

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 661**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2010 PCT/IB2010/003298**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO11073793**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2010 E 10810877 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2513295**

54 Título: **Método para el cocultivo tridimensional de podocitos y células endoteliales y sistema de cocultivo in vivo relacionado**

30 Prioridad:

17.12.2009 IT MI20092216

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.01.2017

73 Titular/es:

**FONDAZIONE IRCCS "CA' GRANDA - OSPEDALE
MAGGIORE POLICLINICO" (100.0%)
Via Francesco Sforza, 28
20122 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**RASTALDI, MARIA PIA y
LI, MIN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 596 661 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para el cocultivo tridimensional de podocitos y células endoteliales y sistema de cocultivo in vivo relacionado

5 La presente invención se refiere a un nuevo método de cocultivo tridimensional de podocitos y células endoteliales y a un sistema de cocultivo in vivo relacionado. Además, la invención se refiere al uso de dicho sistema de cocultivo como un modelo de cribado de fármacos o estudio in vitro de patologías que afectan a los riñones, y en particular a la barrera de filtración glomerular renal.

10 Los métodos de cultivos celulares convencionales en general se usan para definir propiedades base de tipos de células individuales. Sin embargo, las células viven en un microentorno tridimensional que influye profundamente en su función. En particular, en los glomérulos renales los podocitos se adhieren al lado externo de la membrana basal glomerular, mientras que las células endoteliales se adhieren en su lado interno. La organización tridimensional de podocitos, membrana basal y células endoteliales permite que el sistema realice la función de barrera de filtración, como se ilustra en la figura 1.

15 Cuando la barrera de filtración se daña, se pierden proteínas en la orina. Este fenómeno aparece en enfermedades principales de los diferentes componentes glomerulares, y también como consecuencia de patologías sistémicas extremadamente extendidas, tales como obesidad, diabetes e hipertensión. A pesar de los numerosos esfuerzos hechos en la investigación científica, y el avance de la investigación reciente, hay pocas explicaciones sobre la etiología y patogénesis de patologías proteinúricas con consecuencias negativas en el diagnóstico y posibilidades terapéuticas, que han quedado limitadas.

20 Por lo tanto, la posibilidad de recrear in vitro una estructura similar a la barrera de filtración sería extremadamente útil en el estudio de patologías proteinúricas y la comprensión de los mecanismos que están en la base de la pérdida de proteínas en la parte del filtro glomerular.

Sin embargo, numerosos problemas técnicos han evitado siempre la creación de este sistema, sobre todo debido a la extrema diferenciación y especialización de las células que lo componen, y probablemente la interdependencia de los diferentes componentes del propio sistema.

25 Las células que componen la barrera de filtración están, de hecho, extremadamente diferenciadas y especializadas. También es evidente que un estudio de su función no puede dejar de lado el contexto de la propia barrera debido a varios aspectos fundamentales.

30 Diferentes autores en el pasado han usado cultivos organotípicos de tejido renal en perfusión continua [1-3], pero sigue existiendo actualmente la petición de un sistema de cocultivo sencillo que reproduzca la estructura de la barrera de filtración renal.

35 Goligorsky et al. han descrito un método de cocultivo en sándwich [4,5]. La línea de podocitos usada consiste en podocitos primarios de ratas transfectados con SV-40. La línea endotelial usada es HUVEC obtenida por Clonetics Corp. Los podocitos se cultivan en el fondo de placas de 24 pocillos, y posteriormente se cubren con Matrigel (matriz extracelular, Fisher Scientific), la cual gelifica a 37°C durante 30 minutos. Después de añadir el medio, se añaden las células endoteliales a cada pocillo, completando el sándwich. Con respecto a la configuración fisiológica de la barrera de filtración, es evidente que el sistema difiere en dos elementos sustanciales: a) la célula podocito es forzada a adherirse tanto a la base del pocillo como a la matriz que lo cubre; b) no hay posibilidad de reproducir la filtración glomerular, puesto que no hay líquido sobrenadante en el lado de los podocitos. En el trabajo reciente publicado por Hirschberg R. et al. [6], el sistema de cocultivo está así compuesto: los podocitos (línea de ratón inmortalizada condicional obtenida del llamado Immortomouse) se cultivan sobre membranas colocadas en placas de 96 pocillos y se induce la diferenciación. Las células endoteliales (en este caso son células endoteliales diferenciadas partiendo de progenitores de la circulación) se cultivan en la base de pocillos en placas de 96 pocillos. Después, las membranas con los podocitos se colocan en los pocillos que contienen las células endoteliales. No está claro si la membrana reposa sobre las células endoteliales o si permanece suspendida, pero en ambos casos el sistema es claramente diferente de las condiciones fisiológicas del filtro glomerular, puesto que las relaciones espaciales entre los elementos que la forman están alteradas.

45 Se describe otro sistema de cocultivo en el documento EP1437147A1, que está principalmente diseñado para el crecimiento de células epiteliales alveolares y células endoteliales. Sin embargo, la reproducción experimental de este sistema, realizada por los autores de la presente invención de acuerdo con el método descrito en el documento EP1437147A1, no permitía reconstruir un glomérulo artificial, es decir, el sistema de cocultivo cuando se usan podocitos y células endoteliales glomerulares, en vista del hecho de que no se contempla el tratamiento previo con VEGF de las células endoteliales.

55 Waybill P. N. et al., 1997, describen un sistema de cocultivo que comprende una membrana de policarbonato para cultivar células endoteliales y musculares lisas en lados alternos de la membrana. De nuevo, no se menciona en absoluto el tratamiento previo de las células endoteliales con VEGF.

Basándose en lo que se ha indicado antes, hay una necesidad evidente de aprovechar un nuevo método de

cocultivo de podocitos y células endoteliales, y un sistema in vitro tridimensional relacionado que reproduzca, de forma simplificada pero completa, las características y relaciones espaciales del filtro glomerular, y permita la aplicación de numerosos métodos de investigación tanto a las poblaciones en el cultivo como a sus respectivos líquidos sobrenadantes, superando las desventajas de las técnicas usadas hasta ahora.

- 5 Los autores de la presente invención han establecido un nuevo método de cocultivo tridimensional de podocitos y células endoteliales, junto con el sistema de cocultivo in vitro relacionado.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención se refiere a un sistema de cocultivo in vitro de podocitos y células endoteliales, que comprende un soporte sólido que contiene un primer medio de cultivo dentro del cual una membrana semipermeable que consiste en material plástico con poros que tienen un diámetro en el intervalo de 0,3 μm a 1,2 μm , preferiblemente 1 μm , se mantiene en suspensión por un segundo soporte sólido, estando dicha membrana recubierta en ambos lados con colágeno de tipo IV, en donde en el lado inferior de la membrana se cultiva una línea de células endoteliales microvasculares de mamífero en el primer medio de cultivo y en el lado superior de la membrana se cultiva una línea de podocitos de mamífero en un segundo medio de cultivo, en donde dicha línea de células endoteliales microvasculares de mamífero se obtiene cultivándola en presencia de VEGF en una concentración de 3 a 50 ng/ml durante una semana antes de poner en placa los podocitos.

La membrana es preferiblemente poli(tereftalato de etileno) (PET). En una realización particularmente preferida de la invención, se usa la membrana Millipore (Millicell Hanging Cell Culture Insert) que tiene poros con un diámetro de 1 μm .

La línea de podocitos de mamífero preferiblemente es la línea inmortalizada obtenida de los autores de la presente invención, del ratón Immortomouse (Charles River, St Louis, MO, EE.UU.), un ratón transgénico para una variante sensible a la temperatura del "antígeno T grande de SV40" bajo el control del promotor inducible por interferón gamma H-2Kb (como se describe en [7]).

En realizaciones alternativas, la línea de podocitos puede estar mutada (es decir, mediante silenciamiento génico), o se pueden usar cultivos de podocitos primarios procedentes de animales genéticamente normales o animales transgénicos.

En una realización preferida de la invención, el soporte sólido es una placa de multipocillos. La figura 8 ilustra esquemáticamente la configuración del sistema de cocultivo de podocitos y células endoteliales dentro de un pocillo.

De acuerdo con una realización alternativa, la línea de podocitos se puede sustituir por una línea de pericitos para simular, in vitro, el sistema de pericitos y células endoteliales microvasculares que existe a nivel de todos los capilares del organismo.

De acuerdo con otra realización alternativa, el sistema de acuerdo con la invención también comprende una tercera población de células situada en el fondo del primer soporte sólido, y seleccionada de acuerdo con el tejido que se va a reproducir de células mesangiales (en el caso del glomérulo renal), fibroblastos (tejido conjuntivo), astrócitos (barrera hematoencefálica), o células parenquimatosas específicas (miocardiocitos, hepatocitos, células neuronales, etc.).

Un objeto adicional de la presente invención se refiere a un método para el cocultivo in vitro de podocitos y células endoteliales, que comprende las siguientes fases: a) cultivo de una línea de células endoteliales microvasculares de mamífero en el lado inferior de una membrana semipermeable recubierta en ambos lados con colágeno de tipo IV, que consiste en material plástico con poros de diámetro entre 0,3 μm y 1,2 μm , mantenida en suspensión dentro de un soporte sólido que contiene un primer medio de cultivo en presencia de VEGF en una concentración entre 3 y 50 ng/ml, preferiblemente 5 ng/ml, durante una semana;

b) cultivo de una línea de podocitos de mamífero en "condiciones permisivas" en presencia de interferón gamma a una temperatura de 33°C (7), durante una semana;

c) transferencia de la línea de podocitos de mamífero obtenida en la etapa b) al lado superior de la membrana de la etapa a) y cultivo en un segundo medio de cultivo en "condiciones no permisivas", en ausencia de interferón gamma a una temperatura de 37°C (7);

d) cocultivo de las dos líneas celulares en los dos entornos separados por la membrana.

Dicho soporte sólido preferiblemente es una placa de multipocillos.

De acuerdo con una realización preferida del método de la invención, dicha membrana es de PET con poros que tienen un diámetro de 1 μm . En una realización particularmente preferida de la invención, se usa la membrana Millipore (Millicell Hanging Cell Culture Insert) que tiene poros con un diámetro igual a 1 μm .

La línea de podocitos de mamífero preferiblemente es la obtenida en el laboratorio de los autores de la invención, del ratón Immortomouse (Charles River, St Louis, MO, EE.UU.), un ratón transgénico para una variante sensible a la temperatura del "antígeno T grande de SV40" bajo el control del promotor inducible por interferón gamma H-2Kb [7].

En aplicaciones alternativas, la línea de podocitos puede estar mutada (es decir, por medio de silenciamiento génico), o se pueden usar cultivos de podocitos primarios procedentes de animales genéticamente normales o animales transgénicos.

5 Cuando se usa una línea de podocitos inmortalizada condicionalmente inducible por interferón gamma cultivada durante una semana en "condiciones permisivas", en presencia de interferón gamma a 33°C, el cultivo en un segundo medio de la etapa c) en "condiciones no permisivas" tiene lugar en ausencia de interferón gamma y a 37°C.

Cuando se usa un cultivo primario, la fase inicial comprende el aislamiento de los glomérulos, que se ponen en cultivo hasta que los podocitos empiezan a crecer. Después, las células y los glomérulos se tripsinizan y los glomérulos se eliminan por filtración, para obtener el cultivo de podocitos primarios (método descrito en [7]).

10 De acuerdo con una realización preferida de la invención, la línea de células endoteliales microvasculares de mamífero es la línea murina de número en ATTC CRL-2586TM.

15 El método de acuerdo con la invención también puede comprender la introducción de una tercera línea celular en el fondo del soporte sólido, seleccionada de acuerdo con el tejido que se va a reproducir, de células mesangiales (en el caso del glomérulo renal), fibroblastos (tejido conjuntivo), astrocitos (barrera hematoencefálica), o células parenquimatosas específicas (miocardiocitos, hepatocitos, células neuronales, etc.).

De acuerdo con una realización alternativa del método de la invención, la línea de podocitos se puede sustituir por una línea de pericitos, y el medio de cultivo de la etapa a) contiene PDGF-B (factor de crecimiento específico para pericitos) en lugar de VEGF.

20 La invención también se refiere al uso del sistema de cocultivo in vivo como se ha definido antes, en un método de cribado de fármacos o sustancias adecuadas para modificar la funcionalidad del glomérulo renal, que comprende la evaluación de uno o más parámetros seleccionados de permeabilidad de la barrera capilar, morfología celular, inmunodetección de los marcadores de expresión específicos de células y marcadores liberados en los líquidos sobrenadantes de las poblaciones de células.

25 Es evidente que la ventaja de trabajar en un contexto tridimensional, incluso si está simplificado con respecto a la estructura in vivo, se debe esencialmente a la posibilidad de aplicar estímulos y variaciones en un lado de la membrana y estudiar las consecuencias producidas en el otro lado.

La evaluación de la barrera de permeabilidad se puede realizar por mediciones espectrofotométricas del paso transmembranal de proteínas o polímeros con un peso molecular definido (tal como albúmina o dextranos), también conjugados con un marcador de fluorescencia.

30 La morfología de las células del sistema de cocultivo de acuerdo con la invención o su grado de confluencia se pueden controlar fácilmente mediante microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido y de transmisión.

35 El sistema también permite la evaluación cualitativa de marcadores específicos de las dos poblaciones de células por medio de inmunocitoquímica, inmunofluorescencia y microscopía electrónica con inmuno-oro. Con el fin de evaluar cuantitativamente los marcadores de expresión anteriores también se pueden llevar a cabo métodos cuantitativos, tales como los llamados "ELISA celular" que permite obtener información de la expresión de proteínas en relación con el número de células presentes en la membrana.

Posteriormente se puede aplicar cada tipo de ensayo bioquímico o molecular (p. ej., ELISA o transferencia Western) al estudio de los respectivos líquidos sobrenadantes.

40 Finalmente, la invención se refiere al uso del sistema de cocultivo de acuerdo con la invención, como un modelo de estudio in vitro de las disfunciones o patologías que afectan a los glomérulos renales.

Por lo tanto, el sistema de cocultivo tridimensional de podocitos y células endoteliales de acuerdo con la invención, se puede aplicar eficazmente en estudios farmacológicos, en el descubrimiento de marcadores de diagnóstico, y en análisis de muestras biológicas procedentes de sujetos individuales, con la perspectiva de la personalización del diagnóstico y tratamiento.

45 La presente invención ahora se describirá con fines ilustrativos y no limitantes, de acuerdo con sus realizaciones preferidas con referencia particular a las figuras de los dibujos adjuntos, en donde:

50 La figura 1 muestra la estructura del glomérulo renal, un enmarañado de capilares glomerulares cuya membrana basal está externamente cubierta por las extensiones de los podocitos (pedicelos) e internamente por las células endoteliales, formando la barrera de filtración. Los capilares glomerulares están sostenidos por el eje mesangial, compuesto de células mesangiales y matriz extracelular.

La figura 2 muestra la imagen obtenida por microscopía óptica del sistema de cocultivo, por el cual se puede controlar la presencia de las dos poblaciones de células en los dos lados de la membrana. Se representa en la figura una sección semifina coloreada con azul de toluidina.

La figura 3 muestra la imagen del sistema de cocultivo obtenido por microscopía electrónica de transmisión. La microscopía electrónica de transmisión permite examinar los detalles morfológicos de los dos tipos de células. En la imagen es evidente la interacción entre extensiones celulares de podocitos.

5 La figura 4 muestra la imagen del sistema de cocultivo obtenido por microscopía electrónica de barrido. Con la microscopía electrónica de barrido se puede añadir más información sobre la morfología y densidad celular. En la figura se representa una imagen obtenida del lado de las células endoteliales.

La figura 5 muestra la expresión de CD31 en la parte de las células endoteliales cultivadas en cocultivo (IF, 200X) mediante inmunofluorescencia.

10 La figura 6 muestra la expresión de VCAM-1 en la parte de las células endoteliales, puestas en cocultivo con podocitos primarios procedentes de ratón que no expresa Rab3A (IHC, 400X) por inmunohistoquímica.

La figura 7 muestra las transferencias Western llevadas a cabo en cultivos de líneas de podocitos después de dos semanas de crecimiento en condiciones no permisivas. Las células diferenciadas son positivas para marcadores de podocitos específicos de células maduras.

15 La figura 8 muestra esquemáticamente el sistema de cocultivo de podocitos y células endoteliales de acuerdo con la invención.

20 La figura 9 muestra las diferencias entre células cultivadas en colágeno de tipo IV y colágeno de tipo I. La imagen muestra el cambio de fenotipo de la línea de podocitos dependiendo del tipo de colágeno en el que se han cultivado las células. Las imágenes de la izquierda son ejemplos de células cultivadas en colágeno de tipo IV: la actina se organiza en fibras de estrés que pasan a través del cuerpo celular y continúan a lo largo de las extensiones. La nefrina es expresada de forma prevalente a lo largo de las extensiones celulares. Las dos imágenes de la derecha muestran los podocitos cultivados en colágeno de tipo I. Se puede observar la reducción de fibras de estrés y el remodelado general de la actina. Además, la nefrina está exclusivamente presente en el cuerpo celular, mientras que está ausente en las extensiones celulares.

25 La figura 10 muestra la expresión de proteínas específicas de podocitos en las fases de maduración de la línea de podocitos de ratón inmortalizada condicional usada, y la acción adicional que favorece la diferenciación celular en la parte del ácido retinoico. La sinaptopodina, un marcador de podocitos presente en podocitos maduros, está completamente ausente en células cultivadas en "condiciones permisivas" (imagen de la izquierda). El positivo para la sinaptopodina es evidente en células maduras por medio de variación de temperatura y ausencia de interferón gamma (imagen del centro), y el marcador es expresado de forma más completa si las células se diferencian en presencia de ácido retinoico (imagen de la derecha).

30 La figura 11 ilustra el uso de una membrana diferente (membrana de PTFE, politetrafluoroetileno) de la seleccionada y usada de acuerdo con la presente invención.

35 Debe observarse como es menos homogénea la estructura de la membrana con respecto a la representada en las figuras 2 y 3, y previene la adhesión de la población de podocitos. Las características de no homogeneidad de la membrana y la poca resistencia a los métodos de procesamiento, son particularmente evidentes en la imagen de microscopía electrónica de transmisión.

A continuación se da un ejemplo de realización del sistema de cocultivo, objeto de la presente invención, para fines ilustrativos pero no limitantes de la presente invención.

EJEMPLO 1

40 Materiales

Se usó lo siguiente para obtener el sistema de cocultivo:

45 a) Una línea de podocitos de ratón inmortalizada condicional obtenida en el laboratorio de los autores de la invención [método descrito en 7], siguiendo con algunas modificaciones el método descrito por Mundel P. et al. [8]. En resumen, se aislaron los glomérulos de riñones de ratones transgénicos H-2K^b-tsA58 (Immortomouse, Charles River, St Louis, MO, EE.UU.) de 6-8 semanas de edad. Estos son ratones transgénicos para una variante sensible a la temperatura del "antígeno T grande de SV40" bajo el control del promotor inducible por interferón gamma H-2Kb. Los glomérulos se separaron del tejido renal mediante tamizado del tejido a través de filtros con un diámetro de poros decreciente (de 100 a 36 µm) y se cultivaron en un medio estándar a 37°C. Cuando las células podocitos empezaron a crecer, las células y los glomérulos se desprendieron por tratamiento con tripsina y los glomérulos se eliminaron por filtración. Las células se volvieron a poner en placas y se propagaron a 33°C en un medio que contenía interferón gamma de ratón recombinante 20 U/ml (llamadas "condiciones permisivas"). Después, las células se purificaron de acuerdo con el método de dilución limitante [8], es decir cultivadas en concentraciones decrecientes (10, 1, 0,1 células/vial). Los clones obtenidos se caracterizaron por inmunocitoquímica y transferencia western y solo se seleccionaron y propagaron los 5 clones que expresaban WT1 y nefrina en más de 90% de las

células. Una parte alícuota de las células de cada clon se llevó a la maduración completa, mientras que la mayor parte de las células se congelaron. La maduración se obtuvo por cultivo en "condiciones no permisivas", es decir a 37°C en un medio que no contenía interferón gamma (7).

5 Por lo tanto, esta línea de podocitos se caracteriza por una alta capacidad proliferativa cuando se lleva a 33°C en presencia de interferón gamma (llamadas "condiciones permisivas") (7). Las células, llevada a 37°C en ausencia de interferón durante aproximadamente dos semanas (llamadas "condiciones no permisivas") difieren de los podocitos maduros, teniendo extensiones celulares y expresando el panel completo de marcadores específicos de estas células, tales como nefrina, podocina, sinaptopodina, alfa-actina (figura 7).

10 Alternativamente, la línea de podocitos se puede sustituir por un cultivo de podocitos primarios. Este último ofrece la ventaja de una mejor diferenciación, lo que los hace funcionalmente más similares a la situación in vivo, y permite usar células procedentes de animales transgénicos de interés. El método usado (véase la referencia [7]) estudia el aislamiento de glomérulos de animales recién nacidos (máximo 10 días de edad) y se tomó de los métodos para obtener cultivos de neuronas primarias. Las potenciales desventajas, que deben tenerse en cuenta, están determinadas por la supervivencia celular más corta y la necesidad de una caracterización completa de las células en cada aislamiento.

15 b) Una línea de células endoteliales de ratón (EOMA-Mus musculus, ATCC-CRL-2586), caracterizada por aspectos funcionales típicos de células endoteliales microvasculares. Esto es un detalle particularmente importante, puesto que las células endoteliales microvasculares difieren en numerosos aspectos funcionales de las líneas celulares usadas habitualmente, tales como HUVEC, que derivan de endotelio venoso, o de otras líneas de derivación de vasos que tienen un calibre mayor que los capilares. Es difícil sustituir la línea celular con células glomerulares primarias, puesto que el endotelio glomerular está particularmente diferenciado y no prolifera cuando se pone en un cultivo.

20 c) Una membrana semipermeable con poros que tienen un diámetro en el intervalo de 0,3 µm a 1,2 µm, preferiblemente una membrana de PET con poros de 1 µm (Millicell Hanging Cell Culture Insert, Millipore) que se puede colocar en suspensión dentro de pocillos en las placas de cultivo, de modo que la base de la membrana está suspendida en el medio y no toca el fondo del pocillo. La selección de la membrana estaba determinada por propiedades particulares del material que la forman (PET) que es ideal para el cultivo de los tipos de células considerados en la presente memoria.

25 Se seleccionó PET puesto que es el material usado en los injertos vasculares (12). Se descartó el uso de membrana de policarbonato puesto que este material no es transparente a los microscopios (Millicell Technical Guide, 2004, Lit. No.: TN2004EN00, página 4 Millipore, [http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/2984f0525bf6e23285256e820061bd4e/\\$FILE/TN2004EN00.pdf](http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/2984f0525bf6e23285256e820061bd4e/$FILE/TN2004EN00.pdf)). El uso de una membrana de PTFE no es adecuada para los fines de la microscopía electrónica, como se indica en la figura 11.

30 Además, el mismo material ofrece diferentes ventajas tales como una mejor consistencia y resistencia cuando el sistema se saca del pocillo y es procesado por microscopía electrónica de transmisión, la mejor propiedad de cizallamiento de secciones ultrafinas (la membrana no se exfolia), y la excelente visibilidad de las células tanto en microscopía de campo brillante como en inmunofluorescencia e inmunocitoquímica.

35 El uso de un tipo diferente de membrana conduce a una serie de inconvenientes, como se representa en la figura 11.

40 d) La membrana se cubre por ambos lados con colágeno de tipo IV (12). La elección del colágeno es extremadamente importante, puesto que el colágeno de tipo IV es el que está fisiológicamente presente en membranas basales de capilares glomerulares. El uso, por ejemplo, de colágeno de tipo I, produce variaciones importantes en el fenotipo celular, como se representa en la figura 9.

Métodos

45 Cuando se ponen en los dos lados de la membrana, los dos tipos de células se cultivan en medios específicos que permiten su diferenciación y maduración. En particular, se añade factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [9] al medio de cultivo de las células endoteliales y las células endoteliales se dejan crecer solas en el lado inferior de la membrana durante una semana. Solo en este punto se añaden los podocitos en "condiciones no permisivas".

Resultados

50 El sistema concebido por la presente invención se esquematiza en la figura 8. El sistema consiste en una membrana suspendida en un pocillo de una placa para cultivos celulares. Las células endoteliales se cultivan en el lado inferior de la membrana, mientras que los podocitos se ponen en cultivo en el lado superior.

Las células endoteliales se ponen en cultivo en el lado inferior de la membrana, y se añade el factor de crecimiento VEGF al medio de cultivo en una concentración de 5 ng/ml.

- 5 Esta fase es crítica, puesto que el VEGF es producido por los podocitos en los glomérulos y las células endoteliales tienen receptores específicos de este factor de crecimiento. Los animales que no expresan VEGF tienen alteraciones endoteliales que no permiten un desarrollo normal de la estructura glomerular [10] y se ha demostrado que la adición de VEGF a líneas celulares endoteliales es capaz de producir la fenestración típica del endotelio glomerular [11].
- Después de una semana, los podocitos (mantenidos hasta este momento en "condiciones permisivas", es decir a 33°C con la adición de interferón gamma) se ponen en el lado superior de la membrana y se deja que se diferencien durante dos semanas en "condiciones no permisivas" (es decir, en ausencia de interferón y a una temperatura de 37°C).
- 10 En una variante adicional, se añade ácido retinoico al medio que cubre los podocitos sobre la membrana, que permite una diferenciación adicional de las células podocitos, haciéndolas incluso más similares tanto morfológica como funcionalmente a la célula primaria y célula in vivo (figura 10).
- El sistema está formado de modo que se mantienen separados los dos entornos celulares y los respectivos líquidos sobrenadantes. La comunicación entre los dos microentornos tiene lugar exclusivamente a través de la propia membrana.
- 15 La presencia de las células y su grado de confluencia se puede controlar fácilmente por medio de microscopía óptica (figura 2), microscopía electrónica de transmisión (figura 3) y microscopía electrónica de barrido (figura 4).
- El sistema permite el estudio de los dos componentes celulares mediante inmunofluorescencia (figura 5) e inmunohistoquímica (figura 6).
- 20 En resumen, las células se fijan en acetona fría o paraformaldehído, dependiendo de los marcadores que se van a analizar. A esto le sigue una permeabilización con Tritón, una preincubación con BSA, después las células se incuban secuencialmente con el anticuerpo primario, el anticuerpo secundario marcado, y si es necesario el sistema de detección. En este punto, la membrana se desprende del soporte y se adhiere a la placa, de modo que el tipo de células de interés está en la superficie. La placa se cubre con una placa cubreobjetos y los resultados se analizan por microscopía óptica o de fluorescencia.
- 25 También se pueden sustituir las líneas celulares indicadas en la presente memoria por células obtenidas de animales transgénicos (figura 6). Actualmente hay numerosos modelos de animales proteinúricos obtenidos por mutación de moléculas de podocitos. El sistema de cocultivo de acuerdo con la invención se puede usar de forma complementaria con respecto al estudio in vivo de animales, puesto que permite el cocultivo de podocitos primarios procedentes del modelo experimental en un sistema que reproduce la situación de la barrera de filtración in vitro.
- 30 Alternativamente, con respecto al cultivo primario procedente de animales mutados, la línea celular inmortalizada condicional usada preferiblemente en la presente memoria puede estar además mutada o silenciada para genes de interés. Se aplica lo mismo a la línea endotelial. Además, componentes modificados/mutados de la membrana basal glomerular pueden sustituir/se pueden añadir al colágeno de tipo IV, para reproducir otras situaciones patológicas.
- 35

Bibliografia

- [1] Avner ED, Vिलlee DB, Schneeberger EE, Grupe WE. An organ culture model for the study of metanephric development. *J Urol* 1983; 129: 660-664.
- [2] Avner ED, Sweeney WE Jr. Polypeptide growth factors in metanephric growth and segmental nephrin differentiation. *Pediatr Nephrol* 1990; 4: 372-377.
- [3] Kloth S, Aigner J, Kubitza M, Schmidbauer A, Gerdes J, Moll R, Minuth WW. Development of renal podocytes cultured under medium perfusion. *Lab Invest* 1995; 73: 294-301.
- [4] Chen J, Braet F, Brodsky S, Weinstein T, Romanov V, Noiri E, Goligorsky MS. VEGF-induced mobilization of caveolae and increase in permeability of endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002; 282: C1053-63.
- [5] Kim BS, Chen J, Weinstein T, Noiri E, Goligorsky MS. VEGF expression in hypoxia and hyperglycemia: reciprocal effect on branching angiogenesis in epithelial-endothelial co-cultures. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13: 2027-36.
- [6] Hirschberg R, Wang S, Mitu GM. Functional symbiosis between endothelium and epithelial cells in glomeruli. *Cell Tissue Res*. 2008; 331: 485-93.
- [7] Giardino L, Armelloni S, Corbelli A, Mattinzoli D,

Zennaro C, Guerrot D, Tourrel F, Ikehata M, Li M, Berra S, Carraro M, Messa P, Rastaldi MP. Podocyte glutamatergic signaling contributes to the function of the glomerular filtration barrier. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2009; 20:1929-40.

[8] Mundel P, Reiser J, Zúñiga Mejía Borja A, Pavenstädt H, Davidson GR, Kriz W, Zeller R: Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res* 236: 248-258, 1997.

[9] Satchell SC, Tasman CH, Singh A, Ni L, Geelen J, von Ruhland CJ, O'Hare MJ, Saleem MA, van den Heuvel LP, Mathieson PW. Conditionally immortalized human glomerular endothelial cells expressing fenestrations in response to VEGF. *Kidney Int* 2006; 69:1633-1640.

[10] Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Gerber HP, Kikkawa Y, Miner JH, Quaggin SE. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest.* 2003 Mar;111(5):707-16).

[11] Satchell SC, Tasman CH, Singh A, Ni L, Geelen J, von Ruhland CJ, O'Hare MJ, Saleem MA, van den Heuvel LP, Mathieson PW. Conditionally immortalized human glomerular endothelial cells expressing fenestrations in response to VEGF. *Kidney Int.* 2006; 69: 1633-1640).

[12] Liu Y, He T, Song H, Gao C. Layer-by-layer assembly of biomacromolecules on poly(ethylene terephthalate) films and fiber fabrics to promote endothelial cell growth. *J Biomed Mater Res* 2007; 81A: 692-704.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un sistema de cocultivo in vitro de podocitos y células endoteliales, que comprende un soporte sólido que contiene un primer medio de cultivo dentro del cual una membrana semipermeable de PET con poros de diámetro entre 0,3 μm y 1,2 μm , se mantiene en suspensión por un segundo soporte sólido, estando dicha membrana recubierta en ambos lados con colágeno de tipo IV, en donde en el lado inferior de la membrana se cultiva una línea de células endoteliales microvasculares de mamífero en el primer medio de cultivo y en el lado superior de la membrana se pone en cultivo una línea de podocitos de mamífero en un segundo medio de cultivo; en donde dicha línea de células endoteliales microvasculares de mamífero se obtiene cultivándola en presencia de VEGF en una concentración de 3 a 50 ng/ml durante una semana antes de poner en placa los podocitos.
- 2.- El sistema según la reivindicación 1, en donde dicho VEGF se añade en una concentración de 5 ng/ml durante una semana antes de poner en placa los podocitos.
- 3.- El sistema según cada una de las reivindicaciones 1-2, en donde dicha membrana tiene poros que tienen un diámetro igual a 1 μm .
- 4.- El sistema según cada una de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha línea de podocitos de mamífero está inmortalizada condicionalmente.
- 5.- El sistema según cada una de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho soporte sólido es una placa de multipocillos.
- 6.- El sistema según cada una de las reivindicaciones 1-5, que también comprende una tercera población de células en el fondo del primer soporte sólido, seleccionada del grupo que consiste en células mesangiales, fibroblastos, astrocitos y células parenquimatosas.
- 7.- Un método para el cocultivo in vitro de podocitos y células endoteliales, que comprende las siguientes etapas:
- a) cultivo de línea de células endoteliales microvasculares de mamífero en el lado inferior de una membrana semipermeable de PET recubierta en ambos lados con colágeno de tipo IV, con poros que tienen un diámetro en el intervalo de 0,3 μm a 1,2 μm , mantenida en suspensión dentro de un soporte sólido que contiene un primer medio de cultivo, en presencia de VEGF en una concentración de 3 a 50 ng/ml, preferiblemente 5 ng/ml, durante una semana antes de poner en placa los podocitos;
 - b) cultivo de una línea de podocitos de mamífero en presencia de interferón gamma a 33°C, durante una semana;
 - c) transferencia de la línea de podocitos de mamífero obtenida en la etapa b) al lado superior de la membrana de la etapa a) y cultivo en un segundo medio en ausencia de interferón gamma y a una temperatura de 37°C;
 - d) cocultivo de las dos líneas celulares en dos entornos separados por la membrana.
- 8.- El método según la reivindicación 7, en donde dicho soporte sólido es una placa de multipocillos.
- 9.- El método según cada una de las reivindicaciones 7-8, en donde dicha membrana está hecha de PET con poros que tienen un diámetro de 1 μm .
- 10.- El método según cada una de las reivindicaciones 7-9, en donde dicha línea de podocitos está inmortalizada condicionalmente.
- 11.- Método según la reivindicación 10, en donde cuando se usa una línea de podocitos inmortalizada condicionalmente inducible con interferón gamma cultivada en presencia de interferón gamma a 33°C, el cultivo en un segundo medio de la etapa c) tiene lugar en ausencia de interferón gamma y a 37°C.
- 12.- El método según cada una de las reivindicaciones 7-11, en donde bajo el punto b) se usa un cultivo primario de podocitos de mamífero.
- 13.- El método según cada una de las reivindicaciones 7-12 en donde dicha línea de células endoteliales microvasculares es la línea murina ATCC CRL-2586.
- 14.- El método según cada una de las reivindicaciones 7-13, que comprende la introducción de una tercera línea celular en el fondo del soporte sólido, seleccionada del grupo que consiste en células mesangiales, fibroblastos, astrocitos y células parenquimatosas.
- 15.- Uso del sistema de cocultivo in vitro definido según las reivindicaciones 1-6, en un método de cribado de fármacos o sustancias adecuadas para modificar la funcionalidad de glomérulos renales, que comprende la evaluación de uno o más parámetros seleccionados de permeabilidad celular, morfología celular, inmunodetección de los marcadores de expresión liberados en los líquidos sobrenadantes de las poblaciones celulares.

- 16.- Uso del sistema de cocultivo in vitro según la reivindicación 15, en donde dicha permeabilidad celular se evalúa mediante el uso de albúmina o dextranos, también marcados.
- 17.- Uso del sistema de cocultivo in vitro según la reivindicación 15, en donde la morfología celular se analiza por microscopía óptica o electrónica.
- 5 18.- Uso del sistema de cocultivo in vitro según la reivindicación 15, en donde los marcadores de expresión liberados en los líquidos sobrenadantes se detectan mediante ELISA o ensayo de transferencia Western.
- 19.- Uso del sistema de cocultivo in vitro definido según las reivindicaciones 1-6, como un modelo de estudio in vitro de las disfunciones o patologías que afectan a los glomérulos renales.
- 10 20.- Uso del sistema de cocultivo in vitro definido según las reivindicaciones 1-6, en un método de cribado de fármacos o sustancias adecuadas para modificar la funcionalidad de los glomérulos renales, que comprende la evaluación de uno o más parámetros seleccionados de permeabilidad celular, morfología celular, inmunodetección de los marcadores de expresión liberados en los líquidos sobrenadantes de las poblaciones celulares.

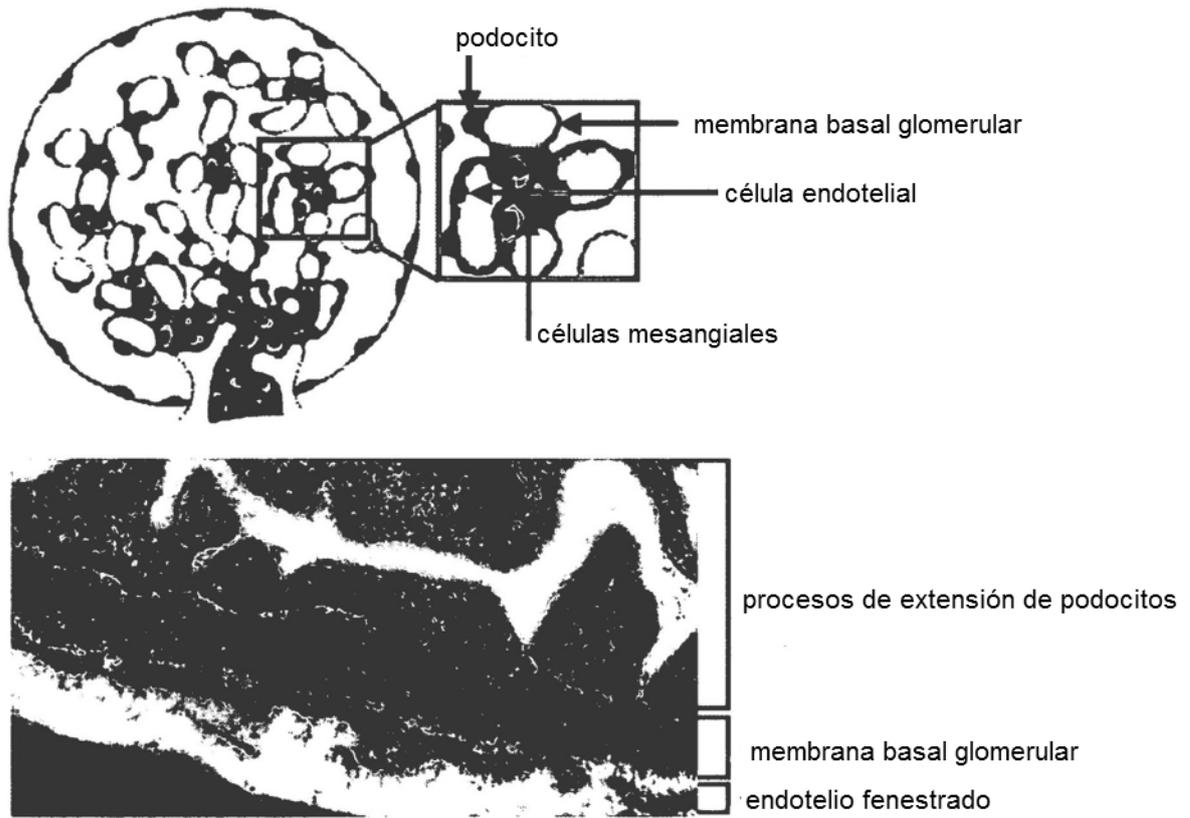


Fig. 1

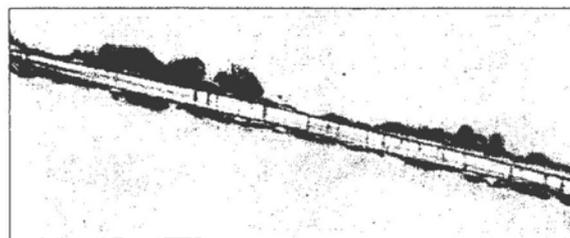


Fig. 2



Fig. 3

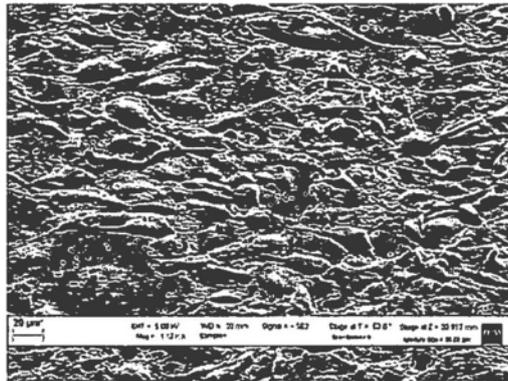


Fig. 4



Fig. 5

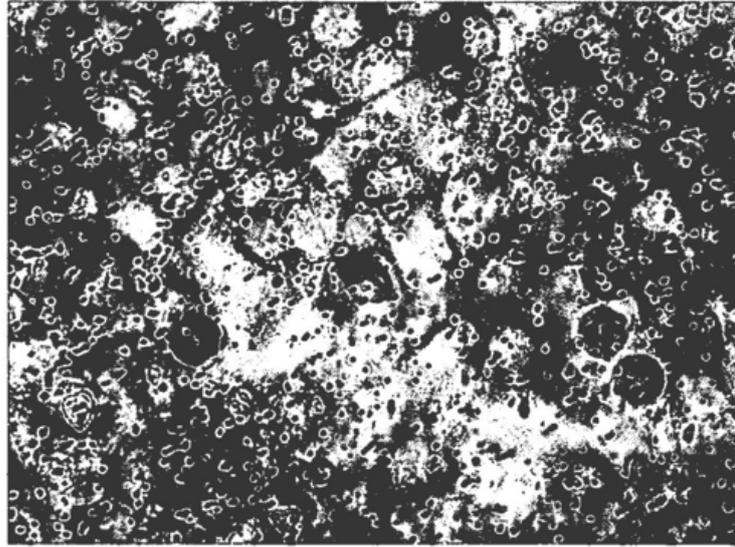


Fig. 6

podocitos inmortalizados condicionalmente MWM

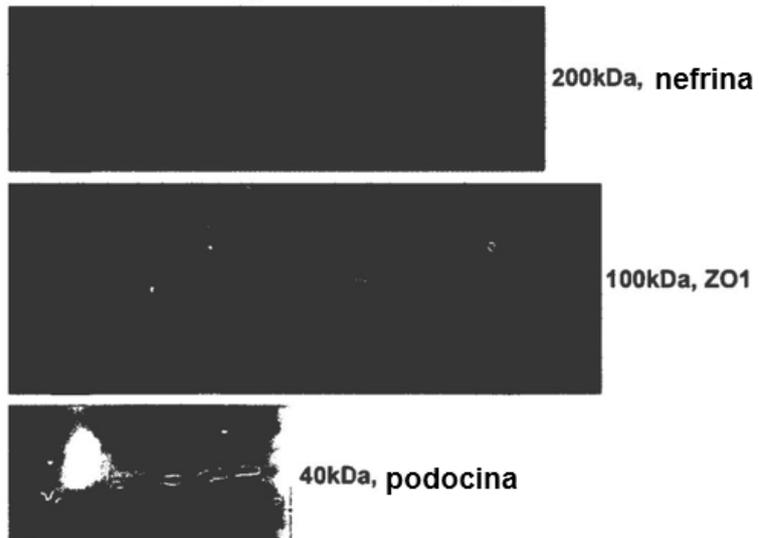


Fig. 7

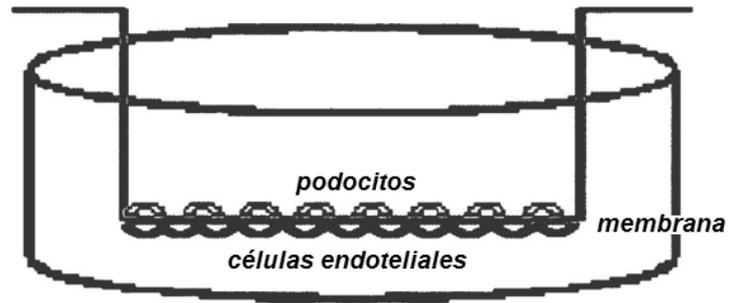


Fig. 8

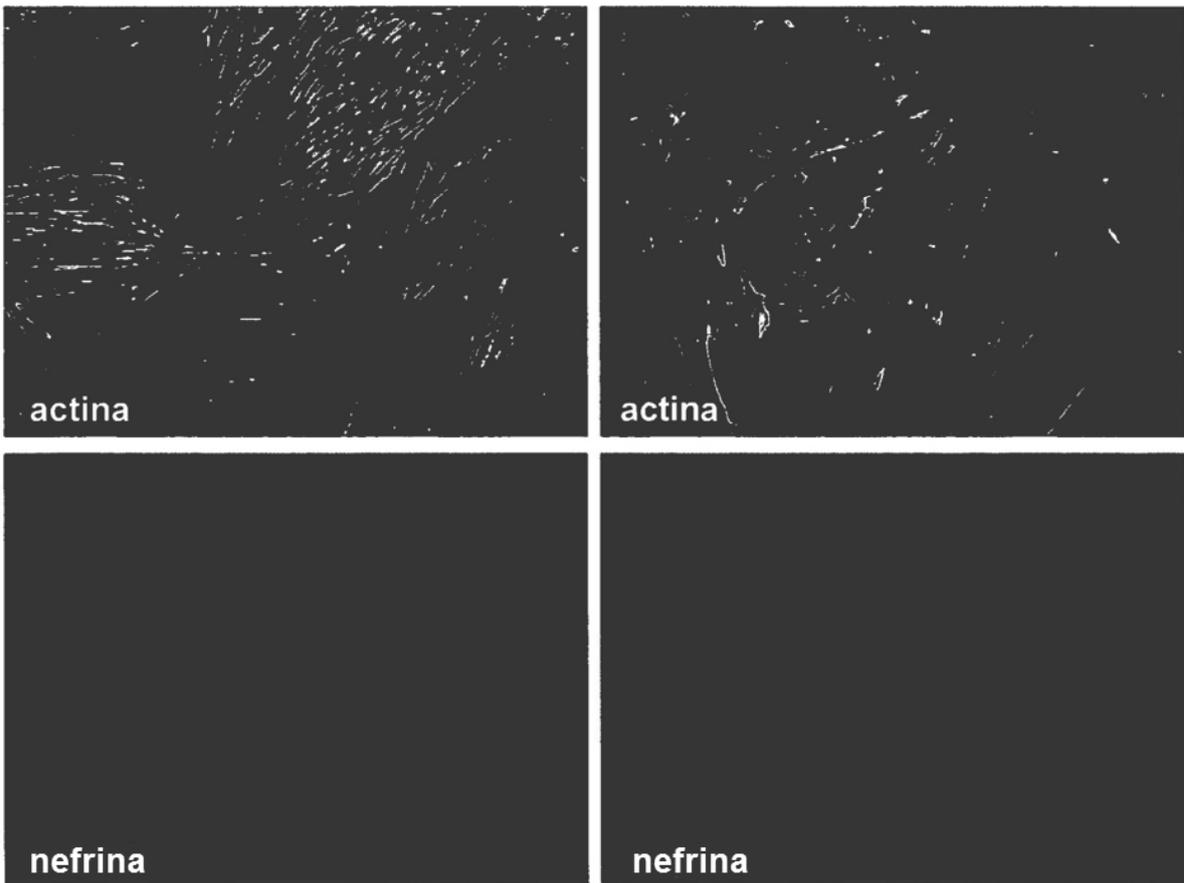


Fig. 9

sinaptopodina

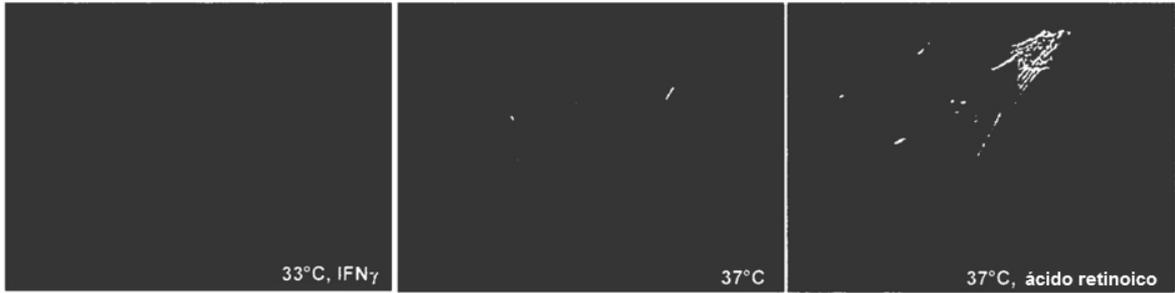


Fig. 10

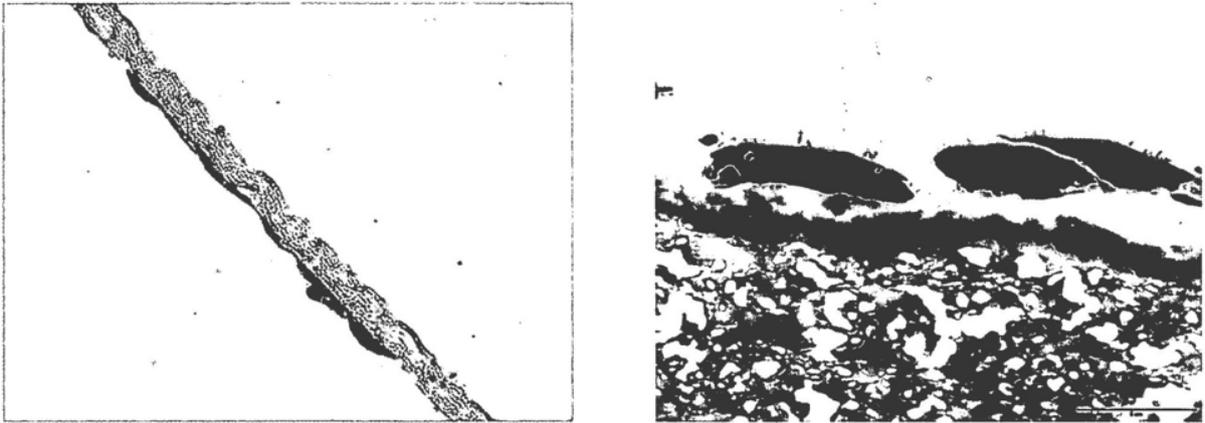


Fig. 11