

La coordinación entre esfingolípidos y fosfoinosítidos es esencial para la diferenciación de las células tubulares renales

Pescio Lucila G; Santacreu Bruno J; Romero Daniela J; Francisco María N; Favale Nicolás O; Sterin-Speziale Norma B
Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. IQUIFIB – CONICET

La diferenciación de las células epiteliales se produce por maduración de la membrana apical y desarrollo de cilio primario. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la hipertonicidad extracelular induce la diferenciación de las células MDCK, una línea celular derivada de túbulos colectores renales caninos, y que en este proceso son esenciales los esfingolípidos. Por otro lado, los fosfoinosítidos, otros lípidos bioactivos, son considerados determinantes de la polaridad apico - basal, dada su ubicación en dominios específicos de membrana en células epiteliales polarizadas: con PI(4,5)P₂ localizado en el dominio apical y PI(3,4,5)P₃ en el basolateral. Esta ubicación específica es la que determina el reclutamiento de complejos importantes de polaridad, como el Par3/Par6/aPKC. PTEN es la fosfatasa que permite la formación de PI(4,5)P₂ a partir de PI(3,4,5)P₃, y su localización es esencial para la segregación de los fosfoinosítidos, transformándose en molécula pivote para definir la polaridad de los mismos. En base a la hipótesis de que los esfingolípidos y los fosfoinosítidos generan entornos lipídicos específicos para las proteínas esenciales para el proceso de diferenciación, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Analizar la distribución de la enzima PTEN en células no diferenciadas y diferenciadas y la importancia de los esfingolípidos en la localización de esta enzima y
- Estudiar el efecto de la inhibición de PTEN sobre la distribución de los fosfoinosítidos de membrana, el desarrollo de membrana apical y cilio primario.

Para ello células MDCK fueron cultivadas en condiciones de isotonicidad e hipertonicidad (300 mM NaCl) por 48 hs para inducir la diferenciación celular, y las enzimas se silenciaron con siRNA específicos o se inhibieron farmacológicamente con D-PDMP, inhibidor de Glucosilceramida Sintasa, o SF1670, inhibidor selectivo de PTEN. Los resultados de inmunofluorescencia demostraron que PTEN se acumula en la membrana apical de las células diferenciadas y que los esfingolípidos son esenciales para su correcta ubicación, dado que si se altera su síntesis PTEN se deslocaliza adoptando una distribución nucleolar. La inhibición de la actividad de PTEN indujo graves alteraciones en la diferenciación, dado que las células tratadas con SF1670 o con el siRNA de PTEN no presentaron una correcta ubicación de gp135 en la membrana apical, sino que esta proteína se encontraba acumulada en lúmenes laterales. Además, las inmunofluorescencias para tubulina acetilada, marcadora de cilio primario, demostraron que las células tratadas presentaban un menor porcentaje de células con cilio primario. La distribución de PI(4,5)P₂ se analizó en células transfectadas con el plásmido PLCδ1-PH-GFP. Los resultados de microscopía confocal demostraron que PI(4,5)P₂ se encuentra acumulado en la membrana apical junto con gp135, y que si se inhibe la actividad de PTEN el PI(4,5)P₂ remanente se ubica en los lúmenes laterales gp135 positivos. Estos resultados demuestran una importante coordinación entre esfingolípidos y fosfoinosítidos, que los hace esenciales para la diferenciación de las células MDCK.

Sesión: Lípidos y Transducción de Señales