**TL 8
ESTUDIO IN VITRO EN CÉLULAS DEL TÚBULO PROXIMAL RENAL PARA IDENTIFICAR EL ROL DE ALDOSTERONA EN LA LIBERACIÓN Y CARGO DE EXOSOMAS**

Eric Barros Lamus 2, David Ortiz Canales 2, Alejandra Tapia Castillo2, Carolina Valdivia Pizarro2, Fidel Allende Sanzana1, Sandra Solari Gajardo1, Alejandro Martínez Aguayo 2, Andrea Vecchiola Cárdenas 2, René Baudrand Biggs2, Carlos Salomón Gallo 3, Carmen Campino Johnson 2, Carlos Fardella Bello 4, Cristian Carvajal Maldonado 4
1Departamento de Laboratorios Clínicos, Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile, 2Departamento de Endocrinología, Pontificia Universidad Católica de Chile, 3University of Queensland, 4Pontificia Universidad Católica de Chile

**Introducción:** Los efectos fisiológicos de la vía mineralocorticoide ocurren principalmente en el túbulo colector renal; donde la aldosterona se une al receptor de mineralocorticoides (MR), y contribuye a la regulación del balance hídrico, volumen sanguíneo y la presión arterial. Existe evidencia de efectos mediados por aldosterona y el MR en células del túbulo proximal. Recientemente se han descrito potenciales mecanismos reguladores intrarenales mediados por exosomas; estos últimos son nanovesículas con capacidad de regulación autocrina y paracrina a través de su cargo (miRNAs, proteínas). Los exosomas pueden ser aislados desde distintos biofluidos (ej. orina), convirtiéndolos en potenciales biomarcadores.

**Objetivo**: Caracterizar in vitro los exosomas liberados por células del túbulo proximal renal y determinar el efecto de aldosterona en este proceso.

**Materiales y Métodos:** Células humanas del túbulo proximal (HK-2) fueron cultivadas por 24 horas en DMEM-F12-baja glucosa con suero FBS tratado (libre de esteroides y exosomas). Se determinó la expresión del MR mediante qPCR. Se aislaron exosomas del medio de cultivo de células HK-2 usando ultracentrifugación diferencial posterior a tratamientos con aldosterona (100nM) o control (DMSO) por 24 horas. Se analizó tamaño y concentración de los exosomas con Nanosight NS300, tamaño y morfología con microscopía electrónica de transmisión (TEM), y proteínas exosomales (ej. TSG101) y celulares (ej. NHE3) mediante western-blot. El RNA de origen celular y exosomal fueron aislados, cuantificados y analizados con bioanalizador TapeStation 4200 (Agilent). Las comparaciones de grupos se realizaron con t test para muestras independientes (p<0.05).

**Resultados:** Las células HK-2 mostraron características morfológicas descritas para esta línea celular, expresión del MR y del intercambiador sodio hidrógeno 3 (NHE3). El análisis por NS300 y TEM logró identificar la presencia de exosomas con tamaño (40-150nm) y forma (vesículas redondeadas y forma de dona) descritos. Además, los exosomas aislados expresan el marcador exosomal TSG101. La exposición a aldosterona presenta una tendencia de aumento en la concentración (2.34x105±2.4x104 part/ml vs 1.95x105±4.6x104 part/ml, p NS) e incrementa un 83.6% el tamaño modal (134.1±20.95nm vs 73.03±21.76nm, p<0.05) de exosomas liberados por células HK-2, respecto al control. El RNA exosomal está enriquecido en RNA pequeños (25-200 nucleótidos) y refleja el contenido de RNA de las células de origen (HK-2).

**Conclusiones:** Estos resultados preliminares sugieren que aldosterona estimula la liberación e incrementa el tamaño modal de los exosomas liberados. Asimismo que los exosomas liberados por células del túbulo proximal reflejan la expresión de RNA de la célula de origen y que están enriquecidos en RNAs pequeños.

**Financiamiento:** CONICYT-FONDECYT 1150437, 1160695, 1160638, CONICYT-FONDEQUIP EQM150023, IMII P09/16-F, CONSORCIO BMRC-CORFO 13CTI-21526-P1, SOCHED 2015-10 (ATC), Beca CONICYT-PhD (EB), CETREN-UC.