernard *et al*, 1987; Bernard *et al*, 1988).

Antecedentes Directos

La toxicidad renal del mercurio se relaciona con su acumulación en los túbulos proximales y su unión intracelular a grupos funcionales tales como sulfhidrilo, carboxilo y fosforilo. Los resultados de estas interacciones son la inactivación de enzimas e inhibición de síntesis de proteínas (Bohets *et al*, 1995). Las formas alquiladas del mercurio, que pueden formarse a partir del mercurio metálico o de los iones mercurio, son las responsables de la intoxicación por este metal. Aunque éste hecho ha sido estudiado en seres humanos y animales, se sabe poco acerca de la naturaleza de éste evento a nivel celular, excepto que ocurre una alta incidencia de aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos de humanos con una alta concentración tisular del metal. También se ha observado inhibición de la multiplicación celular, muerte celular, disminución en la incorporación de uridina y timidina y rompimiento de cadenas sencillas de DNA cuando se exponen cultivos de células L5178Y a dosis variables (1-5 μM) de cloruro de metilmercurio y cloruro mercúrico (Nakazawa *et al*, 1975).

El cloruro mercúrico, es conocido por su toxicidad aguda. Una sola dosis oral de un gramo puede ocasionar fallo renal en adultos, usualmente con pronóstico de muerte. La exposición de ratas por varias semanas a dosis de 20-25 $\mu g/100$ g de peso, de cloruro mercúrico administradas por vía parenteral produjo proteinuria (Druet *et al*, 1982).

Las propiedades nefrotóxicas del mercurio inorgánico y metilmercurio, son muy diferentes *in vivo*. El mercurio inorgánico causa nefropatía severa después de una sola exposición y se caracteriza por pérdida de la función y viabilidad celulares (Ganote *et al*, 1975); mientras que se requiere de exposiciones repetidas de metilmercurio para que sean perceptibles signos moderados de disfunción renal y daño a los túbulos proximales (Fowler, 1972; Klein *et al*, 1973; Ware *et al*, 1975; Stroo y Hook, 1977). Una dosis equimolar de mercurio inorgánico se acumula en mayor cantidad que el metilmercurio en el riñón después de 24 horas de su administración (Magos y Webb, 1977). El mercurio

inorgánico se localiza principalmente en las células de los túbulos proximales (Hultman y Enestrom, 1986; Rodier *et al*, 1988; Zalups y Barfuss, 1990).

Efecto del mercurio sobre la excreción renal de proteínas.

El mercurio produce daños renales agudos o crónicos en humanos y animales. En el riñón, los efectos del mercurio inorgánico varían desde proteinuria tubular ligera hasta necrosis tubular, dependiendo de la dosis. La exposición crónica a este metal puede resultar en el desarrollo de una alteración que afecta principalmente al glomérulo, lo que en casos severos dá lugar a glomerulonefritis o síndrome nefrótico. Se ha reportado aumento en la excreción de proteínas urinarias en trabajadores expuestos a vapores de mercurio, la proteinuria generalmente es de tipo glomerular y se asocia con una excreción mayor de 50 µg Hg/g de creatinina, pero puede ser reversible (Iesato *et al* 1977; Stewart *et al*, 1977).

Ellis y colaboradores (1973) administraron diferentes dosis de cloruro mercúrico en perros y posteriormente efectuaron mediciones de la nefrotoxicidad funcional e histológica. Estos investigadores midieron los niveles séricos de nitrógeno de la urea, excreción de proteínas, depuración y velocidad de transporte de ácido *p*-aminohipúrico. También analizaron la actividad de enzimas urinarias, tales como fosfatasa alcalina, N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) y glucosidasa. Todas estaban uniformemente aumentadas en estos animales. Estos mismos investigadores confirmaron sus hallazgos en diferentes animales de laboratorio (Ellis y Price, 1975). Otros investigadores encontraron que los niveles de excreción de NAG estaban aumentados en relación directa con la concentración de mercurio en orina, pero no con los niveles sanguíneos del mismo (Joselow y Goldwater, 1967).

Los trabajadores expuestos a una mezcla de vapores de mercurio presentes en el aire y aerosoles de compuestos inorgánicos manifestaron proteinuria que fué lo

suficientemente severa para producir síndrome nefrótico (Kazantzis *et al*, 1962). Buchet y colaboradores (1980) encontraron proteinuria en un grupo de trabajadores expuestos a vapor de mercurio. Los valores de mercurio urinario fueron considerablemente menores que los reportados por Kazantzis y el grado de proteinuria fue menor. La frecuencia en la excreción anormal de albúmina urinaria aumentó en función de la excreción del mercurio en orina por encima del valor umbral estimado que era de 50 μg de Hg /g de creatinina. Este es uno de los valores más bajos de umbral renal para albuminuria.

Otros investigadores reportaron una forma leve de daño renal en niños que habían absorbido fenilmercurio a través de sus pañales. En estos casos los efectos se manifestaron por un aumento en la excreción urinaria de γ -glutamyltranspeptidasa. La severidad de la enzimuria estaba relacionada con la concentración de mercurio en la orina (Gotelli *et al*, 1985).

Aspectos generales del transporte en epitelios.

Las uniones herméticas (UH) son una de las principales características de los epitelios cuyas funciones son la absorción y la secreción. Las UH constituyen una barrera de permeabilidad transepitelial que controla la difusión de iones y moléculas neutras a través de la ruta paracelular, es decir, la ruta de transporte a través de ese espacio. Esta función recuerda a las de un "portón" y una "cerca" (*Figura 2*). La función de portón permite el paso unidireccional solamente de ciertas sustancias y participa en la organización de la ruta transcelular, la ruta de transporte a través de las células. Esto es debido a que participan en la polarización de la membrana plasmática de los epitelios para delimitar los dominios apical y basolateral, los cuales son distintos considerando su composición química, arquitectura y funciones fisiológicas. La distribución polarizada de los canales iónicos, bombas y enzimas en dichos dominios es responsable de la unidireccionalidad del transporte transepitelial. Debido a que las UH constituyen el límite entre estos dominios membranales, también se considera que estas estructuras funcionan como una "cerca" en la membrana plasmática.

La forma más sencilla y sensible de medir su función es la resistencia eléctrica transepitelial. Las UH representan obstáculos para la difusión de pequeñas moléculas polares, también evitan la difusión de macromoléculas a través de los espacios paracelulares que cruzan la monocapa celular, aún a valores relativamente bajos de resistencia transepitelial (Gumbiner, 1987).

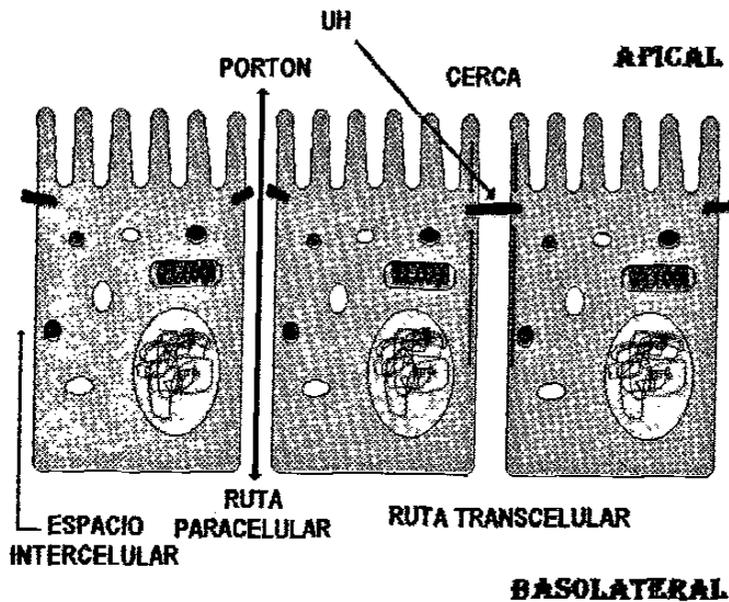


Figura 2. Funciones de “portón” y “cerca” de las uniones herméticas (UH). El portón controla la difusión de solutos a través de la ruta paracelular. La cerca mantiene la distribución polar de las proteínas de la membrana plasmática en los dominios apical y basolateral (Diamond, 1977).

La permeabilidad de las membranas celulares a diferentes sustancias varía ampliamente. Los gases se mueven a través de la membrana con mucha facilidad y las moléculas pequeñas pasan a través de ellas más fácilmente que las moléculas más grandes, aun cuando posean propiedades químicas semejantes. Usualmente la mayor solubilidad de una sustancia en los lípidos significa mayor permeabilidad de ella a través de las membranas; mientras que las células son con frecuencia menos permeables a los electrolitos que a los no electrolitos. Las sustancias pueden difundir a través de las membranas en forma pasiva (transporte pasivo) o pueden requerir el consumo de energía para llevar a cabo este movimiento (transporte activo). La selectividad de las membranas evita la difusión por transporte activo de sustancias al azar y permite a las células controlar el medio ambiente interno, proporcionando distintos microambientes dentro de los organelos subcelulares (Hall y Baker, 1982).

En la difusión simple (transporte pasivo), cuando dos compartimientos acuosos que contienen concentraciones diferentes de un compuesto soluble o ion, son separados por una barrera permeable, el soluto se mueve por difusión simple de la región de mayor concentración, a través de la barrera, a la región de concentración más baja, hasta que los dos compartimientos tengan igual concentración de solutos.

En la difusión facilitada, el paso transmembranal de compuestos polares y iones es posible debido a la función de proteínas acarreadoras. Esta cinética es parecida a la cinética enzimática, solo que los solutos no son modificados químicamente. En el transporte pasivo las especies transportadas se mueven siempre a favor de un gradiente de concentración y no ocurre acumulación neta de los solutos. El transporte activo resulta en la acumulación de un soluto en un lado de la membrana, ocurre en contra del gradiente de concentración y requiere de energía, usualmente ATP o GTP (Lehninger *et al*, 1993).

Modelos in vitro para el estudio de nefrotoxicidad.

En los últimos años, los modelos *in vitro* han cobrado una extraordinaria importancia y la tendencia de su uso es ascendente. La razón es que estos modelos forman parte importante del conjunto de métodos alternativos al uso de animales de laboratorio para estudiar el efecto de agentes xenobióticos y para el desarrollo de biomarcadores y medicamentos que se llevan a cabo actualmente (Said-Fernández *et al*, 1997). En el mundo existe una fuerte presión para que se usen lo menos posible, animales de laboratorio para investigación por razones éticas, técnicas y económicas (Adolphe, 1995). Los modelos *in vitro* son particularmente útiles para analizar con detalle las relaciones de las vías metabólicas y las características farmacodinámicas de xenobióticos y medicamentos en desarrollo (Chiu, 1993).

Para estudiar los efectos de los agentes nefrotóxicos, se han usado animales y órganos aislados, sin embargo, debido a la complejidad anatómica y fisiológica de estos modelos, es difícil analizar el mecanismo citopatogénico de los agentes nefrotóxicos a nivel celular o molecular. Por ello, en los últimos años se ha recurrido para este propósito a rebanadas de riñón, túbulos contorneados aislados y monocapas de células de riñón de diversas especies de mamífero cultivadas *in vitro* (Tarloff y Goldstein, 1994).

(a) Riñones completos

El riñón aislado y perfundido puede utilizarse para evaluar *ex vivo* o *in vitro* el efecto de agentes nefrotóxicos (Bekersky, 1983). Generalmente se usan órganos de rata o conejo. Una vez aislados, los riñones se limpian de grasa y se perfunden en una cámara dotada de un sistema de recirculación a velocidad y presión constantes, para ello se utiliza una solución rica en nutrientes y sales minerales.

(b) Rebanadas de riñón

El modelo con rebanadas de la corteza renal se desarrolló inicialmente para estudiar el transporte de aniones, el más importante ha sido el *p*-aminohipurato (PAH) y cationes orgánicos tales como el tetraetilamonio (Kuo y Hook, 1982). Los primeros estudios indicaron una buena correlación entre la secreción *in vivo* y la acumulación de los iones orgánicos en el tejido renal.

(c) Suspensiones de túbulos

Generalmente los túbulos se obtienen de riñón de conejo, aunque también se aíslan de los de ratas y ratones (Sina *et al*, 1986; Porter y Dawson, 1979). Los riñones se canalizan *in situ* y luego se perfunden con un medio que contiene glucosa, aminoácidos, cianocobalamina y albúmina para remover la sangre. Se repite la operación agregando colagenasa a la solución de perfusión, se remueven los riñones y el tejido se dispersa manualmente. Se separan los túbulos de los restos celulares mediante filtración a través de gasa o centrifugación en gradientes discontinuos de Percoll o Ficoll y se pasan a través de tamices de alambre, donde finalmente los glomérulos son removidos (Rush y Ponsler, 1991). Estas suspensiones se utilizan para investigar la respuesta bioquímica de las células epiteliales del riñón a agentes tóxicos (Lau *et al*, 1984; Monks *et al*, 1985). También se utilizan para estudiar el metabolismo y mecanismos de transporte del riñón normal (Kinne, 1983).

(d) Suspensiones celulares.

El proceso de obtención de este material biológico es similar al de las suspensiones de túbulos. La diferencia principal consiste en que el tiempo de perfusión para obtener células en suspensión en presencia de colagenasa es de 15 a 30 min; mientras que para obtener túbulos, los riñones se perfunden por sólo 5 a 10 min.

En términos generales, estas preparaciones ofrecen las mismas ventajas que las suspensiones de túbulos como modelo de estudio. Sin embargo, con este procedimiento pueden obtenerse células provenientes específicamente del túbulo proximal o del distal (Vinay *et al*, 1981).

(e) Cultivos celulares.

Para estudios toxicológicos se utilizan tanto cultivos *in vitro* de líneas celulares como de cultivos primarios (Bruggeman *et al*, 1989; Malström *et al*, 1987). Las líneas más utilizadas son las de células LLC-PK₁, OK y MDCK. Los cultivos celulares *in vitro* se utilizan ampliamente debido a que los otros modelos tienen un tiempo de vida limitado, mientras que las líneas celulares establecidas pueden subcultivarse indefinidamente. Los cultivos celulares primarios se cultivan un número limitado de veces, pero pueden utilizarse con fines experimentales antes de que las células se diferencien y pierdan funciones específicas (Boogaard *et al*, 1990). Las técnicas para el cultivo de células están bien establecidas. Se cultivan en cajas o botellas, de vidrio o poliestireno, con medios de composición definidas y se controlan la tensión de CO₂, humedad y temperatura (Tarloff y Goldstein, 1994).

Células OK

La línea celular OK (Opossum Kidney) fue establecida a partir del riñón de la zarigüeya americana (*Didelphys virginiana*; Koyama *et al*, 1978), sirve como un sistema modelo de túbulos proximales debido a la considerable similitud de sus procesos de transporte de solutos, como ocurre *in vivo* (Malström *et al*, 1987). Estas células poseen propiedades altamente diferenciadas tales como una cadena hormonal completa de señales de transducción para la inhibición de la toma de fosfato por la hormona paratiroidea (Malström *et al*, 1988). Los cultivos de células de epitelio renal desarrollan una organización polarizada, crecen formando monocapas confluentes y forman domos

sobre soportes permeables. La última característica indica transporte transepitelial de solutos (Handler,1986). Otras características que presentan son el transporte de hexosas, aminoácidos, fosfato inorgánico y receptores para la hormona paratiroidea (Tertelbaum y Strewler, 1984). También permiten un intercambio reducido de iones Na^+ e H^+ y transporte de fosfato acoplado a sodio (Malström y Murrer, 1986). Las monocapas que forman muestran una resistencia transepitelial de $63 \pm 15 \Omega/\text{cm}^2$ (Hori *et al.*, 1993), aunque Schwegler la encuentra de $41 \Omega/\text{cm}^2$ (Schwegler *et al.*, 1989). En cultivo, el lado apical queda expuesto al medio de cultivo y es equivalente al lado luminal del epitelio tubular *in vivo*, y al mismo tiempo queda accesible a sustratos marcados, mientras que la membrana basolateral se orienta hacia el material de soporte.

Originalidad

Las personas expuestas ocupacionalmente a mercurio, que muestran síntomas leves de intoxicación, no presentan proteinuria cuando se utilizan métodos convencionales. Esto puede deberse a que, a pesar de que el riñón esté siendo afectado, los métodos empleados no tienen la suficiente sensibilidad para detectar concentraciones muy pequeñas de proteínas. Por lo anterior, nos propusimos identificar una proteína que sirviera como marcador temprano de intoxicación renal por mercurio. Para esto implementamos un modelo celular, el cual resultó mucho más sensible que los métodos utilizados actualmente.

Hipótesis

En epitelios cultivados *in vitro* de células OK el transporte transepitelial de seroalbúmina es sensible a dosis subletales de HgCl_2 .

OBJETIVOS

- 1) Establecer la relación temporal de formación de monocapas de las células OK cultivadas sobre insertos Millicell-HA (*Millipore*).
- 2) Definir el transporte transepitelial de seroalbúmina bovina fracción V, en sentido apical-basolateral y basolateral-apical por monocapas de células OK.
- 3) Determinar el porcentaje de lisis inducida por mercurio, utilizando como indicador la capacidad de reducir el MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio).
- 4) Analizar el efecto del mercurio sobre la resistencia transepitelial de las monocapas.
- 5) Analizar el efecto del mercurio sobre el transporte transepitelial de seroalbúmina bovina en epitelios de células OK.

MATERIALES

A. Origen de los reactivos.

De Amersham (K. R. Amtmann, México, D.F.): [³H]-Inulina.

De Difco Laboratories (Detroit, Michigan, USA): Tripsina.

De GIBCO BRL Laboratories (Grand Island, N.Y., USA): Medio Esencial Mínimo de Eagle.

De J.T. Baker (México): Alcohol etílico absoluto y Bicarbonato de sodio.

De Lakeside S.A. (México): Penicilina y Sulfato de estreptomicina.

De Mallinckrodt Chemical Works (New York, USA): Cloruro Mercúrico.

De Merck (Alemania): Rojo de fenol, POPOP [2,2'-p-Fenilen-bis (5-feniloxazol)], Cloruro de sodio, Sulfato de magnesio, Butanol, Acido acético, Ninhidrina y Piridina.

De Pharmacia Fine Chemicals AB (Uppsala, Sweden) Sephadex G-25.

De Pierce Chemical Co. (Rockford, Il. USA). Seroalbúmina bovina (fracción V) grado RIA.

De Reactivos Monterrey (México): Hidróxido de sodio, Hidróxido de potasio, Fosfato monobásico de potasio, Fosfato dibásico de potasio, Acido clorhídrico, Cloruro de calcio, Cloroformo y Tolueno.

De Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, USA): Acido ascórbico, Dodecil sulfato de sodio, Glucosa, Trizma base, MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), PMS (Metasulfato de Fenazina), Aminoácidos, 2-mercaptoetanol,

Iodogen (1,3,4,6-tetracloro-3a,6a-diphenylglicoluryl), Tritón X-100, PPO (2,5, Difeniloxazol), Marcadores de peso molecular, Acrilamida, Bis-acrilamida, Lauril-sulfato, Persulfato de amonio, azul de bromofenol, TEMED (N'N'N'N'-Tetrametiletilendiamina), Amortiguador de muestra, Amortiguador concentrador y Amortiguador separador.

De Técnica Química (México): Cloruro de potasio.

B. Material Biológico.

Línea celular

Utilizamos la línea de células OK (Opossum Kidney), de American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA). Estas células se aislaron a partir de túbulos contorneados proximales de zarigüeya americana (*Didelphys virginiana*) y en cultivo forman epitelios que conservan las uniones intercelulares, polaridad y la habilidad de transportar en sentido apical-basolateral diversas moléculas, como sucede en los túbulos contorneados proximales. Fueron cultivadas en medio esencial mínimo de Eagle (Gibco BRL, Life Technologies, Inc. Grand Island N.Y.), adicionado con 10% de suero fetal de bovino, a 36 °C, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂.

C. Preparación del medio de cultivo y del suero para cultivo.

Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM).

Medio basal. El contenido de un sobre con 9.6 g (*Gibco BRL, Life Technologies, Inc. Grand Island N.Y.*) se disuelve en 800 ml de agua desionizada y posteriormente se añaden 2.2 g de NaHCO_3 . Se ajusta el pH a 6.8 con HCl 1 *N* y se agregan 10 ml de una mezcla de penicilina-estreptomicina 100 *X*. Se afora el volumen a 1000 ml y se esteriliza por filtración a través de membranas de nitrocelulosa con diámetro de poro de 0.22 μm (*Millipore Corporation, Bedford, MA., USA*). Se divide en fracciones de 85 ml en botellas de vidrio estériles, con tapón de rosca. Se colocan los frascos a 37 °C por 48 h en prueba de esterilidad. El almacenamiento se hace a 4 °C hasta su uso.

Preparación y almacenamiento de MEM completo.

Antes de usar, el MEM basal se adiciona en condiciones de esterilidad, con 15 ml de suero fetal de bovino, estéril, descomplementado. Se colocan los frascos a 37 °C por 48 h en prueba de esterilidad y posteriormente se almacenan a 4 °C, listos para usarse.

Obtención y almacenamiento del suero fetal o de ternera de bovino.

El suero se obtiene a partir de sangre que se colecta en el Rastro Municipal. Se incuba la sangre por 5 h a 36°C en probetas de plástico de 2 l. Después se separa el coágulo de las paredes de la probeta con una varilla de vidrio. Se deja a 4°C toda la noche. Se centrifuga la sangre a 1000 xg por 30 min y se colecta el suero por aspiración con vacío. Se vuelve a centrifugar de la forma anterior por tres veces más, hasta clarificar el suero. Se almacena a -20 °C en botellas de 500 ml.

Descomplementación y filtración del suero para cultivo.

Se sumerge el frasco con suero (congelado a -20 °C) en baño maría a 36 °C hasta descongelarlo y se descomplementa a 56 °C por 30 minutos. Se prefiltra a través de membranas de 30 μm y posteriormente se filtra a través de una serie de membranas de 10, 8, 5, 3, 1, 0.8, 0.4 y 0.22 μm , utilizando presión positiva de nitrógeno. Después de esto, el

suero se esteriliza en condiciones asépticas filtrándolo a través de membranas Millipore con poros de 0.22 μm . El suero se distribuye en alícuotas de 100 ml en botellas de vidrio estériles, con tapón de rosca. Se incuban los frascos con suero por lo menos 48 h a 36 °C para comprobar su esterilidad. Se almacenan a -20 °C hasta su uso.

D. Composición y preparación de las soluciones.

La concentración de las soluciones madre se indica con un número seguido de una X, esto representa su concentración respecto a la solución de trabajo (solución 1X).

Amortiguador de Dulbecco. (NaCl 137 mM; KCl 3 mM; Na₂HPO₄ 8 mM; KH₂PO₄ 1.5 mM; CaCl₂ 1.0 mM; MgCl₂ 0.5 mM; Glucosa 5 mM).

Se pesan 8 g de NaCl, 0.22 g de KCl, 1.13 g de Na₂HPO₄, 0.20 g de KH₂PO₄, 0.11 g de CaCl₂, 0.101 g de MgCl₂ y 0.9 g de Glucosa y se disuelven en 900 ml de agua desionizada, se ajusta el pH a 7.4 con NaOH 1 N y se afora a 1000 ml. Se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 min y se almacena a -20 °C.

Amortiguador de pH isotónico de Tris 1 X (Salino TD).

Se pesan 8.0 g de NaCl, 3.75 g de KCl, 0.1 g de Na₂HPO₄ y 3.0 g de Trizma base. Se disuelven los componentes en 800 ml de agua desionizada. Se agregan 15 ml de HCl 1 N y se deja en agitación hasta que la solución adquiera la temperatura ambiente (aproximadamente 15 min). Se ajusta el pH a 7.4 con HCl 1 N y se afora a 1000 ml con agua desionizada. Se distribuye en frascos de vidrio, cada uno con 50 ml y se esterilizan en autoclave por 15 min a 121 °C. Se almacena a temperatura ambiente.

Amortiguador salino de fosfatos (PBS).

Se pesan 6.5 g de NaCl, 2.8 g de K₂HPO₄ y 0.4 g de KH₂PO₄. Se disuelven estos componentes en 800 ml de agua desionizada, se ajusta el pH a 7.4 con NaOH 10 N y se afora a 1000 ml. Se distribuye en frascos de vidrio de 100 ml y se esteriliza en autoclave por 15 min a 121 °C. Se almacena a temperatura ambiente.

Antibióticos. Mezcla 100 X [Penicilina (200,000 UI) y Estreptomicina (0.5 g)].

La mezcla se prepara a partir de frascos de Penicilina G-sódica cristalina (Lakeside) de 1x10⁶ unidades y sulfato de estreptomicina (Lakeside) de 1 g. Se disuelven los componentes en forma individual en 2 ml de agua desionizada. Se toman 0.4 ml del

frasco de penicilina y se mezclan con 1 ml de la solución de estreptomycin. Esta mezcla se afora a 100 ml con agua desionizada y se esteriliza por filtración. Se almacena en fracciones de 10 ml en tubos estériles con tapón de rosca a -20 °C.

Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio] a 2 mg/ml (MTT).

Se pesan 0.02 g de MTT y se disuelven en 10 ml de SSB. Se esteriliza por filtración con filtros de 0.22 µm y se coloca en un tubo de vidrio estéril. Se almacena a -20 °C, cubierto con papel de aluminio para protegerlo de la oxidación catalizada por la luz.

Coctel de Centelleo para muestras líquidas.

Se pesan 6 g de PPO y 0.6 g de POPOP, se disuelven en 1 litro de tolueno y se añaden 500 ml de Tritón X-100, se mezclan los reactivos utilizando un agitador magnético y posteriormente se filtra la solución en papel Whatman #1. Se almacena en frascos de color ámbar a temperatura ambiente.

Estándar de Seroalbúmina Bovina de 1 mg/ml.

Se pesan 0.01 g de seroalbúmina bovina grado RIA y se disuelven en 10 ml de agua Milli-Q. Se alicuota en fracciones de 1 ml en tubos eppendorf y se almacena a -70 °C.

Isopropanol ácido (HCl 0.04 M en isopropanol).

Se mezclan 160 µl de HCl 12.5 M con 49.84 ml de isopropanol. Se almacena a temperatura ambiente.

Metasulfato de Fenazina a 3.5 mg/ml (PMS).

Se pesan 0.035 g y se disuelven en 10 ml de agua desionizada. Se esteriliza por filtración con filtros de 0.22 µm y se coloca en un tubo de vidrio estéril. Se almacena a -20 °C, cubierto con papel de aluminio para protegerlo de la oxidación catalizada por la luz.

Mezcla de aminoácidos. Se preparan soluciones de 1 mg/ml de cada aminoácido (cisteína, glutamina, alanina, tirosina, lisina, serina, prolina, valina, ácido aspártico,

histidina, glicina, metionina, fenilalanina, arginina, ácido glutámico, leucina, triptofano, isoleucina, treonina y asparagina), de cada una de ellas se toman 50 μ l (50 μ g) y se mezclan en un tubo común. Se almacenan a -20 °C.

Ninhidrina.

Se pesan 2 g de ninhidrina y se disuelven en 10 ml de piridina, se afora a 1000 ml con etanol al 96%. Se almacena en frasco oscuro a 4 °C.

Rojo de fenol. Solución al 1 %.

Se pesa 1 g de rojo de fenol y se disuelve en 6 ml de NaOH 1 N, se afora a 100 ml con agua desionizada. Se filtra a través de papel Whatman # 1 y después se esteriliza por filtración con membranas Millipore de 0.22 μ m. Se almacena a -20 °C.

Solución Salina Balanceada de Hanks (SSB IX).

Se pesan 0.07 g de CaCl₂, 1.0 g de Glucosa, 7.2 g de NaCl, 0.4 g de KCl , 0.2 g de MgSO₄ y 0.12 g de Trizma base. Se disuelven los componentes en 800 ml de agua desionizada y se ajusta el pH a 7.0 con HCl 5 N. Se afora a 1000 ml. Posteriormente se ajusta la osmolaridad a 300 \pm 10 mOsm con NaCl. Se esteriliza por filtración y se distribuye en fracciones de 100 ml en frascos de vidrio, estériles con tapón de rosca. Se almacena a -20°C.

Tripsina. Concentrado al 2.5%.

Se pesan 2.5 g de tripsina 1:250 (*Difco*) y se disuelven en 100 ml de agua desionizada fría. Se deja a 4 °C en agitación lenta toda la noche, luego se filtra a través de papel Whatman # 1 utilizando un embudo Büchner y después se esteriliza por filtración a través de membranas Millipore de 0.22 μ m. Se divide en fracciones de 10 ml y se almacena a -20 °C.

Tripsina-TD 0.25% (1X).

En condiciones asépticas se mezclan las siguientes soluciones (previamente esterilizadas), en frascos con 50 ml de Salino TD 1X estéril: 5 ml de la solución de tripsina al 2.5%, 0.3 ml de rojo de fenol al 1%, y 0.5 ml de la solución de penicilina-estreptomina (100 X). Se distribuye en alícuotas de 10 ml en tubos de vidrio con tapón de rosca, estériles. Se toman al menos tres tubos, al azar, del lote recién preparado y se incuban a 36 °C por 48 h para comprobar su esterilidad. Se almacena a -20°C.

METODOS

A) Tratamiento del material para cultivo

Lavado del material

El material de vidrio para cultivo se remoja por lo menos 24 h en Cloralex^{MR} (Productos Allen, México) al 1% en agua de la llave, se talla con escobillón y se enjuaga 4 veces con agua de la llave. Se pasa a ácido clorhídrico diluido al 1% con agua de la llave y se limpia con escobillón. Se enjuaga vigorosamente con agua de la llave y después se enjuaga tres veces con agua destilada. Se coloca el material boca abajo en canastillas metálicas. Se seca en horno a 200 °C.

Las pipetas serológicas cortas (Bellco Glass Inc. N.J., USA) y las pipetas Pasteur se remojan en PCC-54^{MR} (Pierce, Rockford, Ill, USA) al 1% en pipeteros de polipropileno (Nalgene Labware Division, N.Y., USA) al menos por 12 h y después se enjuagan con agua de la llave en un sifón para lavar pipetas (Nalgene Labware Division, N.Y., USA) por 2 h. Posteriormente se enjuagan dos veces con agua destilada y se secan en horno a 200°C.

Los bulbos usados se colocan en frascos de vidrio con boca ancha y tapón de rosca. Se esterilizan en autoclave por 15 minutos a 121 °C. Los bulbos contaminados con material biológico y los tapones de los recipientes de cultivo se remojan en cloruro de benzalconio (Dermo-Qrit^{MR} Dermo Mex, México) al 1% por 24 h y se enjuagan vigorosamente con agua de la llave, después con agua destilada. Se dejan escurrir boca abajo a temperatura ambiente, hasta que se sequen.

Limpieza de la incubadora de CO₂

Se colocan los cultivos en un lugar seguro y sin corrientes de aire. Se lavan las charolas y el interior de la incubadora con SDS al 1% y se enjuagan con agua destilada estéril para eliminar el detergente, después se limpian con etanol al 96%. Se introduce un recipiente con agua destilada estéril para mantener la atmósfera húmeda y se colocan nuevamente las charolas y frascos de cultivo en su sitio.

B) Cultivo de células

Antes de cada experimento se siembran las células en botellas de cultivo de poliestireno (Corning Incorporated, New York, USA) de 60 x 15 mm. Se usan inóculos de 1000 células/ml. Los cultivos se incuban a 36 °C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ hasta que las células forman una monocapa. Entonces se resiembran tres botellas, usando para desprenderlas tripsina al 0.25 %.

Resiembra y mantenimiento de las células.

En condiciones de esterilidad, a partir de una botella de cultivo con células confluentes:

- 1.- Se retira el medio de cultivo utilizando vacío.
- 2.- Se agregan 1.5 ml de tripsina al 0.25%.
- 3.- Se incuba por 10-20 min a 36°C hasta que se desprendan las células.
- 4.- Se resuspenden suavemente y se pasan a un tubo estéril.
- 5.- Se lava la botella con 2 ml de medio basal o PBS, este volumen se coloca también en el tubo con las células.
- 6.- Se centrifuga a 600 xg (Centrífuga Sorvall RC-3B) por 10 min.
- 7.- Utilizando vacío, se elimina el sobrenadante con tripsina.
- 8.- Se resuspende la pastilla celular con 3 ml de medio basal o PBS y se centrifuga como en el paso 6.
- 9.- Se elimina el sobrenadante.
- 10.- Se resuspende el paquete de células en 5 ml de medio de cultivo completo.
- 11.- Se toma una alícuota y se cuenta en una cámara de Neubauer (American Optical, Scientific Instruments Div., New York, USA).
- 12.- Se siembran 1000 células/ml en botellas de cultivo nuevas y se agregan a cada una 4 ml de medio de cultivo completo
- 13.- Se incuban a 36 °C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ dejando flojos los tapones.

Criopreservación de las células OK.

En condiciones de esterilidad:

- 1.- Seleccionar botellas con células al 85% de confluencia.
- 2.- Eliminar el medio de cultivo utilizando vacío.
- 3.- Tripsinizar por 10 minutos a 36 °C.
- 4.- Resuspender suavemente las células y pasarlas a un tubo cónico estéril.
- 5.- Lavar las botellas con 2 ml de medio basal o PBS y coleccionar este volumen también en el tubo con las células.
- 6.- Centrifugar a 600 xg por 10 minutos.
- 7.- Eliminar el sobrenadante y lavar con medio basal o PBS.
- 8.- Centrifugar a 600 xg por 10 minutos.
- 9.- Eliminar el sobrenadante, resuspender suavemente el paquete celular en 5 ml de medio basal, tomar una alícuota y contar en una cámara de Neubauer.
- 10.- Ajustar la densidad celular a 5×10^6 - 2×10^7 células/ml en medio de cultivo con 20% de suero fetal y 10% de DMSO.
- 11.- Resuspender las células y dividir la suspensión en alícuotas de 1 ml en viales NUNC previamente esterilizados y rotulados.
- 12.- Colocar a 4 °C por 1 hora.
- 13.- Colocar a -20°C por 4 horas.
- 14.- Pasar los viales al Revco (-70 °C) y dejarlos toda la noche.
- 15.- Transferir a nitrógeno líquido (-190 °C).

Descongelamiento de las células (Prueba de viabilidad).

En condiciones de esterilidad:

- 1.- Sacar un vial con células congeladas del nitrógeno líquido.
- 2.- Descongelar incubando inmediatamente por inmersión en un baño de agua a 37 °C.
- 3.- Pasar a un tubo eppendorf estéril y centrifugar 5 minutos a 1000 rpm en una microcentrífuga.
- 4.- Eliminar el medio con DMSO.

- 5.- Resuspender la pastilla en 1 ml de medio completo.
- 6.- Dividir la suspensión en 2 botellas de cultivo.
- 7.- Adicionar 4 ml de medio de cultivo MEM completo.
- 8.- Incubar a 36 °C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ por 6 horas. A este tiempo las células viables deberán haberse adherido a la superficie de crecimiento de la botella de cultivo.

Curva de crecimiento de las células OK.

Se siembran 1×10^4 células OK en cajas Petri de plástico de 25 cm², (se forman grupos de tres cajas para contar durante 7 días). Se incuban a 36°C con atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Cada 24 h según corresponda, se retira el medio de cultivo y se agregan 2 ml de tripsina al 0.25 %, se incuba por 10 min a 36°C y se agregan 4 ml de medio basal. Se resuspende y se cuenta el número de células de cada caja (por triplicado) en una cámara de Neubauer.

C) Modelo Experimental

(1) Montaje del modelo.

El modelo consiste en placas de poliestireno con 24 pozos (Corning), que albergan insertos de poliestireno en forma de anillo, en cuya parte inferior tienen unido un filtro de 0.6 cm^2 de superficie libre, con poros de $0.45 \mu\text{m}$ de diámetro (*Millicell HA*, Millipore, Bedford MA, EUA). Sobre estos filtros se siembran 4×10^5 células/ cm^2 y se incuban en medio fresco hasta que formen la monocapa. El epitelio queda rodeado por el medio de cultivo por todas sus caras. Los solutos son transportados en forma transepitelial de la cara apical a la basolateral o viceversa. Cuando los solutos se transportan de la cara apical a la basolateral éstos pasan por los poros del filtro y se depositan en el medio que se encuentra bajo los insertos. Cuando las monocapas de células OK están perfectamente formadas presentan una resistividad característica de 41 a $78 \Omega/\text{cm}^2$ (Schwegler *et al*, 1989; Hori *et al*, 1993). La cual puede determinarse con un ohmetro Millicell-ERS (Millipore) (*Figuras 3 y 4*).

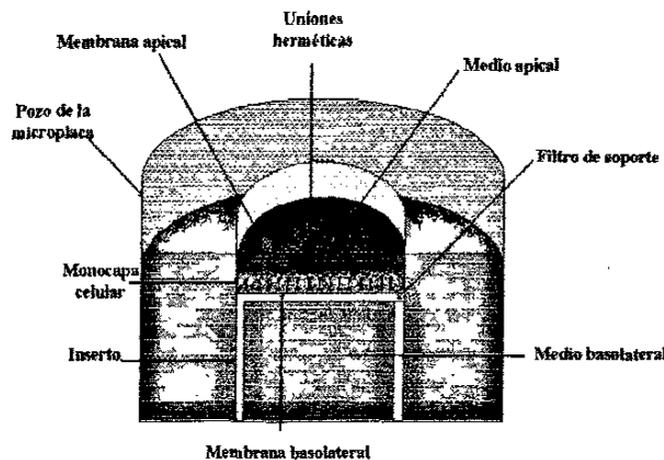


Figura 3. Modelo Experimental. Dibujo del inserto.

(2) Relación Temporal de la Formación de Monocapas de Células OK Cultivadas sobre Insertos.

La meta de esta etapa consistió en lograr que se formaran las monocapas celulares sobre los filtros de los insertos, es decir, que las células formaran uniones herméticas y que presentaran su resistividad característica. El procedimiento fue el siguiente:

1. Se precubren los insertos con 200 μ l de suero fetal y se incuban a 36 °C toda la noche. Antes de sembrar las células, se retira el suero bajo condiciones de esterilidad utilizando vacío.

2. A partir de cultivos en confluencia se prepara una suspensión celular de 600,000 células/ml y se siembran en cada inserto 240,000 células (400 μ l). Los insertos se hallan colocados en microplacas de 24 pozos. En los pozos, se colocan 700 μ l de MEM completo.

3. Se incuba la microplaca a 36 °C, en atmósfera húmeda y 5% de CO₂.

4. Cada 24 horas (durante 11 días) en condiciones estériles, se mide la resistencia transepitelial en los insertos de acuerdo al siguiente protocolo, recomendado por el fabricante del ohmetro:

(a) Se enciende el ohmetro (Millicell- ERS) durante 3-4 horas con el electrodo sumergido en PBS y después 15 minutos en etanol.

(b) Se calibra con medio de cultivo estéril, sin suero.

(c) Se deja en reposo por 15 minutos. El voltaje debe ser igual a 0 ± 0.01 volts, la resistencia debe ser cero. Estos valores deben mantenerse estables.

(d) Se coloca el electrodo entre el pozo de la microplaca y el inserto, teniendo cuidado de no tocar la membrana donde han crecido las células para no romper la integridad de las monocapas.

(e) Efectuar lecturas en insertos "blanco" con medio basal, sin células.

La Resistencia Transepitelial (RTE) es igual a:

$$\text{(Resistencia del inserto muestra - Resistencia del inserto blanco)} \times 0.6$$

donde: $0.6 = \text{área de membrana efectiva}$, y las unidades están dadas en Ω/cm^2 .

Cuando se encontró la máxima resistencia transepitelial en la curva correspondiente, se consideraron formadas las monocapas celulares y definimos el tiempo de incubación para este evento, según nuestras condiciones experimentales.

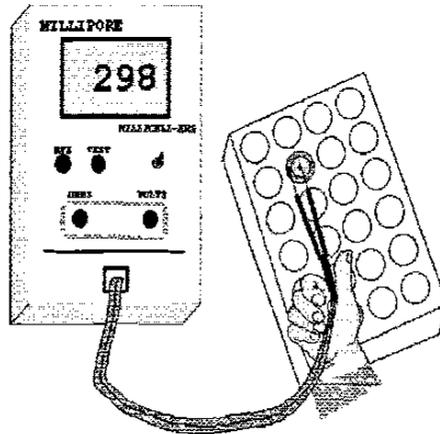


Figura 4. Modelo Experimental. Forma de medir la resistencia eléctrica transepitelial utilizando el ohmetro (Millicell-ERS).

(3) Marcaje de seroalbúmina con ^{131}I (Fracker y Speck, 1978).

(i) Preparación de los tubos de reacción con Iodogen.

Se pesa 1 mg de iodogen [1,3,4,6-tetracloro-3 α ,6 α -diphenylglicoluryl], (*Sigma Chem. Co. St. Louis MO., EUA*) y se disuelve en 25 ml de cloroformo. Se colocan alícuotas de 50 μl en tubos de vidrio y se secan con corriente de nitrógeno, teniendo cuidado de formar una película en el fondo del tubo. Se cubren los tubos con parafilm y se almacenan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El reactivo así preparado reacciona rápidamente en esta fase sólida con mezclas acuosas de iodo y proteínas para producir "proteínas iodinadas".

(ii) Iodinación.

A partir de un estándar de 1 mg/ml de seroalbúmina bovina grado RIA, se toman 20 μg y se mezclan con 200 μCi de ^{131}I (amablemente donado por el Dr. Gonzalo Bazán Varela, Jefe del Departamento de Medicina Nuclear del Hospital Regional de Especialidades # 25 del IMSS, Monterrey, N. L.) en los tubos de reacción preparados con iodogen. Se incuban por 30 min a temperatura ambiente, se detiene la reacción adicionando 100 μl de SSB. La proteína se separa del iodo libre haciendo pasar la mezcla de marcaje a través de una columna de *Sephadex G25* (Farmacia, Suecia) prelavada con 8-10 ml de SSB. La proteína iodinada se colecta en fracciones de 500 μl , a un flujo de 14 ml/h.

(iii) Determinación de radiactividad en las fracciones colectadas.

De cada fracción se toman 5 μl y se colocan en viales que contienen 5 ml de coctel de centelleo para muestras líquidas. Se mide la radiactividad en un contador de centelleo Tri-Carb TR-1600, (*Packard, Canberra Company, Australia*) y se seleccionan las fracciones con mayor radiactividad.

(iv) Autorradiografía.

Este procedimiento nos permite comprobar que la proteína ha sido adecuadamente marcada. Se prepara un gel discontinuo de poliacrilamida con SDS y se corren las muestras que representan a las fracciones seleccionadas con mayor radiactividad. El corrimiento del gel se realiza a 75 mV mientras que las muestras atraviesan el gel concentrador (poliacrilamida al 5 %) y se incrementa el voltaje a 150 mV durante su separación en poliacrilamida al 12.5%. Una vez terminada la corrida, se toma el gel y se envuelve en un plástico especial ("*saran wrap*"). Se coloca el gel en un cartucho para radiografías y se expone a película para rayos X por períodos de 6, 12 y 24 h a -20 °C. En cada tiempo mencionado, se saca una de las películas y se revela. La presencia de una banda única, sin degradar, en la posición que corresponde a la albúmina (se iodinan simultáneamente proteínas marcadoras de peso molecular), es indicativo de que la proteína ha sido marcada adecuadamente, ver la *Figura 7* en la sección de resultados.

(v) Cuantificación de proteína en la muestra iodizada.

Una vez que se tiene la certeza del correcto marcaje de la proteína, se determina la concentración de proteína recuperada. Se mide la absorbancia de las muestras a 280 nm en cubetas de cuarzo y lámpara de luz ultravioleta, contra una curva estándar de seroalbúmina bovina de 10-100 µg/ml. Se obtiene la ecuación de la recta y se calcula la concentración de [¹³¹I]-SAB.

(vi) Determinación de la Actividad Específica de la [¹³¹I]-SAB.

Finalmente, se calcula la actividad específica de la muestra iodizada, de acuerdo con el procedimiento que se explica en el siguiente ejemplo:

Si la concentración de $[^{131}\text{I}]\text{-SAB} = 25 \mu\text{g/ml}$ y la radiactividad total en $5 \mu\text{l} = 280,680$ cpm, por lo tanto en $1 \text{ ml} = 56'136,000$ cpm. Este número de cpm se divide entre 0.46 que es la eficiencia del equipo para yodo, lo cual nos da $122'034,782$ dpm/1ml

Si:

$$1 \mu\text{Ci} \text{ ----- } 2.2 \times 10^6 \text{ dpm}$$

$$X \text{ ----- } 122'034,782 \quad X = 55 \mu\text{Ci de radiactividad en la muestra}$$

$$68 \mu\text{g} \text{ ----- } 1 \text{ nmol de SAB}$$

$$25 \mu\text{g} \text{ ----- } X \quad X = 0.36 \text{ nmoles, es la masa de } [^{131}\text{I}]\text{-SAB}$$

$$55 \mu\text{Ci} \text{ ----- } 0.36 \text{ nmoles}$$

$$X \text{ ----- } 1 \text{ nmol} \quad X = 153 \mu\text{Ci/nmol} \quad \textit{Es la actividad específica el día en que se mide la radiactividad}$$

Si el experimento estuviera programado para realizarse 3 días después de que se calcula la actividad específica, se vuelve a calcular este parámetro para el día del ensayo.

La vida media del $[^{131}\text{I}] = 8.06$ días.

Vidas medias expiradas = $3/8.06 = 0.374$. Se busca en la tabla de decaimiento de radioisótopos la fracción de actividad remanente, se encuentra que es de 0.774 (Packard, Manual Técnico, 1985).

$$153 \text{ ----- } 1$$

$$X \text{ ----- } 0.774 \quad X = 119 \mu\text{Ci/nmol} \quad \textit{Es la actividad esperada el día del experimento.}$$

Las concentraciones de SAB e inulina determinadas para un ensayo deben ser equimolares y nosotros utilizamos en todos los experimentos una concentración de 140 nmolar:

140 nmoles ----- 1000 ml

X ----- 1 ml X= 0.140

0.140 nmoles ----- 1 ml

X ----- 0.4 X= 0.056 nmoles/pozo = 56 pmoles/pozo

Si se van a utilizar 24 insertos, cada uno con 400 μ l de muestra, el volumen de trabajo es 9.6 ml y, si el volumen de fracciones radiactivas colectadas es 6.5 ml,

0.056 nmoles ----- 1 pozo

X ----- 24 pozos X= 1.344 nmoles totales a usar en el experimento

si tenemos,

0.36 nmoles ----- 1 ml

X ----- 6.5 ml X= 2.34 nmoles totales en la muestra iodizada

2.34 nmoles ----- 6.5 ml

1.34 nmoles ----- X X= 3.72 ml

Entonces, para la solución de trabajo se toman 3.72 ml de la SAB iodizada y se adicionan 5.88 ml de buffer de Dulbecco

(4) Transporte de [131 I]-Seroalbúmina y [3 H]-inulina en sentidos apical-basolateral y basolateral-apical

Nos basamos en el método descrito por Ryohei Hori y colaboradores (1993). Utilizamos monocapas de células OK cultivadas sobre insertos que presentaran una resistencia transepitelial de al menos 50-53 Ω /cm², de acuerdo a nuestros resultados experimentales en la etapa 2.

En microplacas de 24 pozos que contienen los insertos con las monocapas a usar:

- 1.- Se lavan las células dos veces con PBS y a cada inserto (para el sentido apical-basolateral), o a los pozos (para el sentido basolateral-apical) se les agregan cantidades equimolares (56 pmoles) de [³H]-inulina o [¹³¹I]-SAB disueltos en 400µl de amortiguador de Dulbecco .

- 2.- Al tiempo cero y cada 15 min, durante 90 minutos, se toman 5 µl de cada uno de los pozos (para el sentido apical-basolateral), y el mismo volumen de los insertos (para el sentido basolateral-apical). Se colocan en un vial previamente rotulado que contiene 5 ml de coctel de centelleo para muestras líquidas (un vial por muestra). Cada vez que se toma una muestra, el líquido se restituye con un volumen igual de amortiguador de Dulbecco. Se incuba la microplaca con los insertos a 36 °C y entre cada tiempo se agita suavemente.

- 3.- Al final del experimento, se llevan los viales a un contador de centelleo Tri-Carb modelo 1600 TR (Packard Company, Canberra, Australia). Se determina la radiactividad y se expresa en desintegraciones por minuto (dpm). Con los datos obtenidos se calculan los pmoles/cm² de inulina o seroalbúmina transportados. Se calcula el transporte neto del equivalente de [¹³¹I]-SAB (Fouda *et al*, 1989).

$$TN = (TSAB) - (TINUL)$$

donde:

TN = pmoles/cm² netos transportados del equivalente de [¹³¹I]-SAB

TSAB = pmoles/cm² transportados del equivalente de [¹³¹I]-SAB experimental

TINUL = pmoles/cm² transportados de [³H]-inulina (marcador de flujo paracelular)

- 4.- Se solubilizan las monocapas con 500 µl de NaOH 0.1 N a 4 °C. Se deja en reposo por 5 min, se resuspende este volumen con una pipeta de repetición y se cuenta una alícuota de 5 µl para determinar la radiactividad acumulada en el interior de las células.

Se calcula la masa en pmoles/cm² de [¹³¹I]-SAB y [³H]-inulina, como se explica a continuación. El mismo razonamiento se utiliza para calcular la masa transportada transepitelialmente. Las consideraciones aritméticas son:

$$\begin{aligned} (\text{cpm en } 5\mu\text{l})^a \div (0.46)^b &= \text{dpm en } 5 \mu\text{l} \times (80)^c = \text{dpm en } 400 \mu\text{l} \div (2.2 \times 10^6)^d = \mu\text{Ci} \div \\ (\text{Actividad específica})^e &= \text{nmoles totales} \div (0.6)^f = \text{nmoles/cm}^2 \times 1000 = \text{pmoles/cm}^2 \end{aligned}$$

donde:

^a Es el volumen tomado en el tiempo correspondiente durante el ensayo.

^b Es la eficiencia del equipo para ¹³¹I, para [³H] la eficiencia es de 67%.

^c Es un factor de conversión adaptado al volumen total inicial en el inserto.

^d Es un factor de equivalencia: 1 μCi = 2.2 × 10⁶ dpm.

^e Es la actividad específica calculada para [¹³¹I]-SAB, para [³H]-inulina es 3.3.

^f Es el área de membrana efectiva del inserto.

(5) Electroforesis en geles de poliacrilamida y cromatografía en papel.

Al final del experimento, se colecta el líquido de los pozos y se concentra a 1 ml en un concentrador de sólidos "Centrivap" (Labconco Corporation, Kansas City, USA). Se analiza por cromatografía en papel, utilizando como solventes el sistema, butanol:ácido acético:agua (12:3:5) y se revela con ninhidrina. Al mismo tiempo, se corre una electroforesis discontinua en gel de poliacrilamida al 12.5 %. Ambas preparaciones se revelan por autorradiografía.

(6) Digestión de [¹³¹I]-SAB con tripsina.

Con el fin de tener el patrón de manchas cromatográficas, así como la autorradiografía correspondiente a los productos de hidrólisis de la seroalbúmina digerida, se realizó lo siguiente: en un tubo eppendorf se colocaron 250 µg de seroalbúmina bovina más 100 µl de una solución de tripsina al 0.25% en salino TD 1X. Se incubó por 3 h a 37°C y se corrió una cromatografía en papel utilizando el sistema de solventes mencionado previamente, después se reveló con ninhidrina. El mismo papel se sometió a exposición con película de rayos X.

(7) Determinación del efecto de dosis variables de mercurio sobre la viabilidad de células OK.

El objetivo de este experimento fue establecer las dosis subtóxicas y citotóxicas de cloruro mercúrico para utilizar posteriormente en experimentos de transporte con células intoxicadas con este metal. Adaptamos un método específico para las necesidades del proyecto, basándonos en trabajos de diferentes grupos de investigación (Nakazawa *et al*, 1975; Aleo *et al*, 1992; Bohets *et al*, 1995). El ensayo se realiza de la siguiente manera:

- 1.- Se siembran 50,000 células en placas de poliestireno con 6 pozos (diámetro del pozo = 9.2 cm²) y se incuban a 36 °C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda, hasta que formen una monocapa confluyente.
- 2.- Se elimina el medio de cultivo y se sustituye por 0.8 ml de medio de cultivo sin suero adicionado con diferentes concentraciones de cloruro mercúrico (0, 0.1, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0, 30.0 y 100 µM). Cada dosis representa un grupo de 4 pozos.

3.- Se incuban por 24 horas a 36 °C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda y se determina la viabilidad celular utilizando un método colorimétrico cuyo fundamento es la reducción del MTT por la actividad de enzimas deshidrogenasas presentes en células viables. El MTT es reducido a formazán, un compuesto coloreado insoluble que precipita en el interior de las células. Posteriormente, este compuesto se solubiliza y extrae con alcohol isopropílico acidificado en forma de un complejo color púrpura. La absorbancia a 545 nm es directamente proporcional al número de células vivas.

Ensayo colorimétrico:

- 1.- Se decanta el medio con mercurio.
- 2.- Se lavan suavemente los pozos dos veces con 1 ml de SSB.
- 3.- Se agregan a cada pozo 500 µl de MTT y 100 µl de PMS.
- 4.- Se incuban las microplacas a 36 °C por 75 minutos.
- 5.- Se decantan los reactivos y se lavan los pozos con 1 ml de SSB.
- 6.- Se agrega 1 ml de alcohol isopropílico acidificado (HCl 0.04 M en isopropanol).
- 7.- Se dejan reposar las placas por 15 minutos y se resuspende vigorosamente el alcohol con una pipeta de repetición.
- 8.- Se pasa el sobrenadante a una placa nueva y se lee la absorbancia en un lector de microplacas (EIA Multiwell Reader, Sigma Diagnostics) a 545 nm con un filtro diferencial de 630 nm.

(8) Determinación del efecto del mercurio sobre la resistencia transepitelial de las monocapas.

1.- A partir de cultivos en confluencia se prepara una suspensión celular de 600,000 células/ml y se siembran en insertos precubiertos con suero, 240,000 células (400 µl). Los insertos se hallan colocados en microplacas de 24 pozos. En los pozos, se colocan 700 µl de MEM completo.

2.- Se incuba la microplaca por 8 días a 36 °C, en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Una vez alcanzada una RTE de 50 a 53 Ω/cm², se forman grupos de tres insertos por concentración de HgCl₂ a usar y se adicionan a los insertos, en condiciones de esterilidad 400 µl de cada una de las dosis de prueba (0, 5 10 15 20 y 25 µM). En los pozos se adicionan 700 µl de la misma concentración de HgCl₂, el cual se encuentra diluído en MEM basal.

3. Se incuba la microplaca por 24 h a 36 °C, en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ y se mide la resistencia transepitelial utilizando el Millicell-ERS, como se describió previamente.

(9) Efecto del mercurio sobre el transporte de seroalbúmina bovina en monocapas de células OK.

En esta etapa investigamos si el mercurio tiene un efecto inhibitorio sobre el transporte de seroalbúmina bovina, dependiente del tiempo de incubación y de la dosis del metal. Hicimos lo mismo que en la etapa 4, pero analizamos el transporte únicamente en sentido apical-basolateral. Estos experimentos se realizan inmediatamente después de que las monocapas alcanzan una resistividad estable (50 a 53 Ω/cm²) y se tratan como sigue:

1.- Se incuban las células con 0, 5 10, 20, 25 y 30 µM de cloruro mercúrico en medio basal por 24 horas.

2.- Una vez terminada la preincubación, se elimina el HgCl₂, y se lavan las células suavemente con SSB, después se agregan la [¹³¹I]-SAB y [³H]-inulina a las monocapas y se analiza el transporte como se describió previamente en la etapa 4.

RESULTADOS

Relación temporal del crecimiento in vitro de las células OK.

La figura 5 muestra una curva de crecimiento a partir de inóculos de 1000 células/ml, sembradas como se describe en la sección de métodos. Se observa que el punto medio de la fase logarítmica de crecimiento se presenta a los 5 días de cultivo. De acuerdo con estos resultados, las fechas de resiembra periódica se programaron para efectuarlas cada cinco días.

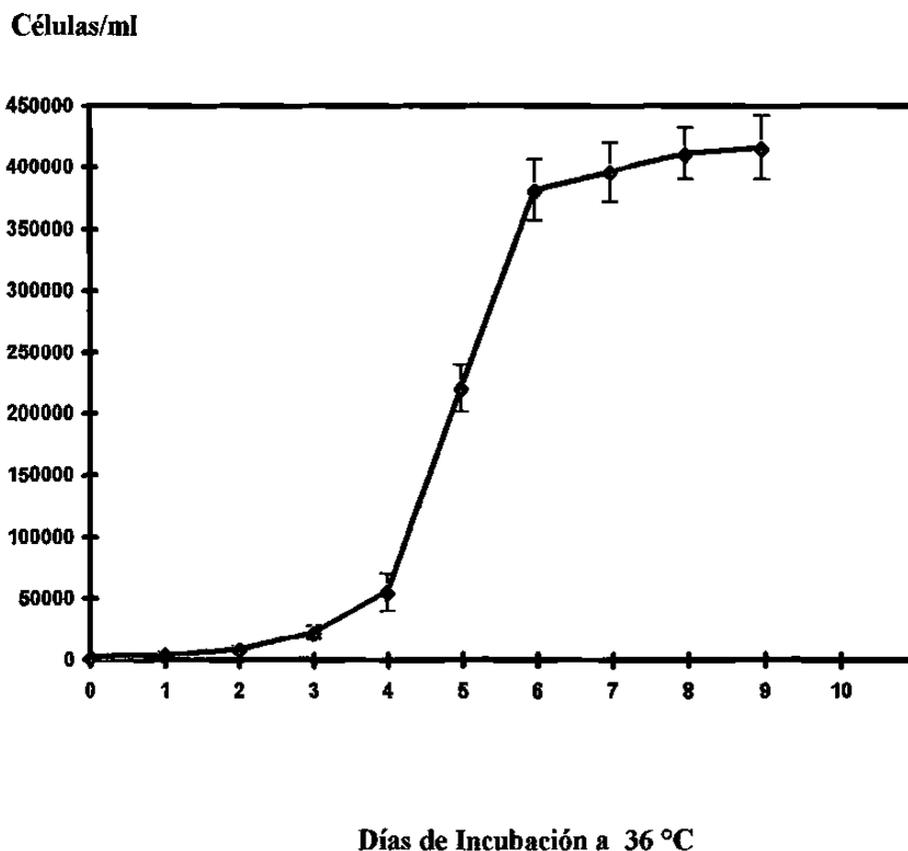


Figura 5. Relación temporal del crecimiento in vitro de las células OK.

En botellas de cultivo de 25 cm² se sembraron 1000 células/ml y se incubaron a 36 °C en atmósfera de CO₂ al 5% por tiempos variables. Las células se despegaron cada 24 h con tripsina al 0.25% y se contaron en un hemocitómetro. Se representan los promedios ± DE de tres experimentos por triplicado.

Relación temporal de la formación de monocapas de las células OK cultivadas sobre insertos.

En la figura 6 se observa que las monocapas de células OK muestran una relación monomodal con respecto al tiempo de incubación. A los ocho días la monocapa estaba completamente formada y su resistencia transepitelial alcanzó el valor máximo, este valor correspondió a $53 \Omega/\text{cm}^2$. Después de este tiempo descienden los valores de RTE. Según estos resultados, los experimentos de transporte se realizaron considerando este tiempo de incubación e inóculos de 240,000 células/inserto.

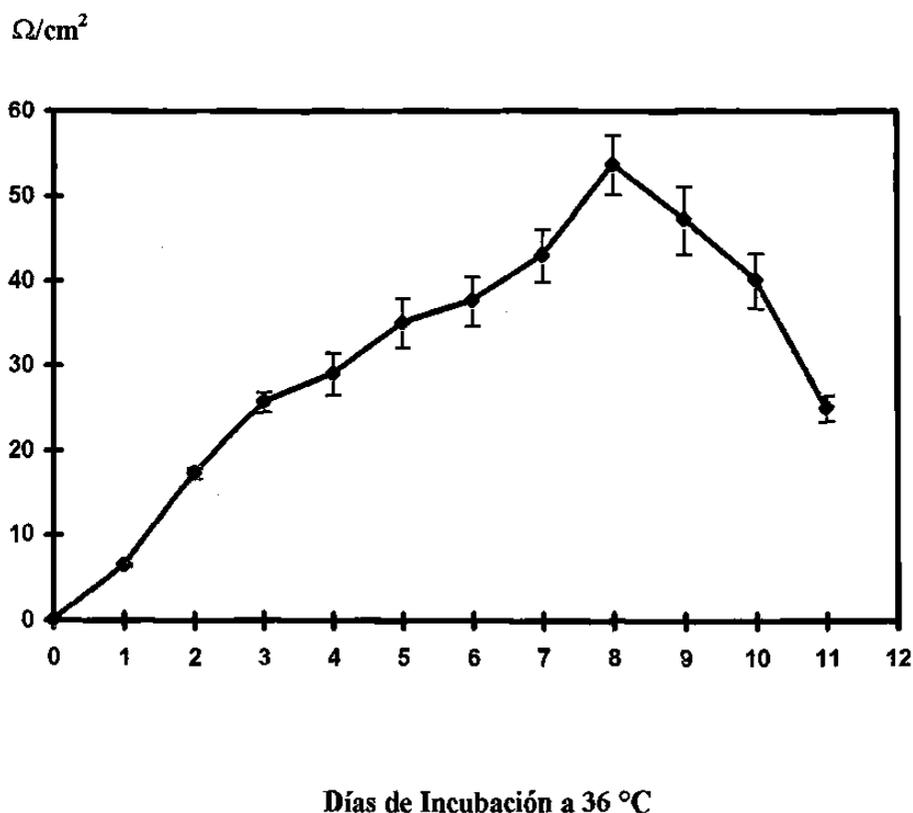


Figura 6. Relación temporal del incremento de la resistencia transepitelial durante la formación de monocapas de células OK crecidas sobre insertos.

En insertos con 0.6 cm^2 de área de membrana efectiva, colocados en placas de 24 pozos, se sembraron 2.4×10^5 células y se incubaron a $36 \text{ }^\circ\text{C}$ en atmósfera de CO_2 al 5% por 11 días. Cada 24 h se les midió la resistencia transepitelial con un ohmetro. Promedios \pm DE de tres experimentos por triplicado.

Radiomarcaje de seroalbúmina bovina.

La figura 7 representa una fotografía de la autorradiografía de la seroalbúmina iodada en nuestro laboratorio según Fracker y Speck (1978), junto con una mezcla de marcadores de peso molecular. Como era de esperarse, la seroalbúmina aparece como una mancha predominante que corresponde a su peso molecular con respecto al marcador. Los protocolos de iodación y autorradiografía se efectuaron sistemáticamente cada vez que se realizó un experimento.

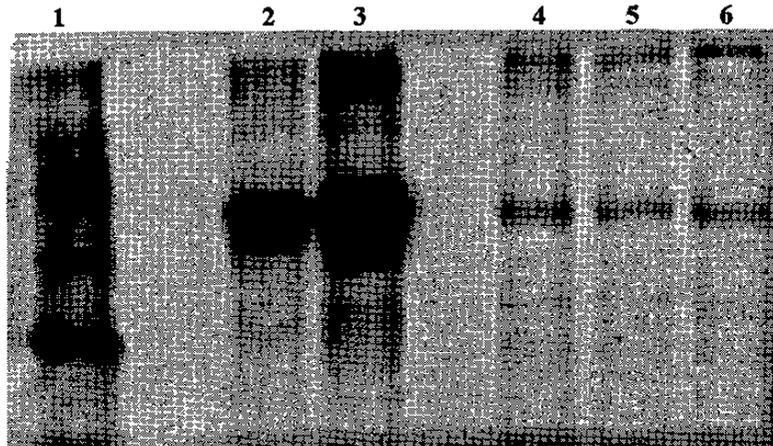


Figura 7. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida-SDS donde aparece la banda de [¹³¹I]-SAB.

Se marcaron 20 µg de seroalbúmina bovina grado RIA con 200 µCi de ¹³¹I. Se eliminó el exceso de yodo haciendo pasar la preparación a través de una columna de *Sephadex G25* y se desarrolló la electroforesis a 75 mV. En el carril 1 se muestra una colección de marcadores de peso molecular de 116, 84, 58 y 45 kDa que se iodaron simultáneamente con la seroalbúmina bovina, los carriles 2 y 3 tienen 100 µg de [¹³¹I]-SAB, los carriles 4 a 6 corresponden a 30 µg de la misma proteína iodada.

Difusión de radiactividad asociada a [³H]-inulina a través del espacio paracelular de monocapas de células OK.

La figura 8 muestra que la radiactividad asociada a inulina difunde libremente a través de los poros de la membrana del inserto, en función directa del tiempo de incubación. En los insertos con células la difusión de inulina es impedida por la monocapa y la radiactividad detectada corresponde al flujo paracelular de la inulina.

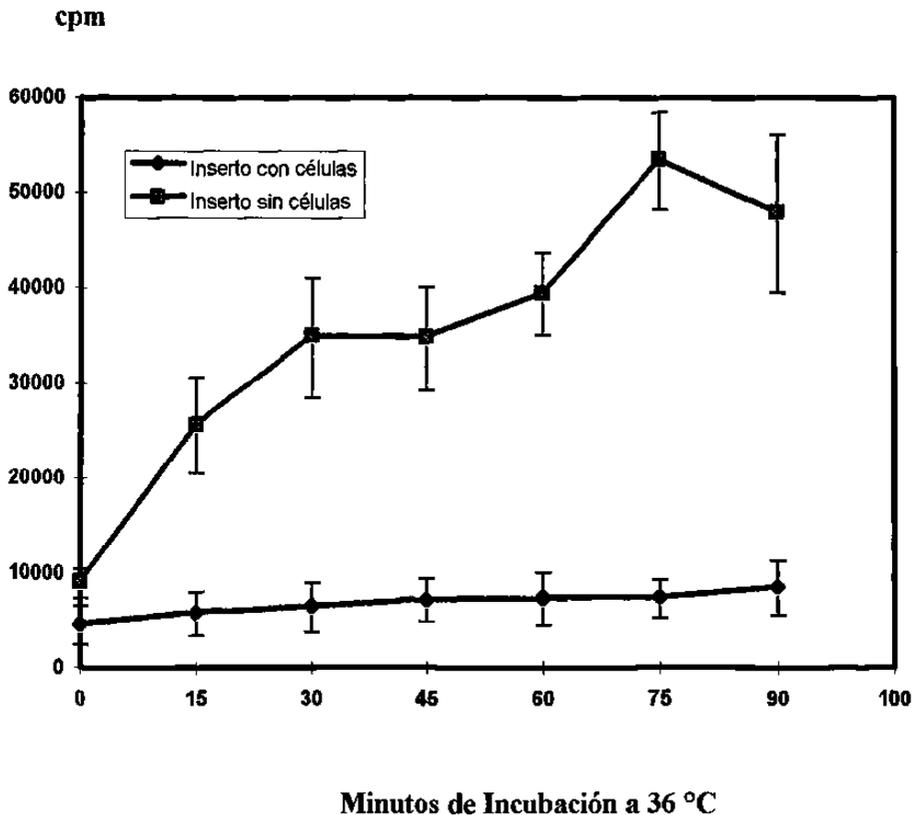


Figura 8. Difusión de radiactividad asociada a [³H]-inulina a través del espacio paracelular de monocapas de células OK.

A monocapas de células OK con 8 días de incubación se les adicionaron 5,500 cpm correspondientes a [³H]-inulina en el lado apical. Se incubaron las células a 36 °C por tiempos variables. Al cabo de cada período de incubación se tomaron 5 µl del lado basolateral y se determinó su radiactividad. Testigo negativo, inserto sin células. Promedios ± DE de tres experimentos por triplicado.

Transporte transepitelial del equivalente de seroalbúmina o sus productos de hidrólisis por monocapas de células OK.

La figura 9 muestra que las células OK fueron capaces de transportar transepitelialmente seroalbúmina bovina, lo cual no ocurre con la inulina. El transporte transepitelial del equivalente de SAB por las monocapas corresponde a una relación lineal con respecto al tiempo de incubación. A los 90 min, los epitelios transportaron el equivalente a 18 picomoles/cm² de SAB y 1.9 de inulina.

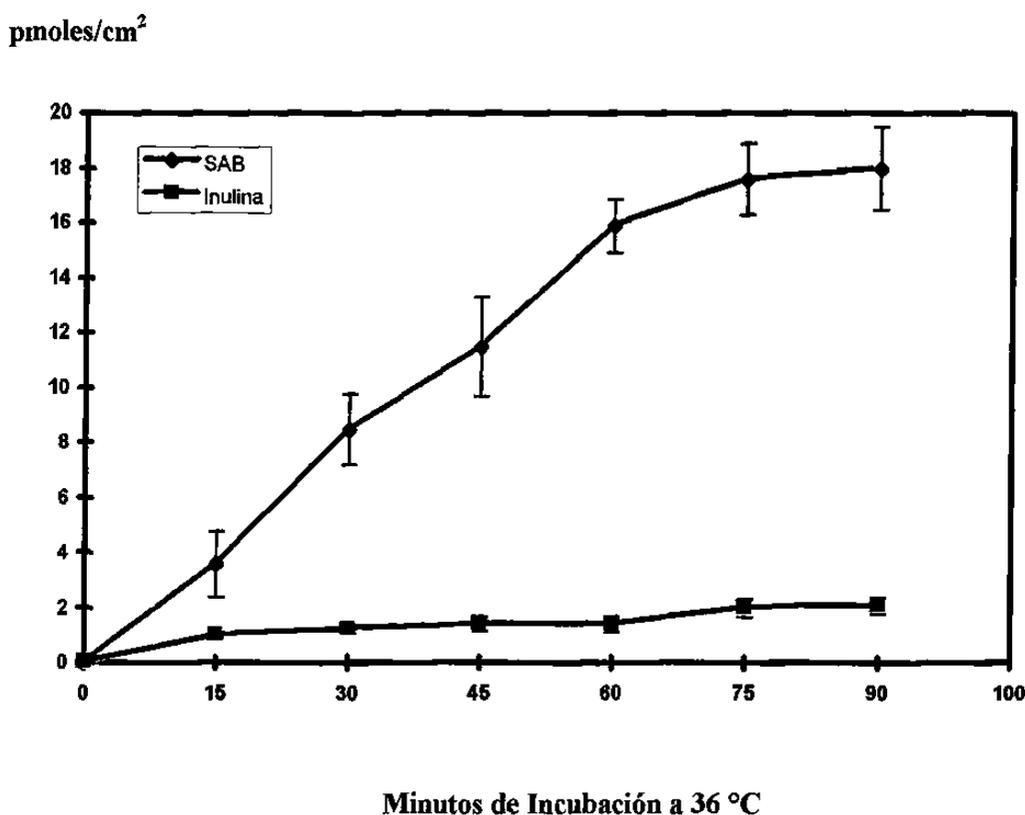


Figura 9. Relación temporal del transporte transepitelial del equivalente de [¹³¹I]-SAB y difusión paracelular de [³H]-inulina.

A monocapas de células OK con resistencia transepitelial de 50-53 Ω/cm² se les adicionaron 56 pmoles de [¹³¹I]-SAB o [³H]-inulina en la cara apical. Se incubaron a 36 °C por tiempos variables, en cada período de incubación se tomaron 5 µl del lado basolateral. Se determinó la radiactividad y se calculó el transporte como se describe en las páginas 42 y 43. Promedios ± DE de tres experimentos por triplicado.

c.B.
10 20 12 1308

Direccionalidad del transporte.

En la figura 10 se puede observar que el transporte transepitelial del equivalente de seroalbúmina ocurre principalmente en sentido apical-basolateral (A-B), con respecto al sentido basolateral-apical (B-A). El evento es dependiente del tiempo de incubación. Como se esperaba, el flujo paracelular de inulina se mantuvo en niveles cercanos a 2 picomoles/cm².

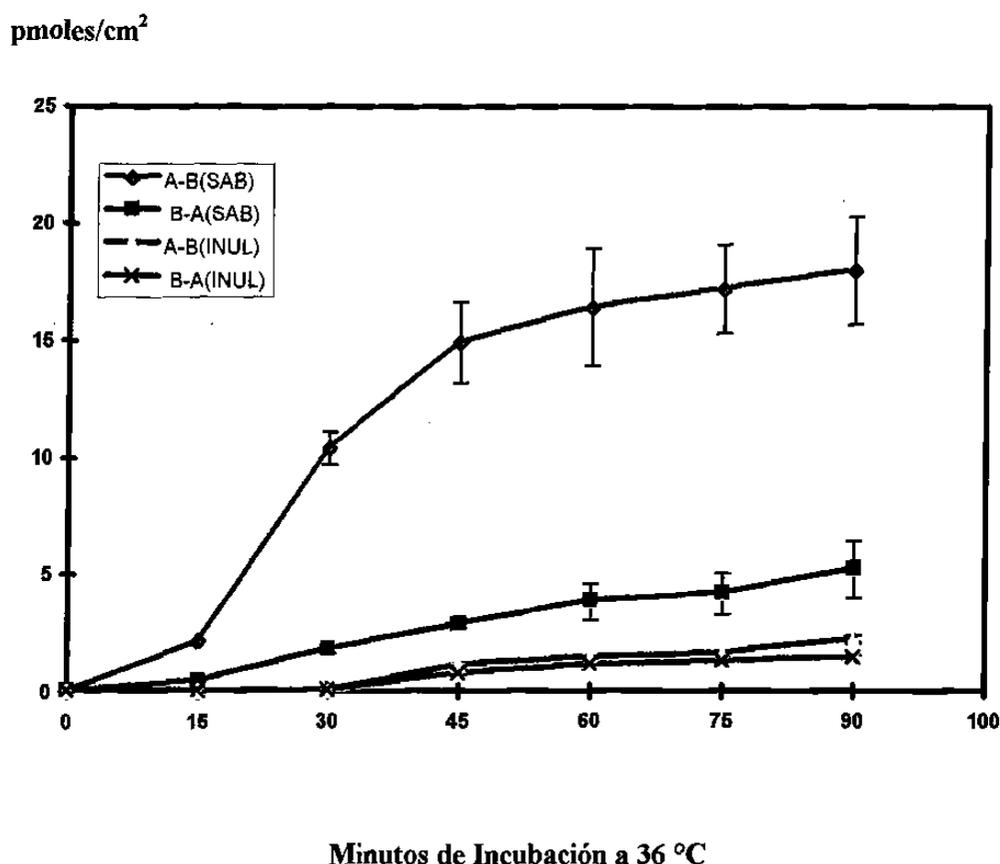


Figura 10. Relación temporal del transporte transepitelial del equivalente de [¹³¹I]-SAB en sentidos apical-basolateral (A-B) y basolateral-apical (B-A) y difusión de [³H]-inulina (A-B y B-A) por monocapas de células OK.

A monocapas de células OK con resistencia transepitelial de 50-53 Ω/cm² se les adicionaron 56 pmoles de [¹³¹I]-SAB o [³H]-inulina en la cara apical y a otro grupo en el lado basolateral. Se incubaron a 36 °C por tiempos variables, en cada período de incubación se tomaron 5 µl del lado opuesto al que se adicionaron. Se determinó su radiactividad y se calculó el transporte. Promedios ± DE de tres experimentos por triplicado.

Radiactividad acumulada por las monocapas.

La figura 11 muestra que las células OK transportan transepitelialmente la radiactividad correspondiente a [¹³¹I]-SAB, pero no la asociada a inulina. Se representa la radiactividad acumulada en el interior de las células al final de experimentos de transporte, la cual se extrajo mediante solubilización de las monocapas con NaOH 0.1 N.

pmoles/cm²

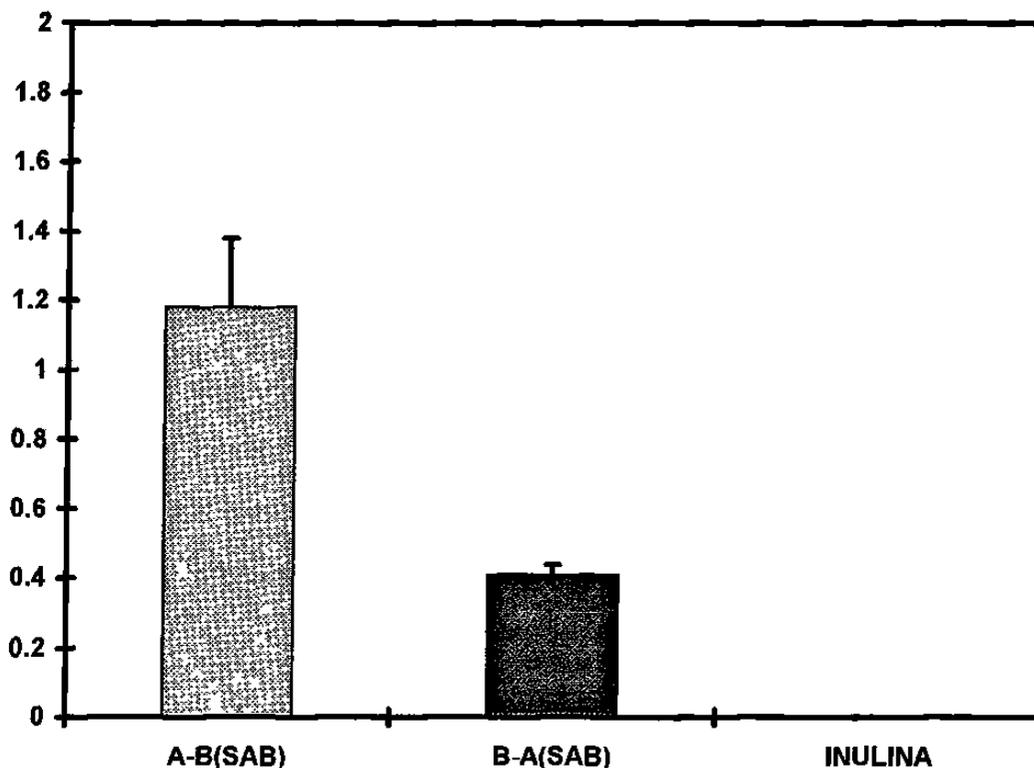


Figura 11. Masa equivalente de [¹³¹I]-SAB y [³H]-inulina acumulada por las monocapas de células OK, después de un experimento de transporte en el cual las células estuvieron en contacto con los compuestos radiomarcados por 90 min a 36 °C.

Al final de un experimento de transporte se lavaron los insertos con las monocapas de células OK, utilizando amortiguador de Dulbecco. Después se adicionaron 500 µl de NaOH 0.1 N a 4 °C y se resuspendieron vigorosamente para solubilizar la monocapa y extraer la radiactividad acumulada en el interior de las células. Se tomaron 5 µl y se les determinó su radiactividad. Se calculó la masa de [¹³¹I]-SAB y [³H]-inulina que fue endocitada por las células OK. Promedios ± DE de tres experimentos por triplicado.

Radiactividad asociada a aminoácidos y péptidos de [¹³¹I]-SAB digerida durante el transporte transepitelial.

La figura 12 representa el porcentaje de ¹³¹I distribuido en las manchas que aparecieron a lo largo del carril de cromatografía.

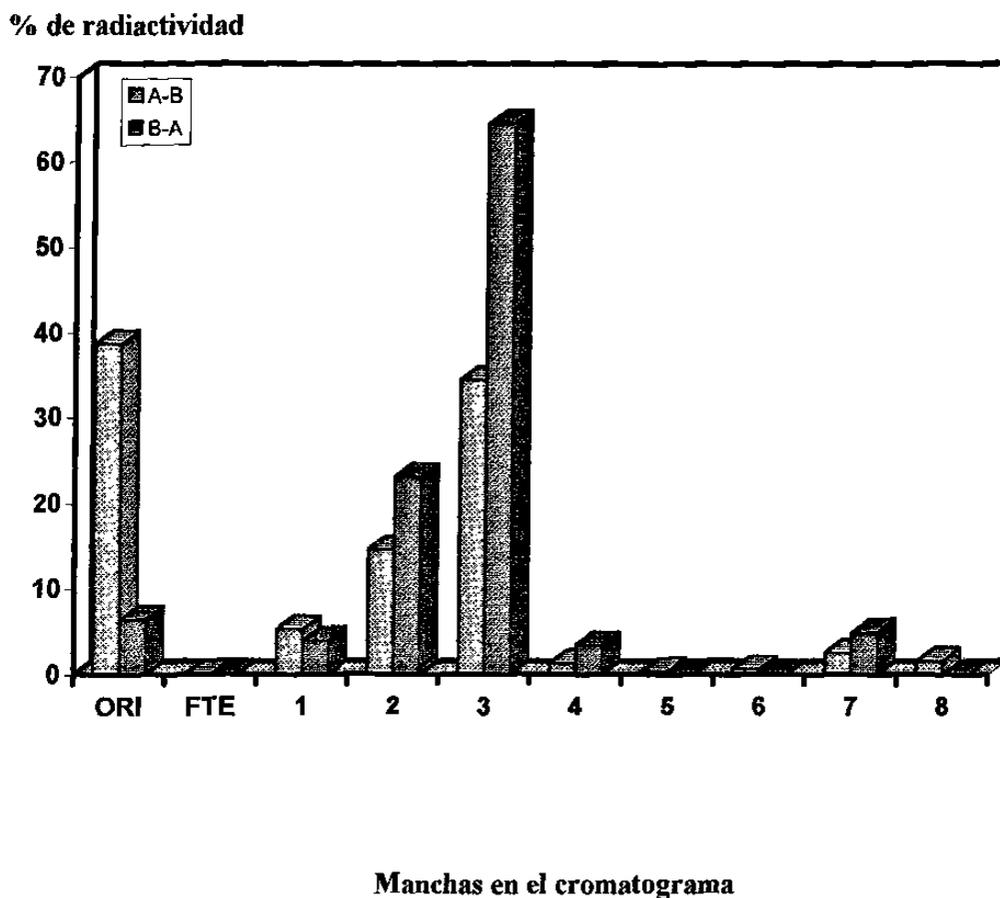


Figura 12. ¹³¹I asociado a aminoácidos y péptidos en las muestras de experimentos de transporte.

Este análisis corresponde a una muestra que se obtuvo al mezclar el líquido de 4 pozos correspondientes al extremo basolateral de las monocapas después de un experimento de transporte. Las manchas se visualizaron en el papel porque se corrieron junto con un estándar de aminoácidos (50 µg/µl de cada uno). La cromatografía se tiñó con ninhidrina. ORI y FTE corresponden a la radiactividad en el origen y frente de corrimiento de las cromatoplasmas respectivamente. Los números corresponden a las ocho manchas que se tiñeron con ninhidrina en el cromatograma.

Cromatografía de [¹³¹I]-SAB digerida con tripsina.

En la figura 13 se muestra el patrón cromatográfico que se obtiene al incubar [¹³¹I]-SAB en presencia de tripsina. Los productos de la digestión de [¹³¹I]-SAB corresponden a un grupo de manchas similar al encontrado en los experimentos de transporte.

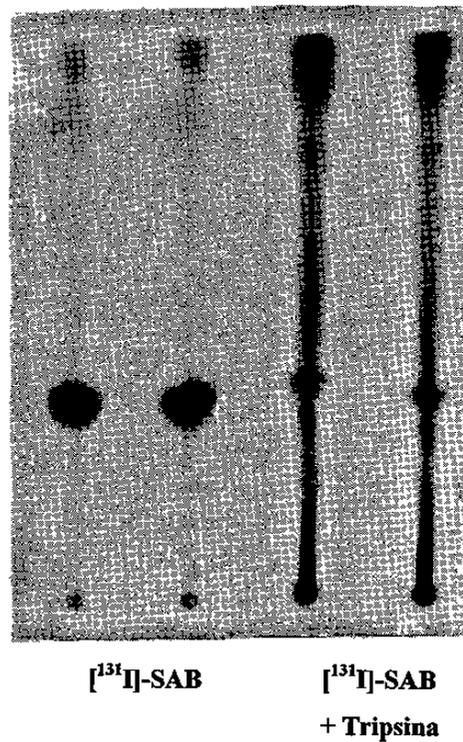


Figura 13. Autorradiografía de [¹³¹I]-SAB digerida con tripsina.

La digestión *in vitro* de proteínas por enzimas proteolíticas produce fragmentos que corresponden a péptidos y aminoácidos. El patrón obtenido nos permitió corroborar que en el caso de la [¹³¹I]-SAB, los productos de la hidrólisis intralisosomal durante el transporte transcelular por las células OK correspondían también a aminoácidos y péptidos.

Efecto del cloruro mercúrico sobre la viabilidad de las células OK.

La figura 14 corresponde a la gráfica que muestra el efecto citotóxico de dosis variables de mercurio sobre la viabilidad celular, medida en función de la capacidad de enzimas deshidrogenasas presentes en células vivas, para reducir el MTT a formazán, un compuesto coloreado. La absorbancia a 545 nm es directamente proporcional al número de células viables. Como se observa en la gráfica, dosis mayores de 15 μM de HgCl_2 disminuyen notablemente la viabilidad.

Absorbancia 545 nm

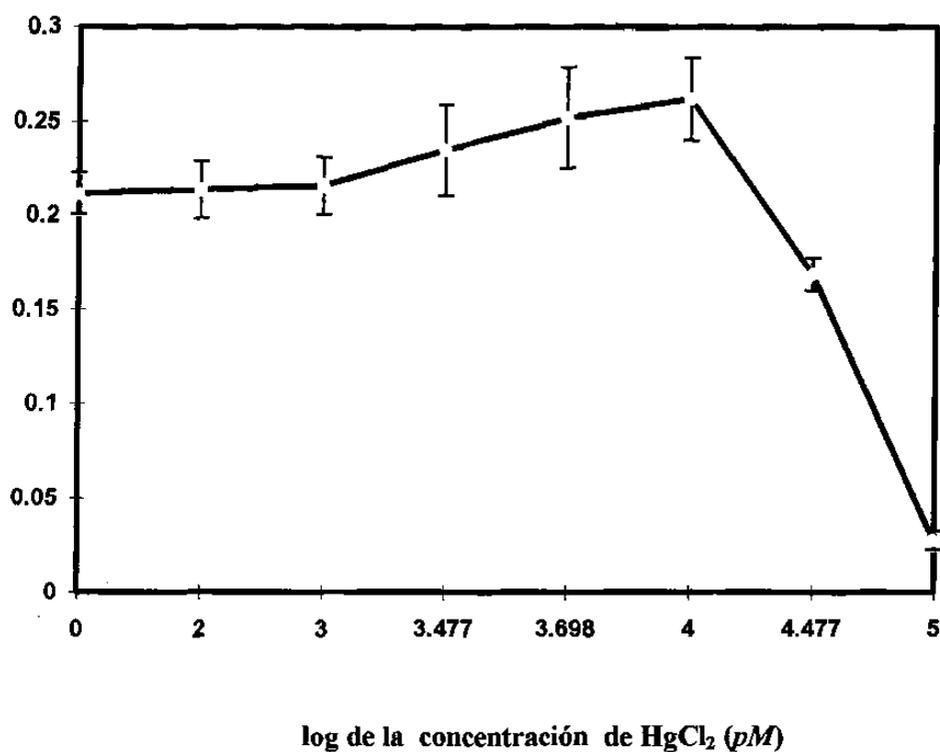


Figura 14. Efecto del cloruro mercúrico sobre la viabilidad de células OK.

Monocapas de células OK se incubaron por 24 h a 36 °C y atmósfera de CO_2 con dosis variables de HgCl_2 (0, 0.1, 1.0, 3.0, 5, 10, 30 y 100 μM). Promedios \pm DE de tres experimentos por triplicado.

Efecto del cloruro mercúrico sobre la resistencia transepitelial de monocapas de células OK.

La figura 15 muestra que la integridad de las monocapas celulares se rompe al adicionar HgCl_2 , en cualquier concentración, desde las dosis subtóxicas, hasta las dosis tóxicas. Lo anterior se refleja en una disminución de los valores de RTE, con respecto a la dosis de HgCl_2 .

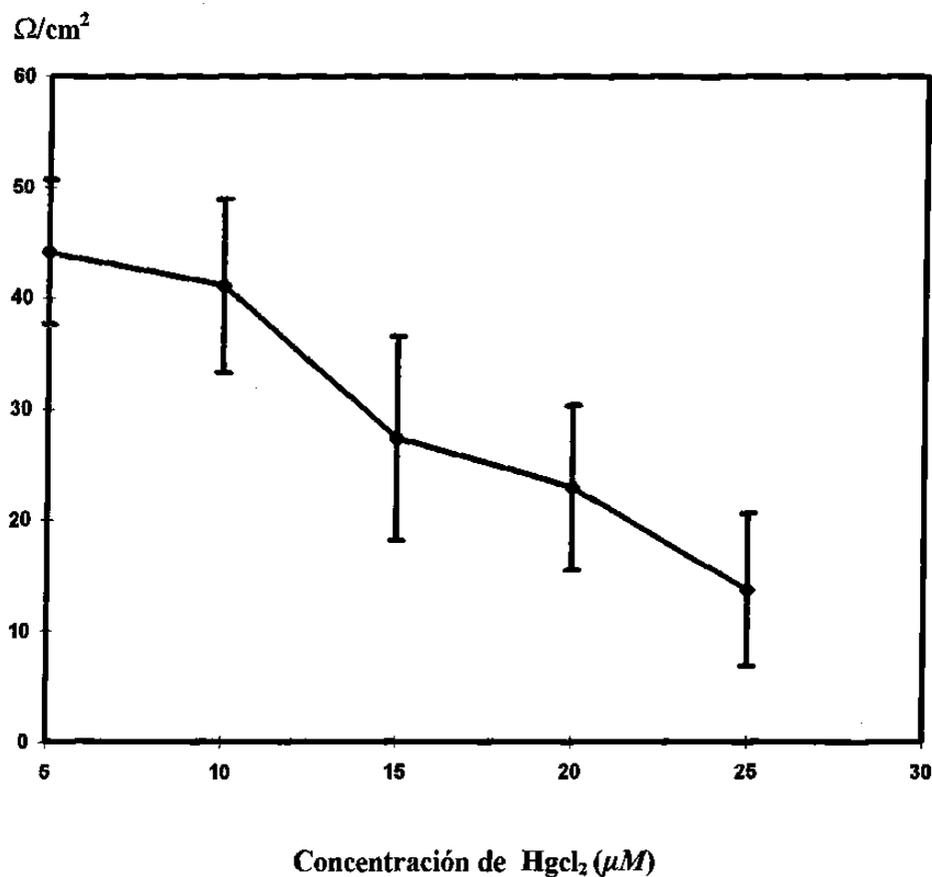


Figura 15. Efecto del cloruro mercúrico sobre la resistencia transepitelial de monocapas de células OK.

Monocapas de células OK se incubaron por 24 h a 36 °C y atmósfera de CO_2 con dosis variables de HgCl_2 . Se midió la resistencia transepitelial como se describe en las páginas 36 y 37. Promedios \pm DE de tres experimentos por triplicado.

Efecto del cloruro mercurico sobre el transporte del equivalente de seroalbumina bovina.

En la figura 16 se observa que el transporte intracelular/basolateral de los productos de hidrólisis de la [¹³¹I]-SAB se inhibe en función de la dosis de HgCl₂.

pmoles/cm²

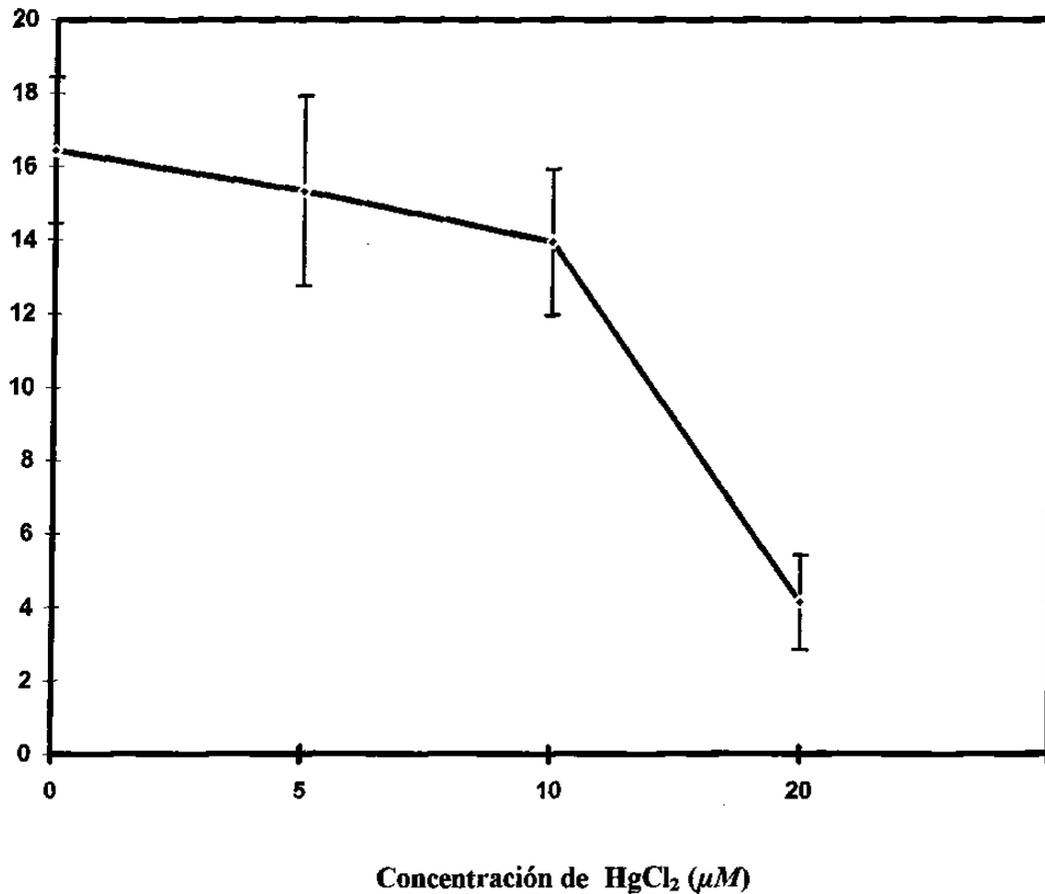


Figura 16. Efecto de la concentración de HgCl₂ sobre el transporte transepitelial del equivalente de [¹³¹I]-SAB por monocapas de células OK a los 75 minutos de incubación.

Monocapas de células OK se incubaron por 24 h a 36 °C y atmósfera de CO₂ con dosis variables de HgCl₂. Se determinó el transporte de [¹³¹I]-SAB como se describe en las páginas 42 y 43. Promedios ± DE de tres experimentos por triplicado.

DISCUSSION

Para estudiar la fisiología, bioquímica y toxicología renal se utilizan diferentes modelos *in vitro*. Estos modelos conservan la estructura celular y funciones específicas correspondientes a la porción del riñón de donde fueron aisladas, aún en las líneas celulares establecidas.

Comparado con los estudios *in vivo* y con los experimentos con túbulos aislados, los cultivos de células tienen la ventaja de que su medio de crecimiento puede ser controlado y cambiado por tiempos prolongados, según las necesidades experimentales. Además, representan una herramienta muy valiosa para estudiar el papel de las hormonas y matriz extracelular en el crecimiento epitelial, polaridad y estructura y función normal. También han servido para estudiar los efectos de la edad, de las nefrotoxinas y del daño anóxico.

Las células cultivadas sobre insertos, una vez que forman una monocapa, se comportan como verdaderos epitelios y adquieren el fenotipo característico de estos, incluyendo la polarización de sus dominios apical y basolateral, por lo que son capaces de reproducir las características diferenciales, anatómicas y fisiológicas de los túbulos contorneados proximales.

Para el modelo que nosotros desarrollamos durante el presente trabajo elegimos los epitelios de células OK cultivados sobre insertos. En dicho modelo, el extremo apical corresponde funcional y anatómicamente a la luz de los túbulos contorneados proximales, con la ventaja de que en esta cara se pueden adicionar diversos sustratos marcados. La membrana basolateral queda en contacto con la membrana de soporte. Con el fin de encontrar a mediano plazo, una proteína biomarcadora de daño renal, nosotros hicimos uso de esta ventaja para estudiar los efectos de la exposición aguda de mercurio sobre el transporte transepitelial de seroalbúmina bovina por monocapas de células OK. Supusimos que con esto se podría analizar el efecto de este y de otros metales pesados o fármacos sobre el transporte o sobre la reabsorción de proteínas, y detectar las

alteraciones a este nivel, lo que finalmente nos permitiría identificar o predecir daño renal.

Al igual que en los epitelios *in situ*, en los cultivos *in vitro* de células OK ocurren procesos de transporte de sustancias tales como hormonas, iones, solutos, nutrientes, proteínas y drogas. Es decir, en términos de transporte transmembranal, son muy parecidos y presentan también propiedades eléctricas similares. Esta última característica les confiere en cultivo la resistencia eléctrica transepitelial (RTE), que distingue a cada línea celular y es un indicador de la formación de monocapas celulares herméticas.

El presente trabajo consistió de dos etapas: En la primera nos propusimos implementar el modelo de transporte, y durante la segunda etapa pusimos a prueba nuestra hipótesis.

Desarrollo del modelo experimental. Para estudiar transporte a través de monocapas crecidas sobre soportes permeables (insertos) es necesario tener monocapas íntegras. Por esta razón, establecimos como primer objetivo la determinación del tiempo requerido para que las células formaran una monocapa uniformemente polarizada, con uniones herméticas bien formadas. Un indicador de que las monocapas celulares están íntegras, es la medición de la RTE. Nosotros utilizamos un ohmetro (Millicell-ERS, *Millipore*) para estas mediciones y encontramos que con inóculos de 400,000 células/cm², a los ocho días de cultivo, las células alcanzaron 53 Ω/cm², que correspondió al valor más alto de RTE en nuestras condiciones de trabajo (*Ver Fig. 6*). Este valor está dentro del rango reportado para monocapas íntegras de células OK, que lo sitúan en 41 Ω/cm² (Schwegler *et al*, 1989) y 63 ±15 Ω/cm² (Hori *et al*, 1993). A los nueve días de cultivo se observa una caída brusca en los valores de RTE que aún y cuando podrían caer dentro del rango permitido reportado por otros investigadores, nosotros sistematizamos el protocolo experimental para ser efectuado al tener el valor máximo más cercano a 53 Ω/cm².

El siguiente objetivo fue validar nuestro modelo. Para ello utilizamos [³H]-inulina como marcador de flujo paracelular. La inulina es un polisacárido de 5 kDa que no es

transportado transepitelialmente por las células OK, sino que se difunde entre los espacios paracelulares, esto es debido a que la inulina no se une significativamente a la membrana luminal y además las membranas celulares son impermeables a este compuesto, por este motivo, la usamos como testigo negativo (Hyung *et al*, 1984; Gang Yuan *et al*, 1991).

Para efectuar la comprobación experimental, hicimos pasar una cantidad conocida de radiactividad a través de insertos con una monocapa bien formada de células, y por separado en insertos sin células. Como esperábamos, en función del tiempo de incubación, la [³H]-inulina pasó libremente a través de los insertos sin células. Por otro lado, los insertos con monocapas de células crecidas sobre ellos impidieron su difusión (Ver Fig 8)

Considerando que: a) según el principio de difusión simple, el transporte pasivo es independiente del tamaño, pero dependiente del gradiente de concentración y, b) en una monocapa existen numerosos espacios paracelulares, nosotros utilizamos el concepto ampliamente aceptado que postula que si se adicionan solutos en concentraciones equimolares, por ejemplo de [¹³¹I]-SAB y [³H]-inulina, ambos compuestos difunden a la misma velocidad por estos espacios. Esto nos permitió restar la masa de inulina que difundió paracelularmente, de la masa total de albúmina que se transportó por vía transepitelial durante los experimentos de transporte, para conocer la cantidad neta de masa equivalente de [¹³¹I]-SAB que fue transportada transcelularmente.

Con respecto a los experimentos de transporte, encontramos que las células OK fueron capaces de incorporar en función del tiempo [¹³¹I]-SAB y de transportar hasta la cara basolateral de los epitelios, péptidos y aminoácidos (*equivalente radiactivo*) que provenían de la SAB original. Esto lo establecimos debido a que al hacer un análisis del medio correspondiente a la cara basolateral de las monocapas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, y revelar los resultados por autorradiografía no encontramos la banda correspondiente a la molécula de seroalbúmina. Considerando que ya había sido

reportado que en sistemas de túbulo aislados y riñones completos perfundidos, los productos de la hidrólisis intralisosomal no solo de la albúmina, sino de otras proteínas, son péptidos y aminoácidos (Hyung, 1988), la explicación más razonable fue que la seroalbúmina bovina había sido degradada al pasar por los compartimentos endocíticos de las células OK. Para corroborar esto, diseñamos un experimento de cromatografía en papel, en el cual mezclamos el medio del compartimento basolateral con un estándar de 19 aminoácidos. Una vez revelada la cromatografía con ninhidrina, encontramos que las manchas de los aminoácidos estaban asociadas con la muestra experimental y además el origen (donde no hubo aminoácidos libres) estaba fuertemente marcado (*Ver Fig. 12*). Concluimos que el ^{131}I estaba asociado a distintos aminoácidos y quizá péptidos que se quedaron en él. Para comprobar esta última posibilidad, digerimos con tripsina una cantidad conocida de seroalbúmina y encontramos nuevamente una mancha radiactiva en el origen (*Ver Fig. 13*). Lo anterior nos permite establecer que las células OK toman la SAB por el extremo apical, la internalizan selectivamente y la degradan hasta péptidos y aminoácidos, después la exportan por el extremo basolateral. Con estos experimentos encontramos que la SAB es degradada durante su transporte. Lo que nosotros observamos en este trabajo se ha descrito en modelos de túbulo aislados de riñón de conejo (Clapp *et al*, 1988) y riñones completos perfundidos de rata (Sumpio y Maack, 1982; Camargo *et al*, 1984) donde proteínas como lisozima, hormona del crecimiento humano, β -2-microglobulina y citocromo C también son digeridas y los aminoácidos que se liberan son regresados a la circulación. La velocidad de la hidrólisis puede variar de unos pocos minutos a varias horas o días, dependiendo de la sensibilidad de la proteína a las proteasas lisosomales. Además del catabolismo lisosomal, que es ampliamente aceptado como la principal ruta de eliminación de las proteínas reabsorbidas, algunos autores han postulado que éstas podrían ser transportadas intactas del lumen tubular a los capilares peritubulares (Maack y Kinter, 1969; Maack *et al*, 1971). Esta hipótesis ha sido refutada por estudios más recientes que demuestran que el transporte tubular de proteínas, si existe como un todo, es insignificante comparado con la vía catabólica (Christensen y Maunsbach, 1973; Ottosen y Maunsbach, 1973; Ottosen *et al*, 1979).

Desde el punto de vista cuantitativo, las células OK transportaron transepitelialmente 18 pmoles/cm² del equivalente de [¹³¹I]-SAB a los 90 min de incubación, en cambio, para la inulina, que atraviesa los epitelios por vía paracelular, pero no por vía transcelular, fue equivalente a 1.5 pmoles/cm², mostrando una meseta desde los 45 minutos (*Ver Figura 9*). Para determinar la cantidad total del equivalente de [¹³¹I]-SAB transportada a diferentes tiempos (vías transcelular y paracelular) restamos la cantidad total de [³H]-inulina transportada (vía paracelular) a tiempos equivalentes de incubación. Con ello estimamos la cantidad neta de [¹³¹I]-SAB por vía transcelular, un procedimiento válido, según otros autores (Fouda *et al*, 1989).

Como esperábamos, la difusión de inulina fue muy pequeña y representa aproximadamente el 2.6 % de la masa inicial adicionada a las monocapas. Esta masa de inulina detectada por nosotros no se debió a un transporte activo, por las razones antes señaladas. Puede haber dos explicaciones para su presencia en estos experimentos: a) que la [³H]-inulina se haya quedado unida inespecíficamente a la superficie de los epitelios o que este compuesto haya sido atrapado entre los espacios paracelulares o b) que haya sido internalizada al estar disuelta en el líquido englobado por las vesículas endocíticas (pinocitosis de líquidos). Este último fenómeno es ampliamente conocido. Lo más probable es que nuestros resultados hayan sido una combinación de las dos posibilidades arriba señaladas y no fueron inesperados.

Con respecto al transporte de seroalbúmina este fue del 32 %. En un modelo similar, pero utilizando monocapas de células endoteliales de aorta de bovino, la cantidad de albúmina transportada también se incrementó con el tiempo y fue de un 30% a los 60 minutos (Antohe *et al*, 1993). Otro de los aspectos del transporte transepitelial de seroalbúmina que determinamos en este trabajo fue la dirección del proceso. Encontramos que ocurre principalmente en sentido apical-basolateral (*Ver Fig. 10*). Al restar el flujo paracelular correspondiente a inulina (y que refleja a la albúmina que pudo haber pasado por los espacios paracelulares), se torna insignificante el transporte

basolateral-apical. Antohe *et al* (1993) mencionan que en epitelios de aorta de bovino la albúmina se transporta también en sentido apical-basolateral.

Efecto de concentraciones variables de HgCl₂ sobre el transporte de [¹³¹I]-SAB. Esta última fase del trabajo consistió de dos partes: a) determinación del efecto del mercurio sobre la viabilidad de las células OK y sobre la integridad de las monocapas y b) análisis del efecto del HgCl₂ sobre el transporte de [¹³¹I]-SAB. Las concentraciones de cloruro mercúrico a emplear se seleccionaron de acuerdo con la experiencia de otros autores (Nakazawa *et al*, 1975; Aleo *et al*, 1992; Bohets *et al*, 1995), nosotros encontramos reproducibles las dosis consideradas como subtóxicas y citotóxicas (*Ver Fig. 14*). Esto lo determinamos mediante un ensayo colorimétrico que mide la viabilidad celular en base a la reducción del sustrato MTT por las enzimas deshidrogenasas presentes en células vivas (Mosmann, 1983).

La observación microscópica de los cultivos tratados con las dosis de prueba demostró que las monocapas se rompen con dosis mayores a 20 μM de HgCl₂, sin embargo, con 5 μM las células tienden a redondearse ligeramente. Por este motivo, medimos el efecto del metal sobre la resistencia eléctrica transepitelial. Encontramos que los valores de RTE disminuyen conforme se aumenta la concentración de mercurio y que el efecto es medible aún a dosis consideradas como subtóxicas (*Ver Fig. 15*). La medición de la caída de RTE resultó ser más sensible que la medición de la reducción de MTT. El efecto inicial podría entonces ocurrir a nivel de las uniones herméticas en los epitelios celulares, y reflejarse en el daño celular directo propuesto por algunos autores como parte del mecanismo promotor de daño *in vivo* (Hook y Hewitt, 1986). Con estos resultados, nosotros consideramos que la medición de RTE en modelos de cultivo celular como el aquí descrito, podría constituir una prueba útil para conocer las dosis de otros agentes nefrotóxicos que son capaces de producir una lesión renal en los túbulos contorneados proximales, o tal vez podría aplicarse a otros tipos de células para evaluar el posible efecto sobre el órgano del cual provienen. En cuanto al efecto del mercurio sobre el

transporte transepitelial de seroalbúmina en nuestro modelo, éste se inhibe con dosis consideradas subtóxicas (*Ver Figura 16*).

CONCLUSIONES

- 1.- Las células OK forman monocapas con RTE de 50-53 Ω/cm^2 a los ocho días de incubación, a partir de inóculos de 240,000 células por inserto.
- 2.- Las células OK transportan seroalbúmina bovina en sentido apical-basolateral. El transporte fue de 18 picomoles/ cm^2 a los 90 min y corresponden al 32% de la masa total adicionada.
- 3.- Los productos de hidrólisis de la seroalbúmina corresponden principalmente a péptidos y aminoácidos.
- 4.- Las monocapas de células OK son un buen modelo celular *in vitro* para estudiar el transporte de proteínas, porque se conserva la polaridad de transporte que tienen los túbulos contorneados proximales en el riñón completo.
- 5.- El transporte de seroalbúmina es sensible a la dosis de HgCl_2 .
- 6.- Dosis de 0 a 20 μM de HgCl_2 son subletales.
- 7.- Las dosis subletales producen una caída notable de la RTE, desde 51 hasta 23 Ω/cm^2 .
- 8.- La medición de la RTE es un parámetro más seguro y sensible que la determinación de la reducción del MTT.
- 9.- Dosis mayores de 10 μM de HgCl_2 producen una clara inhibición del transporte transepitelial de la SAB.
- 10.- La medición de la resistencia transepitelial en monocapas celulares tratadas con dosis variables de HgCl_2 es una prueba directa que sirve para evaluar daño celular.

11.- Mediante el modelo *in vitro* que hemos implementado es posible reconocer daño a las células de riñón a dosis de HgCl₂ consideradas subtóxicas.

12.- Los epitelios *in vitro* de células OK representan un buen modelo celular, sensible y preciso para analizar los efectos tóxicos de mercurio con dosis muy pequeñas del metal.

13.- El potencial efecto nefrotóxico de cualquier xenobiótico puede ser relacionado con su efecto sobre el transporte de seroalbúmina en epitelios de células OK.

PERSPECTIVAS

Debido a que actualmente se utilizan diferentes modelos, pero principalmente celulares para buscar biomarcadores para diversos padecimientos, nos propusimos como objetivo principal demostrar que la albúmina, la proteína más abundante del plasma, podría servir como un predictor de daño renal. Postulamos que el transporte de seroalbúmina, utilizando el modelo descrito, podría ser un parámetro útil para evaluar el efecto tóxico del mercurio a nivel de los túbulos proximales y posiblemente de otros agentes con potencial nefrotóxico, antes de que ocurra daño renal severo.

En la hipertensión arterial, la diabetes mellitus o intoxicaciones por mercurio, cadmio, plomo, disolventes orgánicos o medicamentos como los salicilatos, se puede producir un daño renal desde leve hasta muy severo (Hook y Hewitt, 1986). Varias proteínas de alto o bajo peso molecular presentes en la orina se usan ampliamente en la clínica como biomarcadores de daño renal (Piscator, 1989). Además, el tipo de proteínas detectadas en la orina permite saber si el daño ocurrió a nivel del glomérulo o de los túbulos contorneados proximales. La presencia en orina de proteínas de peso molecular mayor a 70 kDa o un porcentaje alto de albúmina (mayor al 20% del total de las proteínas detectadas en orina) son indicativas de lesiones a nivel del glomérulo (Schegler, *et al*, 1991); en tanto que, la presencia de proteínas de bajo peso molecular indican lesión del túbulo contorneado proximal (Mogensen, 1996). Por otro lado, la presencia de proteínas lisosomales, como la N-acetil- β -D-glucosaminidasa, se debe a que las membranas lisosomal y plasmática de las células de la nefrona han sido lesionadas (Herrera, 1994).

De lo anterior se deduce que el análisis de las proteínas urinarias es una prueba clásica que permite estudiar la nefrotoxicidad de diversos agentes en animales de experimentación. Una evaluación basada en la determinación de proteínas totales provee poca información acerca del sitio y naturaleza de la lesión. Por lo tanto, el análisis se complementa con la especiación de las proteínas urinarias con ayuda de técnicas cromatográficas o electroforéticas. La cuantificación inmunoquímica de proteínas urinarias individuales tales como β -2-microglobulina o albúmina raramente se utilizan, aún y cuando son la aproximación más eficiente para detectar y localizar lesiones renales (Bernard, 1991).

Las proteínas urinarias representan un marcador muy sensible para la detección temprana en el ser humano o en animales, de la interferencia de xenobióticos con la estructura o función renal. Sin embargo, es importante remarcar que a diferencia de las pruebas de función renal, no necesariamente reflejan procesos patológicos que comprometen la capacidad funcional de los riñones, sino que en algunas ocasiones, pueden reflejar cambios bioquímicos, fisiológicos o farmacológicos, los cuales no necesariamente implican pérdida de la función o integridad estructural del tejido renal (Bernard, 1991).

De acuerdo con esto, la utilidad y valor predictivo de cada prueba de escrutinio renal debe ser definida de acuerdo a cada situación por experimentación y cuando sea posible por estudios prospectivos sobre poblaciones en riesgo.

Según la experiencia de un investigador de nuestro grupo (González-Ramírez, D., datos no publicados) las personas ocupacionalmente expuestas, con síntomas leves de intoxicación por mercurio no presentan proteinuria evidente con métodos convencionales. Esto puede deberse a que, a pesar de que el riñón esté siendo afectado, los métodos empleados no tienen la suficiente sensibilidad para detectar microconcentraciones de proteínas. Posiblemente en las fases muy tempranas del cuadro de intoxicación por mercurio aparecen en orina albúmina y ciertas proteínas de bajo peso molecular por inhibición del mecanismo de reabsorción de proteínas, pero no necesariamente porque ya hubo una destrucción de los túbulos contorneados, sino porque los receptores específicos de las células tubulares han perdido afinidad por ellas. Nuestra suposición se apoya en que existe un transporte selectivo, dependiente de la constante de afinidad (T_m) de proteínas a nivel tubular (Sumpio y Maack, 1982) y en que el mercurio se combina con grupos sulfhidrilo que inhiben gran cantidad de enzimas (Hook y Hewitt, 1986) los cuales podrían interferir con la unión de las proteínas con sus receptores, en una forma selectiva.

Aunque los modelos *in vitro* son utilizados cada vez más frecuentemente, es importante destacar que, si bien son útiles para el ensayo de compuestos químicos, no sustituyen totalmente a los animales de laboratorio. Esto se debe a que los cultivos celulares *in vitro* son en realidad una sobresimplificación de los modelos animales para estudios farmacológicos y toxicológicos, lo cual en muchas ocasiones impide hacer extrapolaciones directas de datos obtenidos *in vitro* a lo que sucede *in vivo* (Jain, 1987).

De cualquier modo, en el mundo existe una fuerte presión para que se usen lo menos posible animales de laboratorio para investigación, por razones éticas, técnicas y económicas.

Por todo lo anterior, la propuesta inicial de implementar un modelo celular que permitiera identificar una proteína que sirviera como marcador temprano de intoxicación renal por mercurio, se cumplió. El modelo empleado resultó mucho más sensible que los convencionales y representa en nuestro laboratorio una alternativa al uso de los animales de experimentación. También permitirá identificar nuevos biomarcadores de intoxicación renal y por otro lado, es una buena alternativa para el estudio de efectos tóxicos de diversas sustancias, sin necesidad de sacrificar animales de laboratorio.

Este mismo modelo también podría funcionar con cultivos establecidos a partir de órganos distintos del riñón para estudiar aspectos de fisiología, bioquímica, farmacología, evaluación de tratamientos terapéuticos, búsqueda de nuevos medicamentos e investigación de nuevos biomarcadores, entre otras aplicaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adolphe, M.** (1995). Alternative methods to animal experimentation. Scientific and ethical problems. *Bull Acad Ntl Med* 179; 1009-1016.
- Aleo, M. D.; Taub, M. L.; Kostyniak, P. J.** (1992). Primary cultures of rabbit renal proximal tubule cells. III. Comparative cytotoxicity of inorganic and organic mercury. *Toxicol Appl Pharmacol* 112: 310-317.
- Antohe, F.; Dobrila, L.; Heltianu, C.; Simionescu, N.; Simionescu, M.** (1993). Albumin-binding proteins in the receptor-mediated binding and transcytosis of albumin across cultured endothelial cells. *European Journal of Cell Biology* 60,268-275
- Aposhian, H.V.; Maiorino, R.M.; González-Ramírez, D.; et al** (1995). Mobilization of heavy metals by newer therapeutically useful chelating agents. *Toxicology* 97:23-38.
- Bekersky, I.** (1983). Use of the isolated perfused kidney as a tool in drug disposition studies. *Drug Metab Rev* 14:931-960.
- Bernard, A.; Viau, C.; Ouled, A.; Lauwerys, R.** (1987). Competition between low and high molecular weight proteins for renal tubular uptake. *Nephron* 47:115.
- Bernard, A.; Viau, C.; Ouled, A.; Lauwerys, R.** (1988). The renal uptake of proteins: a non-selective process as evidenced by competition experiments in conscious rats. *Kidney Int* 34:175.
- Bernard, A.; Lauwerys, R.** (1991). Proteinuria: Changes and mechanisms in toxic nephropaties. *Crit Rev in Toxicol* 21(5):373-404.
- Berndt, W. O.** (1994). Role of Transport in Chemically-Induced Nephrotoxicity, pp. 235-246. En: *Mechanisms of Injury in Renal Disease and Toxicity*. Editado por Robin S. Goldstein. CCR Press Inc. Boca Raton, USA.

Bohets, H. H.; Van Thielen, M. N.; Van der Biest, I.; et al. (1995). Cytotoxicity of mercury compounds in LLC-PK₁, MDCK and human proximal tubular cells. *Kidney Int* 47:395-403.

Boogaard, P. J.; Nagelkerke, J. F.; Mulder, G. J. (1990). Renal proximal tubular cells in suspension or in primary culture as *in vitro* models to study nephrotoxicity. *Chem Biol Interact* 76:251-292.

Brodersen, R. (1978). Binding of bilirubin and other ligands to human serum albumin. En: Albumin: structure, biosynthesis and function. pp. 61. Editado por I. Sjoholm y T. Peters. Pergamon Press, Oxford.

Bruggeman, I. M.; Mertens, J. W. M.; Temink, J. H. M. et al. (1989). Use of monolayers of primary rat kidney cortex cells for nephrotoxicity studies. *Toxicol In Vitro* 3: 261-269.

Buchet, J. P.; Roels, H.; Bernard, A.; Lauwerys, R. (1980). Assessment of renal function in workers exposed to inorganic lead, cadmium and mercury vapor. *J Occup Med* 22:741-750.

Camargo, M. S. F.; Sumpio, B. E.; Maack, T. (1984). Renal hydrolysis of absorbed protein: influence of load and lysosomal pH. *Am J Physiol* 247: F656-F664.

Carone, F. A.; Peterson, D. R.; Oparil, S.; Pullman, T. N. (1979). Renal tubular transport and catabolism of proteins and peptides. *Kidney Int* 16: 271-278.

Clapp, W.L.; Hyung, P.C.; Madsen, K. M.; Tisher, C. C. (1988). Axial heterogeneity in the handling of albumin by the rabbit proximal tubule. *Laboratory Investigation* 58(5):549-558.

Corvol, P.; Bardin, C. W. (1973). Species distribution of testosterone binding globulin. Biol Reprod 8:277-284.

Chiu S.H. (1993). The use of *in vitro* metabolism studies in the understanding of new drugs. J Pharmacol Toxicol Methods 29:77-83

Christensen, E. I.; Maunsbach, A.B. (1974). Intralysosomal digestion of lysozyme in renal proximal tubular cells. Kidney Int (6): 396-402.

Dennis, V. W.; Robinson, R. R. (1985). Proteinuria. pp. 1805-1816. En: The kidney: Physiology and Pathophysiology. Editado por D. W. Seldin y G. Giebish. New York. Raven.

Diamond, J. (1977). The epithelial junction: bridge, gate and fence. Physiologie 20:10-18.

Druet, P.; Bellon, B.; Sapin, C. et al. (1982). Nephrotoxin induced changes in kidney immunobiology with special reference to mercury induced glomerulonephritis. En: Nephrotoxicity assessment and pathogenesis. pp 206-221. Editado por Bach, P. H.; Bonner, F. W.; Bridges, J. W. y Lock, F. A. New York, John Willey and Son.

Ellis, B. G.; Price, R. G.; Thopam, J. C. (1973). The effect of tubular damage by mercuric chloride on kidney function and some urinary enzymes in the dog. Chem Biol Interact 7:101-113.

Ellis B. G.; Price, R. G. (1975). Urinary enzyme excretion during renal papillary necrosis induced in rats with mercury chloride. Chem Biol Interact 11:473-482.

- Fouda, Abdel-Kader; Christine Fauth; Francois Roch-Ramel. (1989).** Transport of organic cations by kidney epithelial cell line LLC-PK₁. *Pharmacology and Experimental Therapeutics* 252:286-292
- Fowler, B. A. (1972).** The morphologic effects of dieldrin and methyl mercuric chloride on *pars recta* segments of rat kidney proximal tubules. *Am J Pathol* 69: 75-89.
- Fracker, P. J.; Speck, J. C. Jr. (1978).** Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-Tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycoluril. *Biochem Biophys Res Commun* 80(4):849-857.
- Gang, Yuan; Ott, J. R.; Salgado, C. ; Giacomini, K. M. (1991).** Transport of organic cations by a renal epithelial cell line (OK). *J. Biol Chem* 266(14):8978-8986.
- Ganote, C. E.; Reimer, K. A.; Jennings, R. B. (1975).** Acute mercuric chloride nephrotoxicity: An electron microscopic and metabolic study. *Lab Invest* 31: 633-647.
- Gauthier, C.; Nguyen-Simonnet, H.; Vincent, C. (1984).** Renal tubular absorption of β -2 microglobulin. *Kidney Int* 26:170-178.
- Goldwater, J. L.; Stopford, W. (1977).** Mercury. pp 38-63. En: *The Chemical Environment*. Editado por J. Lenihan y W. W. Fletcher. Blackie & Son, Ltd., London.
- Gotelli, C. A.; Astolfi, E.; Cox, C.; et al. (1985).** Early biochemical effects of an organo-mercury fungicide on infants: "Doses makes the poison". *Science* 227:638-640.
- Gotloib, L.; Shostak, A. (1995).** Endocytosis and transcytosis of albumin gold through mice peritoneal mesothelium. *Kidney Int* 47: 1274-1284.

Goyer, R. A. (1986). Toxic effects of metals. pp 605-608. En: Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Editado por Curtis D. Klaassen, Mary O. Amdur and John Doull. Macmillan Publishing Company, New York.

Grossman, R. H.; Hamilton, R. W.; Morse, B. M.; et al. (1974). Non-traumatic rhabdomyolysis and acute renal failure. *New Engl J Med* 291:807.

Gumbiner, B.(1987). Structure, biochemistry , and assembly of epithelial tight junctions. *Am. J. Physiol.* 253:C749-C758.

Guyton, A. C. (1988). Tratado de Fisiología Médica. 7ª edición. Editorial Interamericana. Mc Graw-Hill. pp 392-420.

Hall, J. L.; Baker, D. A. (1982). Membranas celulares y transporte de iones. 1ª Edición en Español. Compañía Editorial Continental, S. A. de C.V. , México pp 11-20.

Handler, J. S. (1986). Studies of kidney cells in culture. *Kidney Int.* 30: 208-215.

Herrera, G. A. (1994). Low molecular weight proteins and the kidney: Physiologic and pathologic considerations. *Ultrastruct Pathol* 18:89-98.

Hook, J. B.; Hewitt, W.R. (1986). Toxic responses of the kidney. En: Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Tercera edición. Klaassen C.D.; Amdur, M.O.; Doull, J. (eds). Macmillan Publishing Company, New York. Pp 310-329.

Hori, R.; Okamura, M.; Takayama, A.; et al. (1993). Transport of organic anion in the OK kidney epithelial cell line. *Am Physiol Soc* F975-F980.

Hultman, P.; Enestrom, S. (1986). Localization of mercury in the kidney during experimental acute tubular necrosis studied by the cytochemical Silver Amplification Method. *Br J Exp Pathol* 67: 493-503.

Hutter, J. F.; Piper, H. M.; Spieckermann, P. G. (1984). Myocardial fatty acid oxidation: evidence of albumin-receptor-mediated membrane transfer of fatty acids. *Basic Res Cardiol* 79: 274-282.

Hyung Park, C. and Maack T. (1984). Albumin absorption and catabolism by isolated perfused proximal convoluted tubules of the rabbit. *J Clin Invest* 73:767-777.

Hyung Park, C. (1988). Time course and vectorial nature of albumin metabolism in isolated perfused rabbit PCT. *Am J Physiol* 255 :F520-F528.

Iesato, K.; Wakashin, M.; Tojo, S. (1977). Renal tubular dysfunction in Minamata disease. *Ann Intern Med* . 86:731.

Joselow, M. M.; Goldwater, L. J. (1967). Absorption and excretion of mercury in man. *Arch Environ Health* 15:155-159.

Kazantzis, G.; Schiller, K. F. R.; Ascher, A. V.; et al. (1962). Albuminuria and the nephrotic syndrome following exposure to mercury and its compounds. *Quart J Med* 31:403-418.

Kinne, R. (1983). New approaches to study renal metabolism: isolated single cells. *Miner Electrolyte Metab* 9: 270-275.

Klein, R.; Herman, S. P.; Bullock, B. C.; Talley, F. A. (1973). Methyl mercury intoxication in rat kidneys. *Arch Pathol* 96: 83-90.

- Koch, K. M.** (1992). Dialysis-related amyloidosis. *Kidney Int* 41:1416.
- Koyama, H;** Goodpasture, C; Miller, M.; *et al.* (1978). Establishment and characterization of a cell line from the american opossum (*Didelphys virginiana*). *In Vitro* 14:239-246.
- Kuo, C. H.;** Hook, J. B. (1982). Depletion of renal glutathione content and nephrotoxicity of cephaloridine in rabbits, rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 63:292-302.
- Lau, S. S.;** Monkes, T. J.; Gillette, J. R. (1984). Identification of 2-bromohydroquinone as a metabolite of bromobenzene and o-bromophenol: implications for bromobenzene induced nephrotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 230:360-366.
- Lehninger, A.;** Nelson, D. L.; Cox, m. M.; (1993). Principles of Biochemistry. Segunda edición, pp 281-288. Worth Publishers, New York, USA.
- Maack, T.;** Kinter, W.B. (1969). Transport of protein by flounder kidney tubules during long term incubation. *Am J Physiol* 216: 1034-1039.
- Maack, T.;** Mackensie, D.S.; Kinter, W.B. (1971). Intracellular pathways of renal reabsorption of lysozime. *Am J Physiol* 221: 1609-1614.
- Maack, T.;** Park, C. H.; Camargo, M. S. F. (1992). Renal filtration, transport and metabolism of proteins. pp. 3005-3038. En: The kidney: Physiology and Pathophysiology. Editado por D. W. Seldin y G. Giebish. New York. Raven.
- Magos, L.;** Webb, M. (1977). The effect of selenium on the kidney uptake of methylmercury. *Arch Toxicol* 38: 201-207.

- Malström, K.; Murrer, H. (1986).** Parathyroid hormone inhibits phosphate transport in OK cells but not in LLC-PK₁ and JTC-12. P3 cells. *Am J Physiol* 251:C23-C31.
- Malström, K.; Stange, G.; Murrer, H. (1987).** Identification of proximal tubular transport functions in the established kidney cell line, OK. *Biochem Biophys Acta* 902:269-277.
- Malström, K.; Stange, G.; Murrer, H. (1988).** Intracellular cascades in the parathyroid-hormone-dependent regulation of Na⁺/phosphate cotransport in OK cells. *Biochem J* 251:207-213.
- Milici, A. J.; Watrous, N. A.; Stukenbrok, H.; Palade, G. E. (1987).** Transcytosis of albumin in capillary endothelium. *J Cell Biol* 105 (No. 6 pt. 1):2603-2612.
- Mogensen, C. E.; Solling, K. (1977).** Studies of renal tubular protein absorption: partial and near complete inhibition by certain aminoacids. *Scand J Clin Lab Invest* 37:477.
- Monks, T. J.; Lau, S. S.; Highet, R. L. et al. (1985).** Glutathione conjugates 2-bromohydroquinone are nephrotoxic. *Drug Metab Dispos* 13:553-559.
- Mosmann, T. (1983).** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application on proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Meth* 65:55-60.
- Murray, R. K. (1994).** Metabolism of xenobiotics. En: Murray, R. K.; Mayes, P. A.; Granner, D. K.; Rodwell, W. W. eds *Bioquímica de Harper* 13ª edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V., México, D.F. pp 843-849.
- Nakazawa, N.; Makino, F.; Okada, S. (1975).** Acute effects of mercury compounds on cultured mammalian cells. *Biochem Pharmacol* 24:489-493 .

NRCC (1979). Effects of mercury in Canadian Environment. National Research Council of Canada. Publication No. 16739, Ottawa, Canada.

Ottosen, P.D.; Maunsbach, A.B. (1973). Transport of peroxidase in flounder kidney tubules studied by electron microscope histochemistry. *Kidney Int* (3): 315-321.

Ottosen, P.D.; Bode, F.; Madsen, K.M.; Maunsbach, A.B. (1979). Renal handling of lysozyme in the rat. *Kidney Int* (15): 246-251.

Peterson, P. A.; Evrin, P. E.; Berggard, I. (1969). Differentiation of glomerular, tubular and normal proteinuria: determinations of urinary excretion of beta-2-microglobulin, albumin and total protein. *J Clin Invest* 48:1189.

Piscator, M. (1989). Markers of tubular dysfunction. *Toxicology letters* 46:197-204.

Porter, K. E.; Dawson, A. E. (1979). Inhibition of respiration and gluconeogenesis by paracetamol in rat kidney preparations. *Biochem Pharmacol* 28:3057-3062.

Rabkin, R.; Dahl, D. C.; Mahoney, C. A.; Tsao, T. (1989). Protein catabolism in cultured kidney cells. *Kidney Int* 36: S11-S14.

Rodier, P. M.; Kates, B.; Simons, R. (1988). Mercury localization in mouse kidney over time: Autoradiography versus silver staining. *Toxicol Appl Pharmacol* 92: 235-245.

Rosenberg, M. E.; Hostetter, T. H. (1992). Proteinuria. pp. 3039-3061. En: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. Editado por D. W. Seldin y G. Giebish. New York. Raven.

Rush, G. F.; Ponsler, G. D. (1991). Cephaloridine-induced biochemical changes and cytotoxicity in suspensions of rabbit isolated proximal tubules. *Toxicol Appl Pharmacol* 109:314-326.

Said-Fernández, S.; Carranza-Rosales, M.P; Elizondo-Herrera, A.; Vargas-Villarreal, J.; González-Ramírez, D.; Martínez-Rodríguez, H. (1997). Modelos celulares para el estudio de efectos tóxicos de fármacos y metales pesados. *Gaceta Médica de México, en prensa.*

Schwegler, J. S.; Heuner, A.; Silbernagl, S. (1986). Electrical properties of cultured renal tubular cells (OK) grown in confluent monolayers. *Pfluegers Arch* (1989); 415:183-190.

Sina, J. F.; Bean, C. L.; Noble, C. et al. (1986). Isolation and characterization of proximal tubule suspensions from rabbit kidney. *In Vitro Toxicol* 1:5-12.

Stroo, W.; Hook, J. B. (1977). Renal functions correlates of methylmercury intoxication: Interaction with acute mercuric chloride toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 42: 399-410.

Stewart, W. K.; Guirais, H. A.; Sanderson, J.; et al. (1977). Urinary mercury excretion and proteinuria in pathology laboratory staff. *Br J Med* 34:26.

Sumpio, B.E.; Maack, T.A. (1982). Kinetics, competition and selectivity of tubular absorption of proteins. *Am J Physiol* 243:F379-F-392.

Tarloff, J. B.; Goldstein, R. S. (1994). pp 149-193. *In vitro* Assessment of Nephrotoxicity. En *In Vitro Toxicology*. Editado por Shayne C. Gad. Raven Press, Ltd., New York,.

Tertelbaum, A. P.; Strewler, G.J. (1984). Parathyroid hormone receptors coupled to cyclic adenosine monophosphate formation in an established renal cell line. *Endocrinology* 114:980-985.

Trivin, F.; Giraudet, P. (1988). "Microalbuminuria or Paucialbuminuria". Clin Chem 34:209.

Van Liew, J. B.; Buentig, W.; Stolte, H.; Boylan, J. W. (1970). Protein Excretion: Micropuncture Study of Rat capsular and proximal tubule fluid. Am J Physiol 219:299-305.

Vinay, P.; Gougoux, A.; Lemieux, G. (1981). Isolation of a pure suspension of rat proximal tubules. Am J Physiol 241:F403-F411.

Ware, R. A.; Burkholder, P. M.; Chang, L. W. (1975). Ultrastructural changes in renal proximal tubules after chronic organic and inorganic mercury intoxication. Environ Res 10: 121-140.

WHO (1976). Environmental Health Criteria 1. Mercury. World Health Organization, Geneva.

WHO (1991). Inorganic Mercury Environmental Health. Criteria 118, World Health Organization, Geneva.

Zalups, R. K.; Barfuss, D. (1990). Accumulation of inorganic mercury along the renal proximal tubule of the rabbit. Toxicol Appl Pharmacol 106: 245-253.

