

Alodia Lacueva Aparicio

Desarrollo y comparativa de
modelos in vitro de túbulo proximal
humano que mimetizan el
microambiente físico-químico, y su
validación en ensayos de
nefrotoxicidad

Director/es

Giménez López, Ignacio
Fernández Ledesma, Luis

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

DESARROLLO Y COMPARATIVA DE MODELOS IN
VITRO DE TÚBULO PROXIMAL HUMANO QUE
MIMETIZAN EL MICROAMBIENTE FÍSICO-
QUÍMICO, Y SU VALIDACIÓN EN ENSAYOS DE
NEFROTOXICIDAD

Autor

Alodia Lacueva Aparicio

Director/es

Giménez López, Ignacio
Fernández Ledesma, Luis

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas

2023



Universidad
Zaragoza

**Desarrollo y comparativa de modelos *in vitro*
de túbulo proximal humano que mimetizan
el microambiente físico-químico, y su
validación en ensayos de nefrotoxicidad**

Autora

Alodia Lacueva Aparicio

Directores

Ignacio Giménez López

Luis Fernández Ledesma

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Departamento Farmacología, Fisiología y Medicina Legal y Forense

2022

AGRADECIMIENTOS

Después de cinco años de intenso trabajo, parece que esto está llegando a su fin. Cuando empecé la tesis no podía ni imaginarme lo que al final ha supuesto para mí, tanto a nivel profesional como personal. Ha sido un periodo de mi vida muy intenso y en parte ha sido por estar dedicándome a algo que realmente me apasiona, la investigación.

Me gustaría empezar dando las gracias a mis directores de tesis, Ignacio Giménez y Luis Fernández. Gracias por confiar en mi para llevar a cabo este proyecto. En especial quiero darle las gracias a Ignacio, que me ha guiado durante todos estos años y sin su ayuda y conocimiento esto no podría haber sido posible. Sé que esta recta final ha sido muy complicada y te agradezco de verdad el esfuerzo que has hecho para que hayamos llegado hasta aquí. También quiero agradecer a mis compañeras del CIBA, Laura, Pilar y Natacha que me hayan acompañado durante estos años en ese edificio que al principio se me hacía un poco hostil. Laura, muchas gracias por ofrecerme tu ayuda siempre, me has hecho las cosas más fáciles y eso no se me olvida. Sé que en esta recta final he estado un poco más intensa y también te agradezco el esfuerzo que has hecho para ayudarme a que esto saliese adelante. Las horas interminables en el CIBA no hubiesen sido las mismas si no hubiese tenido a mi compañera Natacha, con la que me he reído dentro y fuera del trabajo, la verdad es que no sé qué hubiese hecho sin ti allí para darme ánimos siempre y para darnos ese apoyo mutuo que al final nos reconfortaba a las dos.

No quiero olvidarme de mis compañeros del grupo TME-Lab, tanto los que ya volaron hacia otros lugares, incluso al otro lado del charco, como a los que siguen a día de hoy en el laboratorio. Mis inicios en la investigación fueron allí y quiero agradecer especialmente a Chema y María que siempre tuvieron la mejor de las predisposiciones para enseñarme cuando yo todavía estaba bastante verde, y que tuviesen la paciencia y la generosidad de sacar tiempo de donde no tenían para dedicarlo a transmitirme todo lo que habían aprendido durante sus tesis. Este último año que he vuelto a mis orígenes, al TME-Lab, he comprobado que la esencia del grupo sigue siendo la misma. El ambiente de trabajo y las personas que conforman el grupo me han hecho sentirme motivada cuando a veces las fuerzas me flaqueaban. Quiero darle las gracias a Iñaki, Sara, Clara Alcaine, Sara Abi, Marina, Esti, Laura, Claudia, Clara Bayona, Vira, Ana Rosa y Héctor por la buena energía que respiro cuando entro por la puerta y veo todos nos llevamos tan bien que es de agradecer estar en un ambiente laboral con gente con la que además te lo pasas genial. Se merecen una mención

especial las mejores tres patas para un banco que podía haber encontrado en el grupo, Tea, Sandra y Jacobo. Esas cervezas que acaban a horas intempestivas en mi terraza, intentando arreglar el mundo y no llegando al final a ninguna conclusión, han sido un bálsamo para mí. Sois geniales, y sé que, aunque pasen los años y estemos cada uno en una punta del mundo, siempre nos apoyaremos como hemos hecho hasta ahora.

Como estos años no han sido solo trabajo, también quiero aprovechar para agradecer esta tesis a mis amigas Patry, Cris, Patri, Laura, Ainhoa y Marina por todo el apoyo que me han dado, ya no solo durante este periodo que ha durado la tesis, si no siempre. Desde pequeñas nos hemos acompañado en todos los momentos posibles, tanto buenos como malos, y siempre habéis estado allí, sin excepción. Otras dos joyas de amigas, Marga y Pilar, mil gracias también por apoyarme, especialmente este último año, sois las mejores. Me siento muy afortunada por tener a las mejores amigas del mundo.

Hace ya un tiempo que mi abuelo José no está con nosotros, pero esta tesis también va por él, porque la última vez que nos vimos, que ya hace de eso unos cuantos años, me dijo que siguiera adelante con los estudios, que sabía que acabaría haciendo algo importante. Creo que, sin él saberlo, se refería a esto.

Una mención especial se merece mi hermana Paula, que me ha aguantado todo lo que no ha aguantado nadie, y ha estado allí siempre siempre siempre cuando peor lo he pasado. Sin tu apoyo este último año la verdad es que no sé qué hubiera hecho. Eres la mejor hermana del mundo. Te quiero un montón.

He dejado lo más importante para el final, el agradecimiento infinito a mis padres. Esto habría sido imposible sin vosotros. Me habéis dado la oportunidad de tener la mejor educación posible y espero haber estado a la altura. Siempre me habéis dado la libertad para elegir lo que yo he querido hacer, y aunque la investigación es un campo lleno de incertidumbre laboral, justo lo que uno no quiere para sus hijos, me habéis apoyado hasta el final y sé que seguiréis haciéndolo, sea lo que sea que elija hacer en el futuro. Os quiero mucho. Esta tesis va por vosotros, que os la habéis merecido.

¡¡Muchas gracias a todos/as!!

ÍNDICE

Abstract	1
Resumen	2
Lista de abreviaturas	3
Lista de figuras	5
Lista de tablas	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Anatomía y función del riñón.....	11
1.2. La nefrona	13
1.3. Estructura y función del túbulo contorneado proximal	15
1.4. Nefrotoxicidad.....	18
1.4.1. Antibióticos.....	20
1.4.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	20
1.4.3. Antivirales.....	20
1.4.4. Inmunosupresores.....	21
1.4.5. Agentes de contraste.....	21
1.4.6. Fármacos antineoplásicos	21
1.5. Modelos de riñón <i>in vitro</i>	23
1.5.1. Modelos simples de riñón <i>in vitro</i>	23
1.5.2. Modelos complejos de riñón <i>in vitro</i>	29
1.6. Ensayos de nefrotoxicidad con modelos simples y complejos de riñón <i>in vitro</i>	36
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO DE LA TESIS	39
2.1. Hipótesis.....	40
2.2. Objetivos de la tesis	40
2.2.1. Objetivos específicos a desarrollar en cada capítulo.....	41
3. MATERIAL Y MÉTODOS	42
3. 1. Cultivo celular	43
3.2. Protocolo de cultivo celular para la generación del modelo de tubulogénesis 2.5D .	44
3.2.1. Tubulogénesis 2.5D sobre hidrogeles de Matrigel y Colágeno I.....	44
3.2.2. Cultivo celular con lamininas L511 y L521	46
3.2.3. Tubulogénesis 2.5D directamente sobre <i>slide</i> con <i>coating</i> de ECM.....	46
3.4. Protocolo de siembra en dispositivos microfluídicos	47
3.4.1. Protocolo de siembra en dispositivo <i>be-gradient</i>	47
3.4.2. Siembra en dispositivo microfluídico de tres canales (COP-3).....	48

3.4.3. Siembra en dispositivo microfluídico de dos canales (COP-2)	50
3.4.4. Siembra en dispositivo microfluídico de seis canales IBIDI (PS-6)	52
3.5. Aplicación de <i>shear stress</i> en dispositivos microfluídicos	53
3.5.1. Cálculo del <i>shear stress</i> aplicado en el cultivo celular en los dispositivos microfluídicos.....	53
3.5.2. Calibración de la bomba peristáltica.....	53
3.5.3. Medidas de flujo de bomba peristáltica con sensor	54
3.5.4. Perfusión en dispositivo COP-3	55
3.5.5. Perfusión en dispositivo de COP-2.....	57
3.5.6. Perfusión en dispositivo PS-6	61
3.6. Protocolo visualización daunorrubicina en túbulos	62
3.7. Inmunofluorescencia	63
3.8. Expresión de genes por RT-PCR convencional.....	64
3.9. Cuantificación de la expresión génica mediante qPCR.....	67
3.10. Preparación de cisplatino, daunorrubicina y tacrolimus.....	70
3.11. Citotoxicidad en el modelo de tubulogénesis.....	70
3.12. Citotoxicidad en el modelo <i>kidney-on-a-chip</i>	71
3.13. Protocolo de análisis de la viabilidad celular	71
3.13.1. Análisis de la viabilidad celular en el modelo de tubulogenesis.	71
3.13.2. Análisis de la viabilidad celular en el modelo <i>kidney-on-a-chip</i>	72
3.14. Cálculo del EC50.....	73
3.15. Análisis estadístico.....	73
4. DESARROLLO DEL MODELO DE TUBULOGÉNESIS.....	74
4.1. Introducción.....	75
4.1.1. Hipótesis.....	77
4.1.2. Objetivos específicos	77
4.2. Resultados.....	78
4.2.1. Generación de estructuras autoorganizadas sobre hidrogeles.....	78
4.2.2. Generación de estructuras autoorganizadas sobre recubrimientos de superficie.....	80
4.2.3. Generación de estructuras autoorganizadas tubulares en dispositivos microfluídicos.....	81
4.2.4. Caracterización de las estructuras autoorganizadas tubulares generadas en cultivo 2.5D por inmunofluorescencia.....	82
4.2.5. Transporte de daunorrubicina en estructuras tubulares	85
4.2.6. Expresión génica de marcadores renales en RPTEC/TERT1 en el modelo de tubulogénesis	86
4.3. Discusión	88

5. DESARROLLO DEL MODELO <i>KIDNEY-ON-A-CHIP</i>	94
5.1 Introducción.....	95
5.1.1. Tipos de dispositivos microfluídicos.....	95
5.1.2. Técnicas de perfusión de medio de cultivo para la aplicación de <i>shear stress</i>	98
5.1.3. Tecnología <i>organ-on-chip</i> para el cultivo de células renales	102
5.1.4. Hipótesis.....	104
5.1.5. Objetivos específicos	104
5.2. Resultados.....	105
5.2.1. Aplicación de <i>shear stress</i> fisiológico en dispositivos microfluídicos.....	105
5.2.2. Caracterización de la línea celular RPTEC/TERT1 en dispositivos microfluídicos por inmunofluorescencia.....	115
5.2.3. Expresión génica de marcadores renales en RPTEC/TERT1 mediante RT-PCR y qPCR	121
5.3. Discusión.....	127
6. ENSAYOS DE NEFROTOXICIDAD EN EL MODELO DE TUBULOGÉNESIS Y EN EL MODELO <i>KIDNEY-ON-A-CHIP</i>	132
6.1. Introducción.....	133
6.1.1 Hipótesis.....	137
6.1.2. Objetivos específicos	137
6.2. Resultados.....	138
6.2.1. Nefrotoxicidad en el modelo de tubulogénesis	138
6.2.2. Nefrotoxicidad en modelo de <i>kidney-on-a-chip</i>	141
6.3. Discusión	150
7. CONCLUSIONES	153
7.1. Conclusions	154
7.2. Conclusiones	155
8. BIBLIOGRAFÍA	156

Abstract

Nephrotoxicity is one of the most limiting elements in the development and validation of new drugs, since it is difficult to detect in the preclinical phases. In toxicity tests, the kidney is one of the organs whose function is most compromised, and only until advanced phases in clinical trials is it possible to detect the nephrotoxic potential of a drug. This involves a large consumption of resources that makes the development of new compounds extremely expensive. Traditional cell culture and the use of experimental animals have their limitations when testing new drugs.

Traditional cell culture does not recapitulate the structure and complexity of the native tissue, which can affect cell function and the response to cytotoxins does not resemble what occurs in the kidney. On the other hand, the use of animal models makes it possible to study toxicity in more complex organisms, but the physiology of the human kidney differs from that of the animals used in this type of test. These animal models may give different results when the results are transferred to the clinical phases in humans. For these reasons, the development of new *in vitro* kidney models that recapitulate kidney structure and function is important for their routine application and implementation in research of drugs used today, as well as the research and development of new drugs.

The main objective of this thesis was to develop *in vitro* kidney models that physiologically reproduce what occurs in the renal proximal tubule, making use of an established cell line of this section of the nephron, the RPTEC/TERT1 line, in order to apply these models to toxicity assays of drugs with known nephrotoxic potential. For this purpose, two models with different approaches were developed. Firstly, generating tubular structures that represents the structure of the proximal tubule using biological matrices. Secondly, a model based on microfluidic technology was developed in which microfluidic devices were used where cell culture was performed, in order to apply *shear stress*, a stimulus that occurs physiologically in the renal proximal tubule. In both models, the expression of transporters presents in the proximal tubule increased, which could influence the response to xenobiotics. Finally, both models were used in nephrotoxicity assays used in the clinic such as cisplatin, daunorubicin, tacrolimus, and gentamicin. It was observed that both models respond to nephrotoxins differently when compared to traditional cell culture.

Resumen

La nefrotoxicidad es uno de los elementos más limitantes en el desarrollo y validación de nuevos fármacos, ya que es difícil de detectar en las fases preclínicas. En los ensayos de toxicidad, el riñón es uno de los órganos que más ve comprometida su función, y solo hasta fases avanzadas en ensayos clínicos es posible detectar el potencial nefrotóxico de un fármaco. Esto supone un gran consumo de recursos que hacen que el desarrollo de nuevos compuestos sea costoso. El cultivo celular tradicional y el uso de animales de experimentación tienen sus limitaciones a la hora de testar nuevos fármacos.

El cultivo celular tradicional no reproduce la estructura ni la complejidad del tejido nativo, lo cual puede afectar a la función celular y que la respuesta a citotóxicos no se asemeje a lo que ocurre en el riñón. Por otro lado, el uso de animales de experimentación permite estudiar la toxicidad en organismos más complejos, pero la fisiología del riñón humano difiere de la de los animales que se utilizan en este tipo de ensayos, pudiendo dar resultados diferentes cuando se trasladan los resultados a las fases clínicas en humanos. Por estas razones, es importante el desarrollo de nuevos modelos de riñón *in vitro* que recapitulen la estructura y la función renal para su aplicación e implantación de forma rutinaria en la investigación destinada a la toxicidad de fármacos que se emplean hoy en día, así como a la investigación y desarrollo de nuevos fármacos.

El principal objetivo de esta tesis era desarrollar modelos de riñón *in vitro* que reprodujeran de forma fisiológica lo que ocurre en el túbulo proximal renal, haciendo uso de una línea celular establecida de este tramo de la nefrona, la línea RPTEC/TERT1, con el fin de aplicar estos modelos a ensayos de toxicidad de fármacos con conocido potencial nefrotóxico. Para ello, se desarrollaron dos modelos con aproximaciones diferentes. Por un lado, se generaron estructuras tubulares que representaban la estructura del túbulo proximal, haciendo uso de matrices biológicas. Por otro lado, se desarrolló un modelo basado en tecnología microfluídica en la que se utilizaron dispositivos microfluídicos donde se realizó el cultivo celular, con el fin de aplicar *shear stress*, un estímulo que ocurre de forma fisiológica en el túbulo proximal renal. En ambos modelos aumentó la expresión de transportadores presentes en el túbulo proximal, lo que podría influir en la respuesta a xenobióticos. Finalmente, se utilizaron los dos modelos en ensayos de nefrotoxicidad a fármacos utilizados en la clínica como el cisplatino, la daunorrubicina y el tacrolimus. Ambos modelos respondieron de forma diferente a la exposición a fármacos cuando se compararon con el cultivo celular tradicional.

Lista de abreviaturas

ABC	transportadores dependientes de ATP
ADH	hormona antidiurética
AINEs	antiinflamatorios no esteroideos
AMPKa1	subunidad catalítica de la proteína quinasa activada por 5'-AMP alfa-1
AMPKa2	subunidad catalítica de la proteína quinasa activada por 5'-AMP alfa-2
APN	aminopeptidasa A
AQP1	acuaporina 1
BCRP	proteína de resistencia de cáncer de mama
CAM	membrana corioalantoidea
CDDP	cisplatino
CK18	citoqueratina 18
COC	copolímeros cíclicos de olefina
COP	polímeros cíclicos de olefina
COX	ciclooxigenasa
ECM	matriz extracelular
GGT	gamma-glutamyl transferasa
GLUT	transportador de glucosa
HGF	factor de crecimiento de hepatocitos
HIF1A	factor inducible de hipoxia alfa 1
HIF2A	factor inducible de hipoxia alfa 1
HSPG	proteoglicanos heparan-sulfato
KSP	cadherina-16
L-DOPA	levodopa
MATE	transportador multidrogas y de extrusión de toxinas
MCP-1	proteína quimiotáctica de monocitos 1

MRP	proteína de resistencia múltiples fármacos
NaDC	transportador sodio-dependiente de carboxilato
NaS1	cotransportador de sulfato sódico
NCC	cotransportador de cloruro de sodio
NKCC2	cotransportador Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻
NPCs	células progenitoras de nefronas
OAT	transportador orgánico de aniones
OATP	transportador orgánico de aniones portador de solutos
OCT	transportador orgánico de cationes
PCL	policaprolactona
PDMS	polidimetilsiloxano
PEG	polietilenglicol
PEGDA	poli(etilenglicol) diacrilato
PES/PVP	polietersulfona/ polivinilpirrolidona
PS	poliestireno
PSCs	células madre pluripotenciales
SGLT	transporte facilitado de glucosa
α-SMA	actina alfa de músculo liso
TFG	tasa de filtración glomerular
TGF-β	factor de crecimiento transformador-beta
THP	proteína Tamm-Horsfall (uromodulina)
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
URAT1	transportador humano de urato 1

Lista de figuras

Figura 1.1. Esquema del riñón con sus partes principales.	11
Figura 1.2. Representación de la nefrona con sus diferentes segmentos.	14
Figura 1.3. Modelos simples de riñón <i>in vitro</i>	23
Figura 1.4. Modelos complejos de riñón <i>in vitro</i>	30
Figura 1.5. Aplicación de <i>shear stress</i> sobre cultivo celular en dispositivo microfluídico.	34
Figura 3.1. μ -slide <i>angiogenesis</i> de IBIDI con detalle del pocillo.	45
Figura 3.2. Diseño del dispositivo microfluídico de COP.	48
Figura 3.3. Dispositivo microfluídico de tres canales BE-FLOW (COP-3).	49
Figura 3.4. Dispositivo microfluídico de dos canales BE-FLOW de BeOnChip (COP-2).	51
Figura 3.5. Dispositivo microfluídico de seis canales de IBIDI (PS-6).	52
Figura 3.6. Sistema a flujo con bomba peristáltica con el dispositivo COP-3.	55
Figura 3.7. Sistema a flujo con dispositivo COP-3 en incubador.	56
Figura 3.8. Sistema a flujo con bomba peristáltica con el dispositivo COP-2.	58
Figura 3.9. Sistema a flujo con dispositivo COP-2 en incubador.	58
Figura 3.10. Sistema de control de presión para aplicar flujo en dispositivo COP-2.	59
Figura 3.11. Preparación del sistema por control de presión Fluigent.	60
Figura 3.12. Sistema a flujo con bomba peristáltica con dispositivo PS-6.	61
Figura 3.13. Dispositivo PS-6 conectados a flujo dentro del incubador.	62
Figura 4.1. Formación de estructuras autoorganizadas sobre hidrogeles.	78
Figura 4.2. La formación de estructuras tubulares depende de la presencia de varios de los componentes de la ECM.	79
Figura 4.3. Formación de monocapa celular de RPTEC/TERT1 sobre coatings.	80
Figura 4.4. Formación de estructuras autoorganizadas sobre coatings.	81
Figura 4.5. Formación de estructuras autoorganizadas con forma tubular en el dispositivo microfluídico.	82

Figura 4.5. RPTEC/TERT1 con 5% Matrigel sobre hidrogel de colágeno I + Matrigel (90:10).....	83
Figura 4.6. RPTEC/TERT1 con 5% de Matrigel sin hidrogel.	84
Figura 4.7. Presencia de vimentina en estructuras tubulares.	85
Figura 4.8. Tratamiento con daunorrubicina en RPTEC/TERT1 formando estructuras tubulares.	85
Figura 4.9. Expresión de diferentes genes en RPTEC/TERT1 mediante RT-PCR.....	86
Figura 4.10. Expresión de diferentes marcadores presentes en la línea celular RPTEC/TERT1.	87
Figura 5.1. Tipo de flujo pulsátil generado por ondas de presión, aplicado con balancín y bomba peristáltica.	99
Figura 5.2. Tipo de flujo lineal generado por una presión constante.	100
Figura 5.3. Pulsos de la bomba peristáltica.	105
Figura 5.4. Sistema a flujo con dispositivo COP-3.	106
Figura 5.5. RPTEC/TERT1 expuestas a un shear stress fisiológico en dispositivo COP-3.	107
Figura 5.7. RPTEC/TERT1 expuestas a un flujo fisiológico en dispositivo COP-2.	110
Figura 5.8. Patrón de flujos y presión aplicada con sistema de control de presión.....	111
Figura 5.9. RPTEC/TERT1 antes y después de aplicar <i>shear stress</i>	112
Figura 5.10. RPTEC/TERT1 en dispositivos PS-6 a flujo con Protocolo 1.....	113
Figura 5.11. RPTEC/TERT1 en dispositivos PS-6 a flujo con Protocolo 2.....	114
Figura 5.12. Inmunofluorescencia de RPTEC/TERT1 en dispositivo COP-3.....	116
Figura 5.13. Inmunofluorescencia de RPTEC/TERT1 en dispositivo COP-2.....	117
Figura 5.14. RPTEC/TERT1 en dispositivo COP-2 para la visualización del citoesqueleto.	118
Figura 5.15. Inmunofluorescencia de RPTEC/TERT1 en dispositivo PS-6.....	119
Figura 5.16. RPTEC/TERT1 en dispositivo PS-6 para la visualización del citoesqueleto.....	120

Figura 5.17. RT-PCR de RPTEC/TERT1 tras aplicar shear stress en dispositivos COP-3.	121
Figura 5.18. Expresión de diferentes genes mediante qPCR en el dispositivo COP-3.	123
Figura 5.19. Expresión de marcadores de daño renal en dispositivo COP-3.	123
Figura 5.21. Expresión de marcadores de estrés celular, hipoxia y daño renal presentes en RPTEC/TERT1 en dispositivos PS-6.....	125
Figura 5.22. Expresión de transportadores en las RPTEC/TERT1 en dispositivo PS-6..	126
Figura 6.1. Esquema del protocolo de toxicidad en RPTEC/TERT1 en el modelo de tubulogénesis.	138
Figura 6.2. Respuesta dosis-dependiente de las RPTEC/TERT1 en control y formando túbulos tras tratamiento con daunorrubicina.....	139
Figura 6.3. EC50 de la daunorrubicina en el modelo de tubulogénesis.....	140
Figura 6.4. Viabilidad celular de RPTEC/TERT1 en control y formando túbulos tras tratamiento con cisplatino.	140
Figura 6.5. EC50 del cisplatino en el modelo de tubulogénesis.....	141
Figura 6.6. Esquema del protocolo de toxicidad en RPTEC/TERT1 en el modelo <i>kidney-on-a-chip</i>	142
Figura 6.7. Análisis de la viabilidad celular tras exponer a las RPTEC/TERT1 a flujo en el dispositivo PS-6.....	143
Figura 6.8. Viabilidad celular de RPTEC/TERT1 en control y después de haber sido sometidas a <i>shear stress</i> , aplicando el tratamiento con daunorrubicina.....	144
Figura 6.9. EC50 de la daunorrubicina en el modelo de <i>kidney on a chip</i>	144
Figura 6.10. Análisis de la viabilidad celular tras exponer a las RPTEC/TERT1 a flujo en el dispositivo PS-6 durante 72h y antes del tratamiento con tacrolimus.	145
Figura 6.11. Viabilidad celular de RPTEC/TERT1 en modelo kidney-on-a-chip después del tratamiento con tacrolimus.....	146
Figura 6.12. EC50 del tacrolimus en el modelo de kidney on a chip.....	147
Figura 6.13. Análisis de la viabilidad celular tras exponer a las RPTEC/ antes de tratamiento con cisplatino.....	148

Figura 6.14. Viabilidad celular de RPTEC/TERT1 en control y después de haber sido sometidas a <i>shear stress</i> , aplicando el tratamiento con tacrolimus.	148
Figura 6.15. EC50 del cisplatino en el modelo de <i>kidney on a chip</i>	149

Lista de tablas

Tabla 1.1. Transportadores localizados en el túbulo contorneado proximal.	16
Tabla 1.2. Fármacos comunes que producen nefrotoxicidad y su mecanismo propuesto de toxicidad	19
Tabla 3.1. Preparación de solución de colágeno 2 mg/ml.....	44
Tabla 3.2. Preparación de los diferentes hidrogeles con colágeno I y Matrigel.	44
Tabla 3.3. Diferentes tipos de coating con colágeno I, laminina 511 y laminina 521.....	46
Tabla 3.4. Especificaciones del dispositivo BE-FLOW de tres canales (COP-3).	49
Tabla 3.5. Dimensiones del dispositivo COP-2.	50
Tabla 6. Dimensiones del dispositivo PS-6.....	52
Tabla 3.7. Genes que se analizaron por RT-PCR.....	65
Tabla 3.8. Componentes de la RT-PCR con el volumen y la concentración final.	66
Tabla 3.9. Marcadores utilizados en la qPCR para el modelo de tubulogénesis y para el modelo kidney-on-a-chip.....	69
Tabla 5.1. Materiales más utilizados en la fabricación de dispositivos microfluídicos.	96
Tabla 5.2. Tipos de sistemas con sus ventajas e inconvenientes.....	101
Tabla 5.3. Primeros modelos de <i>kidney-on-a-chip</i>	102

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Anatomía y función del riñón

El riñón es un órgano complejo cuya función principal es regular el equilibrio de líquidos y electrolitos del organismo para crear un ambiente estable para los tejidos y el metabolismo celular. Dicha función se lleva a cabo equilibrando el transporte de agua y solutos, excretando productos provenientes del metabolismo, y regulando el equilibrio ácido-base y conservando a su vez los nutrientes en el cuerpo humano. El aparato renal está formado por dos riñones, dos uréteres, la vejiga urinaria y la uretra. El riñón normal adulto humano tiene forma de judía y está recubierto de una cápsula fibrosa en cuyo interior se distinguen dos partes, la corteza y la médula renal (Figura 1.1). Ésta última está dividida en las denominadas pirámides renales que desembocan en los cálices, y estos a su vez en la pelvis renal (Preuss, 1993).

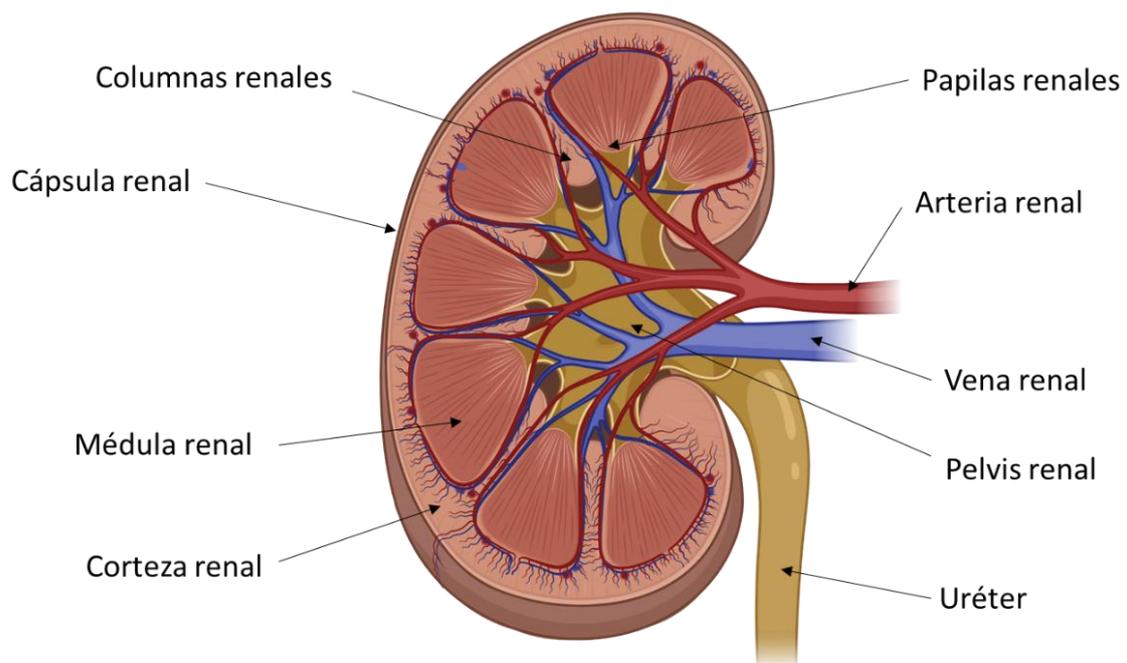


Figura 1.1. Esquema del riñón con sus partes principales. El riñón consta de una corteza y médula renal, cuyo tejido está irrigado por las ramificaciones de la arterial renal. El retorno de la irrigación del tejido es recogido por la vena renal. Las nefronas, situadas en la corteza y la médula, están comunicadas por las papilas renales con la pelvis renal, donde llega la orina formada que finalmente será conducida por los uréteres hasta la vejiga. Adaptado de Biorender.

1. Introducción

El sistema renal tiene como función principal mantener el volumen y la composición del líquido extracelular dentro de unos valores normales. Esto se lleva a cabo a través de diferentes funciones:

- **Filtración glomerular.** La formación de la orina empieza con la filtración glomerular del plasma. El filtrado glomerular es similar al plasma, pero sin proteínas de alto peso molecular, ya que debido a su gran tamaño no pueden atravesar la capa de podocitos y son retenidas en el torrente sanguíneo. La presión osmótica del plasma aumenta y la presión hidrostática disminuye cuando el fluido libre de proteínas es filtrado en el interior de la cápsula de Bowman. La baja presión hidrostática y la presión oncótica aumentada en la arteriola eferente es transferida a los capilares peritubulares y el fluido que se encuentra en los túbulos proximales es reabsorbido. La filtración del plasma por unidad de tiempo es conocida como la tasa de filtración glomerular (TFG). Ésta es de 180 litros al día aproximadamente, y depende de la permeabilidad de la membrana glomerular, de la presión sanguínea y la capacidad de filtración. Aproximadamente se excretan entre 1 o 2 litros de orina al día, reabsorbiéndose el 99% del filtrado en los capilares peritubulares para ser devuelto de nuevo al torrente sanguíneo (Holechek, 2003; Jarad and Miner, 2009). Por su relación con la función depurativa, la TFG es el principal indicador de función renal empleado en la clínica. El aclaramiento o *clearance* es el volumen de plasma que queda libre de una determinada sustancia por unidad de tiempo; dicha sustancia pasa a ser excretada por la orina. LA TFG se estima a partir de la creatinina plasmática mediante fórmulas matemáticas como MDRD, CKD-EPI, DRA y Gregori-Macías (Musso *et al.*, 2016).
- **Reabsorción y secreción tubular.** El segundo paso de la formación de la orina después de la filtración es la reabsorción selectiva de las sustancias filtradas. Las sustancias principales que se filtran son electrolitos, glucosa, aminoácidos, urea, ácido úrico, creatinina y agua. La reabsorción tubular se lleva a cabo por transporte activo y pasivo. El sodio, potasio, calcio, fosfato y el ácido úrico son transportados de forma activa, es decir, con gasto de energía, mientras que la urea, el agua, algunos bicarbonatos y fosfatos son reabsorbidos de forma pasiva, sin gasto de energía. La mayor parte de la reabsorción tiene lugar en el túbulo proximal y el filtrado pasa al asa de Henle, al túbulo distal y a los tubos colectores, por lo que solo el 1% del filtrado es finalmente excretado en la orina. La secreción tubular moviliza las sustancias por transporte activo o pasivo desde la sangre peritubular hacia el interior

1. Introducción

de la luz tubular. Estas sustancias incluyen fosfato, hidrógeno, amoníaco, ácido úrico y otras sustancias exógenas. En los túbulos colectores es donde se produce la mayor reabsorción de agua (Jarad and Miner, 2009).

- **Acción renal de la hormona antidiurética y la aldosterona.** El mecanismo de la hormona antidiurética (ADH) ayuda a mantener el volumen y la osmolaridad del líquido extracelular controlando el volumen final y la osmolaridad de la orina. La liberación de ADH de la neurohipófisis estimula la reabsorción de agua en el último segmento del túbulo distal y en los tubos colectores debido al aumento de la permeabilidad (Jarad and Miner, 2009). Por otro lado, la aldosterona actúa en la porción ascendente del asa de Henle, en el túbulo distal y en los tubos colectores, incrementando la reabsorción de sodio y la excreción de iones potasio e hidrógeno. Esta hormona también promueve la reabsorción de agua por el efecto osmótico del sodio retenido (Booth, Johnson and Stockand, 2002).
- **Mecanismos regulatorios.** Además de la principal función de los riñones de filtrar los productos de deshecho y conservar los solutos y devolverlos al torrente sanguíneo, también participan en la regulación de electrolitos y agua, en el mantenimiento de la presión sanguínea, en el balance ácido-base, en el balance calcio-fosfato y en la eritropoyesis.

1.2. La nefrona

La unidad básica estructural y funcional del riñón es la nefrona. Aproximadamente hay 1.2 millones de nefronas en cada riñón y son las encargadas de formar la orina. Cada nefrona se inicia con un corpúsculo renal formado por la cápsula de Bowman que rodea al glomérulo para luego continuar con el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle y el túbulo contorneado distal que finaliza en el tubo colector (Figura 1.2) (Zhuo and Li, 2013).

La formación de la orina comienza en el corpúsculo renal, localizado en la corteza, y continúa fluyendo por los túbulos y los tubos colectores. La orina que se ha formado circula hacia los tubos papilares de Bellini, entra a los cálices y la pelvis renal y finalmente sale del riñón a través de los uréteres hacia la vejiga.

El riñón recibe la sangre de las arterias renales, que se originan en la aorta abdominal. Antes de llegar al riñón se dividen en anterior y posterior y luego se subdividen en arterias lobulares. Estas arterias suministran sangre a la parte baja, media y al tercio superior del riñón. Éstas a

1. Introducción

su vez se subdividen en la base de las pirámides renales, convirtiéndose en arterias interlobulares, las cuales llevan la sangre a la cápsula y a la corteza renal. Otras ramificaciones interlobulares van hacia los glomérulos, pasando a ser las arteriolas aferentes, que forman un ovillo de capilares denominado glomérulo, el cual está rodeado por la cápsula de Bowman. Los capilares glomerulares están conectados con la arteriola eferente que lleva la sangre a los capilares peritubulares. Las arteriolas eferentes forman otra red de capilares, los vasos rectos, que se encuentra alrededor de los túbulos contorneados y el asa de Henle. Estos capilares son los únicos que llevan sangre a la médula y a su vez transportan el filtrado sanguíneo de vuelta al sistema venoso. Las venas renales forman un patrón similar a las arterias renales, pero en el sentido inverso. Esta red venosa desemboca finalmente en la vena cava inferior (Pashley, 1999).

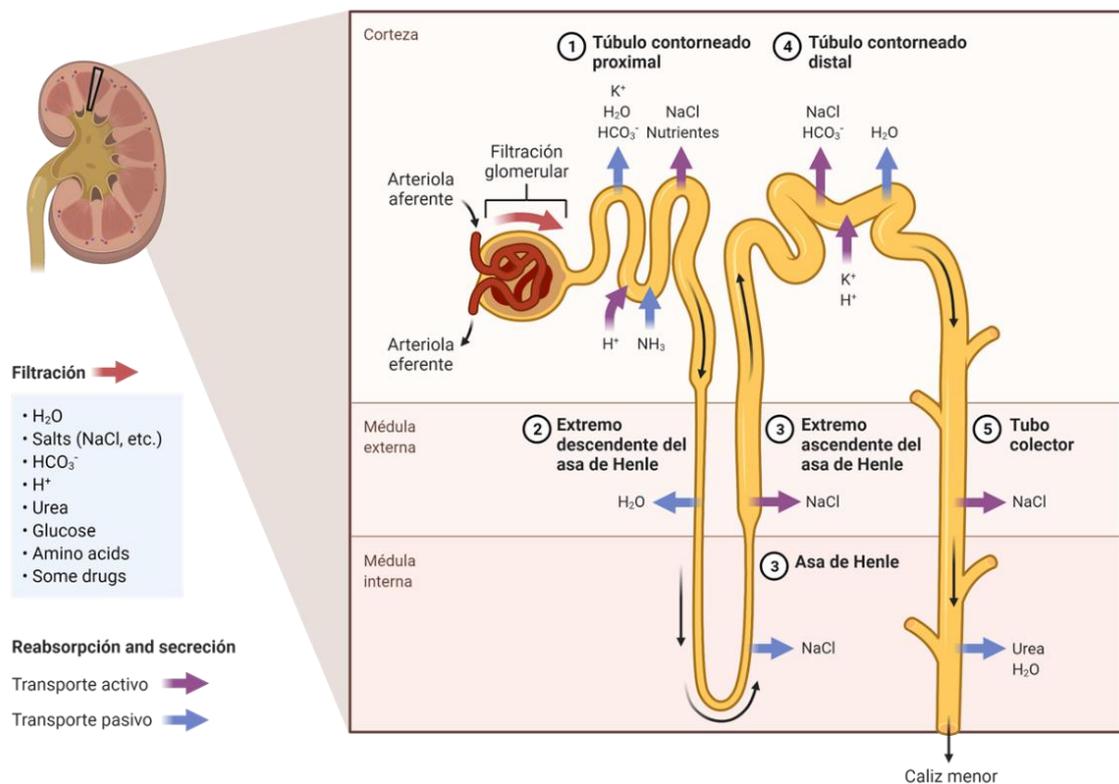


Figura 1.2. Representación de la nefrona con sus diferentes segmentos. La nefrona está formada por diferentes partes: el glomérulo, el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle, el túbulo contorneado distal y el túbulo conector. Adaptado de Biorender.

El riñón es un órgano muy vascularizado por el que pasan 1200 mililitros de sangre por minuto, lo que equivale al 20-25% del gasto cardíaco. Una parte del plasma renal, en torno al 80%, pasa de las arteriolas eferentes a los capilares peritubulares y el 20% restante es filtrado por el glomérulo para llegar finalmente a la cápsula de Bowman. Una característica

1. Introducción

fundamental del flujo sanguíneo en el riñón es la autorregulación, ya que amortigua grandes fluctuaciones en la presión arterial, evitando así transmitir dicha presión a las arterias glomerulares. La tasa de flujo sanguíneo y la tasa de filtración glomerular se mantienen constantes en un rango de entre 80 y 180 mm Hg de presión arterial. Esta autorregulación también evita grandes cambios en la excreción de agua y solutos cuando la presión sanguínea cambia, previniendo así grandes fluctuaciones en la TFG.

1.3. Estructura y función del túbulo contorneado proximal

El túbulo contorneado proximal está formado por un epitelio simple cúbico o cilíndrico. El citoplasma basal de las células del túbulo proximal es muy acidófilo debido a las numerosas mitocondrias que se localizan en esta parte, mientras que el citoplasma apical presenta microvellosidades, las cuales forman el ribete en cepillo. El citoplasma apical contiene canaliculos que van desde la base de las microvellosidades y junto a estas hacen que aumente la capacidad del túbulo proximal para absorber macromoléculas. Los túbulos proximales presentan una luz amplia y están rodeados de capilares sanguíneos (Junqueira and Carneiro, 2015). En el túbulo proximal se distinguen tres segmentos diferentes: el segmento S1 (túbulo contorneado proximal inicial), el segmento S2 (túbulo contorneado proximal final e inicio del túbulo recto proximal) y al segmento S3 (resto del túbulo recto proximal). Las células localizadas en el segmento S1 presentan borde en cepillo alto, con invaginaciones laterales extensas de la membrana basolateral, con un gran número de mitocondrias alargadas que se encuentran en las expansiones celulares laterales. La estructura del segmento S2 es similar, aunque el borde en cepillo es más bajo, tienen menos invaginaciones laterales y mitocondrias no tan prominentes como en el S1. Las células del segmento S3 apenas presentan invaginaciones y expansiones laterales, con un bajo número de mitocondrias y repartidas por toda la célula (Hall, Polesel and Berquez, 2021)

En el túbulo contorneado proximal se expresan un gran número de transportadores específicos de esta parte del túbulo, los cuales se especifican en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1. Transportadores localizados en el túbulo contorneado proximal.

Nombre	Gen	Localización tubular proximal
Transportadores facilitadores de transporte de glucosa		
GLUT1	SLC2A1	Basolateral S2
GLUT2	SLC2C2	Basolateral S1
Transportadores de cationes orgánicos renales		
Familia OCT		
OCT1	SLC22A1	Basolateral
OCT2	SLC22A2	Basolateral
OCT3	SLC22A3	Basolateral
OCTN1	SLC22A4	Apical
OCTN2	SLC22A5	Apical
Familia MATE		
MATE1	SLC47A1	Apical
MATE2-K	SLC47A2	Apical
Transportadores de aniones orgánicos		
Familia NaDC		
NaS1	SLC13A1	Apical
NaDC1	SLC13A2	Apical
NaDC3	SLC13A3	Basolateral

1. Introducción

Familia OAT		
OAT1	SLC22A6	Basolateral
OAT2	SLC22A7	Basolateral
OAT3	SLC22A8	Basolateral
OAT4	SLC22A11	Apical
URAT1	SLC22A12	Apical
Familia OATP		
OATP4C1	SLCO4C1	Basolateral
Transportadores ABC		
MRP2	ABCC2	Apical
MRP1	ABCB1	Apical
MRP4	ABCC4	Apical
BCRP	ABCG2	Apical

Datos recogidos de: (Skorecki, Karl; Chertox, Glenn M.; Mardsen, Philip A; Taal, Maarten W; Yu, 2016)

Abreviaturas: GLUT: transportador de glucosa, SLC: transporte facilitado de glucosa, OCT: transportador orgánico de cationes, MATE: transportador multidrogas y de extrusión de toxinas, NaS1: co-transportador de sulfato sódico, NaDC: transportador sodio-dependiente de carboxilato, OAT: transportador orgánico de aniones, URAT1: transportador humano de urato 1, OATP: transportador orgánico de aniones portador de solutos, ABC: transportadores dependientes de ATP, MRP: proteína de resistencia a múltiples fármacos, BCRP: proteína de resistencia de cáncer de mama.

1.4. Nefrotoxicidad

El riñón es uno de los órganos diana que presentan toxicidad por el uso de fármacos. Esta nefrotoxicidad es a día de hoy un gran problema a la hora de abordar en la clínica el uso de fármacos que son potencialmente nefrotóxicos, pero que a la vez son necesarios para determinados tratamientos (Perazella, 2018). El riñón es la principal vía de eliminación de muchos fármacos antineoplásicos y sus metabolitos, y pueden afectar a los glomérulos, los túbulos, el intersticio y la microvasculatura renal. Hay dos vías principales para la excreción de xenobióticos: la filtración glomerular y la secreción tubular. La filtración glomerular juega un papel importante con las moléculas pequeñas que no están unidas a proteínas y que por su tamaño pueden pasar a través de la pared de los capilares glomerulares. Otras moléculas no pueden ser filtradas, por su tamaño o si están unidas a proteínas en la circulación sanguínea, por lo que, si finalmente son excretadas por el riñón, pasan a la orina por secreción en el túbulo proximal.

Las enfermedades que se asocian al uso de quimioterápicos se pueden clasificar en: daño renal agudo debido a microangiopatía trombotica, necrosis tóxica aguda tubular, nefropatía por depósito de cristales, síndrome nefrótico, glomeruloesclerosis focal y segmentaria, nefropatía de membrana basal, tubulopatías por desórdenes en el equilibrio ácido-base y de electrolitos, y enfermedad renal crónica debido a glomerulopatías o nefritis intersticial (Malyszko *et al.*, 2017).

El túbulo proximal renal es la parte de la nefrona que sufre más daño debido a que es donde se concentran la mayor parte de transportadores que participan en la secreción de xenobióticos. Los cambios morfológicos que se producen en este segmento como consecuencia de la exposición a nefrotoxinas son diversos e incluyen: necrosis tubular extensiva, pérdida de células del túbulo, pérdida del borde en cepillo, vacuolización citoplasmática, inclusiones intracelulares, dilatación tubular, *debris* en la zona intraluminal, rotura tubular con extravasación urinaria y procesos regenerativos (aplanamiento del epitelio, actividad mitótica, cambios en tamaño y forma celular e incremento del ratio núcleo/citoplasma) (Racusen and Solez, 1986).

Los fármacos que potencialmente pueden causar daño renal están agrupados en quimioterápicos, antibióticos, antivirales, antiinflamatorios no esteroideos, inmunosupresores y agentes de contraste, y cada uno de ellos produce lesiones en el riñón dependiendo de su mecanismo de toxicidad (Tabla 1.2).

1. Introducción

Tabla 1.2. Fármacos comunes que producen nefrotoxicidad y su mecanismo propuesto de toxicidad

Fármaco	Mecanismo de toxicidad	Características clínicas
Aminoglucósidos	Necrosis de las células del túbulo	Necrosis tubular aguda, reducción en la tasa de filtración glomerular
Anfotericina B	Necrosis de las células del túbulo	Alteraciones hemodinámicas, daño en el túbulo distal
AINEs	Inflamación, daño renal por alteraciones hemodinámicas	Enfermedad glomerular, alteraciones hemodinámicas, nefritis intersticial aguda alérgica
Cisplatino	Necrosis de las células del túbulo	Necrosis tubular aguda, cambios hemodinámicos
Cidofovir/Adenofovir/Tenofovir	Necrosis de las células del túbulo	Daño en el túbulo proximal
Ciclosporina A	Daño renal por alteraciones hemodinámicas	Reducción en la tasa de filtración glomerular y reducción del flujo sanguíneo renal
Tacrolimus	Daño renal por alteraciones hemodinámicas	Reducción en la tasa de filtración glomerular y reducción del flujo sanguíneo renal
Agentes de radiocontraste	Necrosis de las células del túbulo	Alteraciones hemodinámicas

Datos recogidos de: (Wu and Huang, 2018)

1.4.1. Antibióticos

Los aminoglucósidos son un grupo de antibióticos entre los que se encuentran fármacos ampliamente utilizados como la gentamicina, tobramicina, neomicina y estreptomina, entre otros. Estos antibióticos producen daño a través de tres mecanismos principales: obstrucción tubular renal, vasoconstricción renal y contracción mesangial. La endocitosis de estos fármacos resulta en su acumulación en diferentes orgánulos que finalmente induce apoptosis y necrosis. Además de la muerte de las células del túbulo renal, los aminoglucósidos también impiden la reabsorción inhibiendo varios de los receptores localizados en el túbulo renal (Wargo and Edwards, 2014).

1.4.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Dependiendo de la ciclooxigenasa (COX) a la que van dirigidos, los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) se clasifican en inhibidores selectivos de COX-1 (Aspirina), inhibidores de COX-2 (Ibuprofeno, Diclofenaco, Naproxeno, Meloxicam, Celecoxib,...) e inhibidores de COX no selectivos (Ketoprofeno y Etotricoxib). COX-2 está presente en células del endotelio, del túbulo proximal y de la vasculatura renal, y tiene un papel fundamental en la vasoconstricción. Por eso, el uso de este tipo de inhibidores de COX-2 en pacientes con fallo congestivo cardiaco, depleción del volumen intravascular o lupus eritematoso sistémico tiene un gran riesgo de producir nefrotoxicidad (Wargo and Edwards, 2014).

1.4.3. Antivirales

Este grupo incluye fármacos antivirales como el cidofovir, utilizado para el tratamiento de la retinitis causada por citomegalovirus en pacientes con SIDA, aunque también afecta a otros tipos de virus como el virus del herpes simple y el virus del papiloma humano. Este antiviral produce daño en las células del túbulo proximal y fallo renal agudo, induciendo apoptosis celular. Otros fármacos antivirales como el adefovir, causa daño renal agudo dirigido especialmente a las células del túbulo proximal. El transportador orgánico de aniones 1 (OAT1) contribuye a la acumulación de ambos fármacos en las células del túbulo proximal. Por otro lado, el uso de aciclovir causa cristalización de dicho fármaco en el riñón debido a su baja solubilidad en la orina a un pH fisiológico. Sin embargo, los cambios en la función

1. Introducción

renal debido al uso de este tipo de fármacos vuelven a sus valores normales tras el tratamiento (Wargo and Edwards, 2014).

1.4.4. Inmunosupresores

Los inhibidores de calcineurina, que actúan impidiendo la transcripción de la interleukina-2 y la proliferación de linfocitos, son ampliamente utilizados como inmunosupresores para evitar el rechazo en trasplantes. Entre ellos, la ciclosporina A y el tacrolimus son ampliamente utilizados en la clínica. La ciclosporina A induce vasoconstricción, reducción de la tasa de filtración glomerular y reducción del volumen sanguíneo renal. El tacrolimus tiene mejor eficacia y menos efectos adversos comparado con la ciclosporina A, pero ambos, de forma dosis dependiente, pueden causar vasoconstricción aguda de las arteriolas aferentes y eferentes, produciendo un daño tubular por isquemia y una reducción de la tasa de filtración glomerular. Se ha visto que polimorfismos en la enzima CYP3A y la P-glicoproteína deberían tenerse en cuenta a la hora de la administración de ambos fármacos ya que pueden ser transportados por CYP3A y la P-glicoproteína, para así reducir el riesgo de nefrotoxicidad (Wargo and Edwards, 2014).

1.4.5. Agentes de contraste

El mayor efecto adverso de los agentes de contraste es la nefropatía inducida por su uso en procesos que facilitan la visibilidad en técnicas de imagen. La mayoría de los agentes de contraste producen citotoxicidad renal tubular debido a hipoxia medular y generan especies reactivas de oxígeno. La nefrotoxicidad de estos agentes es debida a su osmolaridad en mayor parte, pero también está asociada a la viscosidad y a la fuerza iónica de los mismos (Wu and Huang, 2018).

1.4.6. Fármacos antineoplásicos

El riñón es el órgano principal por el que se eliminan los agentes antineoplásicos y sus metabolitos. Éstos pueden afectar al glomérulo, los túbulos, el intersticio y la microvasculatura renal, manifestándose clínicamente desde la elevación de la creatinina en suero hasta fallo renal agudo que puede acabar en la necesidad de diálisis. Dentro de los agentes antineoplásicos se encuentran los agentes alcalinizantes, antimetabolitos, inhibidores

1. Introducción

del factor de crecimiento endotelial y epitelial y los derivados del platino. Dentro de los derivados del platino, el cisplatino es uno de los agentes en el tratamiento contra el cáncer más ampliamente utilizado y es conocido por ser altamente nefrotóxico, ya que afecta al 20% de los pacientes hospitalizados con cáncer que presentan daño renal agudo por el uso de este fármaco. La toxicidad producida por este fármaco es dependiente de la dosis administrada (Latcha *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2020).

El cisplatino causa daño de forma predominante en el túbulo proximal y los cambios histológicos consisten en daño tubular agudo con descamación de células epiteliales tubulares. La conversión de cisplatino a moléculas tóxicas es el paso clave para la inducción de nefrotoxicidad. La acumulación del cisplatino en las células está asociada con la formación de compuestos de tiol reactivos y complejos monohidroxilo que son altamente tóxicos para las células del túbulo proximal. Esta toxicidad está relacionada con diversos mecanismos que incluyen estrés oxidativo, especies reactivas de nitrógeno, inducción de proapoptosis e inflamación. El cisplatino activa la caspasa 1, que a su vez activa la caspasa 3, induciendo así la apoptosis. Además, el cisplatino aumenta la producción de citoquinas como TNF- α , TGF- β y MCP-1 (Townsend *et al.*, 2003; Perazella and Moeckel, 2010; Malyszko *et al.*, 2017).

Minimizar la toxicidad producida por fármacos todavía sigue siendo un reto a la hora de lanzar nuevos fármacos al mercado. Aproximadamente un 92% de los compuestos que se desarrollan son descartados por sus efectos adversos durante la etapa de desarrollo clínico. El riñón es uno de los órganos prioritarios que se tienen en cuenta durante la evaluación preclínica sobre la seguridad de fármacos en desarrollo. Sin embargo, solo el 7% de los nuevos compuestos fallan en la fase de ensayos preclínicos debido a su nefrotoxicidad, mientras que los pacientes en cuidados intensivos que finalmente acaban desarrollando fallo renal agudo son el torno al 30-50% (Fuchs and Hewitt, 2011). Estos datos hacen ver que se está subestimando la capacidad nefrotóxica de los fármacos en las fases de ensayos preclínicos. En toxicología, para evaluar el efecto de un nuevo compuesto se utiliza de forma primordial la observación de cambios histopatológicos. Sin embargo, estos cambios se observan cuando el riñón ya no conserva su función. Para poder observar cambios a diferentes tiempos cuando se está testando un fármaco, supondría un aumento en el uso de animales de experimentación, en coste y tiempo en el proceso de desarrollo de nuevos fármacos. Todos estos factores han llevado a que se estén desarrollando nuevas tecnologías que finalmente puedan ser aprobadas para testar nuevos fármacos antes de pasar a ensayos preclínicos con animales, ya que así disminuiría el coste de producción, se reduciría el uso de

1. Introducción

animales de experimentación y por tanto se reduciría así el tiempo invertido en introducir en el mercado nuevos fármacos.

1.5. Modelos de riñón *in vitro*

En los últimos años el cultivo celular tradicional está siendo reemplazado por modelos más sofisticados que recrean el microambiente celular y las características biomecánicas, bioquímicas y fisiológicas que se asemejan a lo que ocurre en el cuerpo humano. Por esta razón, diferentes modelos de riñón *in vitro* están siendo desarrollados, ya sea utilizando técnicas más convencionales o tecnología más avanzada que permite recrear tanto la estructura como la función renal.

1.5.1. Modelos simples de riñón *in vitro*

Este tipo de modelos son ampliamente utilizados debido a su fácil manejo, son asequibles, suelen estar basados en un único tipo celular y son modelos accesibles para ensayos posteriores de nefrotoxicidad frente a fármacos. Estos modelos están basados en el uso de matrices biológicas y sintéticas mediante el uso de *coatings*, de membranas permeables y de hidrogeles en 2.5D y 3D (Figura 1.3).

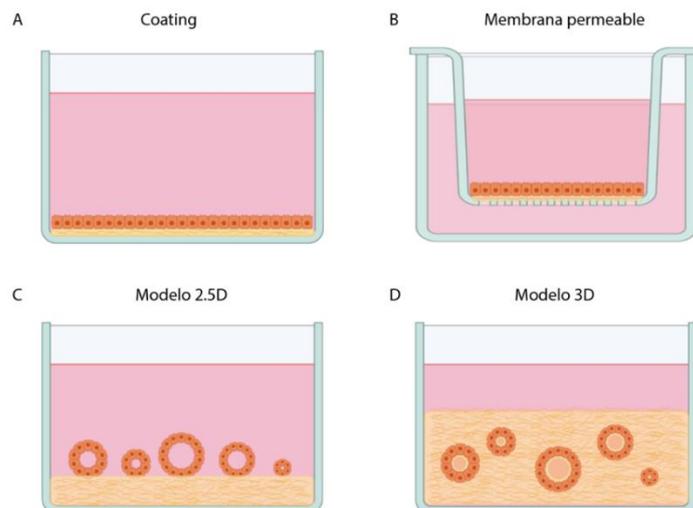


Figura 1.3. Modelos simples de riñón *in vitro*. Este tipo de modelos se pueden clasificar en aquellos en los que se aplica un *coating* en superficie plástica (A), en el uso de membranas porosas (B), el cultivo celular sobre hidrogeles, denominado cultivo celular en 2.5D (C) y en hidrogeles 3D donde las células se encuentran embebidas en la matriz (D). Creado con BioRender.

1.5.1.1. Modelos 2D

Las proteínas que proceden de la matriz extracelular son ampliamente utilizadas para recubrir diferentes superficies como plástico, membranas porosas u otro tipo de estructuras sintéticas sobre las que se realiza después el cultivo celular. Éste es un método sencillo que proporciona el soporte y mantenimiento necesario para el cultivo de células renales.

El cultivo celular de células primarias del túbulo proximal humano en diferentes *coatings* con proteínas de la matriz extracelular genera estructuras tubulares independientemente de las proteínas utilizadas (Zhang *et al.*, 2011). Sin embargo, no todos los tipos celulares tienen la misma respuesta cuando están en contacto con diferentes matrices biológicas o sintéticas. En un estudio en el que se utilizaron células renales del túbulo proximal humano se observó que los mejores resultados para la formación de estructuras similares a las encontradas *in vivo* se obtuvieron con componentes de la membrana basal como la laminina y el colágeno IV (Zhang *et al.*, 2009). En una aproximación diferente, el Matrigel fue la mejor opción para conseguir la diferenciación celular a partir de células madre embrionarias y se consiguió recrear estructuras tubulares. En este mismo estudio se comprobó el impacto de diferentes *coatings* de proteínas, utilizando colágeno IV, fibronectina, laminina y Matrigel para observar la diferenciación celular y cuantificar la expresión de marcadores presentes en este tipo celular como acuaporina 1 (AQP-1). Los mejores resultados en cuanto a expresión de este marcador se obtuvieron con Matrigel, además de otros dos marcadores específicos como CK18 y GGT, que también aumentaron su expresión cuando las células fueron cultivadas en Matrigel (Narayanan *et al.*, 2013).

Este método de recubrimiento de superficies es útil para conocer el papel que juegan las diferentes proteínas de la matriz extracelular en la diferenciación, proliferación y mantenimiento de las células renales, pero es un sistema poco complejo que no recrea las estructuras que se encuentran *in vivo*. Sin embargo, es un protocolo comúnmente utilizado en los primeros pasos de diferenciación celular y proliferación.

Dentro de los modelos 2D, uno de los sistemas más utilizados son las membranas porosas de policarbonato, empleadas por ejemplo en los denominados Transwell. Este tipo de membranas están ya ampliamente caracterizadas como soporte para el cultivo celular, además de ser compatibles con el uso de proteínas obtenidas de la matriz extracelular para recubrir la superficie de la membrana. Este tipo de material provee un soporte flexible y permite el transporte de nutrientes y otros compuestos a través de la membrana (King *et al.*, 2017). Una ventaja añadida es que se puede realizar un co-cultivo de dos tipos celulares en cada lado de

1. Introducción

dicha membrana, además de que favorece la polarización de las células epiteliales y que es posible el acceso a ambos lados de la misma (Shamir and Ewald, 2014). A la hora de utilizar este tipo de soporte con diferentes proteínas de la matriz extracelular, se observó que el Matrigel, que es una combinación de varios componentes de la matriz extracelular (ECM), tuvo mejores resultados cuando se comparó con otros compuestos como la gelatina, colágeno I, poli-L-lisina y laminina (Gao *et al.*, 2011). Otro tipo de membranas utilizadas en sistemas Transwell, como membranas PES-PVP, combinadas con un *coating* de L-DOPA y colágeno IV han sido utilizadas para medir la actividad de los transportadores de cationes orgánicos en un cultivo de una línea celular inmortalizada del túbulo proximal llamada ciPTEC (Hulshof *et al.*, 2018).

1.5.1.2. Modelos 2.5D

Otra técnica, basada en el uso de hidrogeles 2.5D, consiste en cultivar las células sobre un hidrogel y añadir proteínas de la matriz extracelular al medio de cultivo para que se generen estructuras tridimensionales, pero sin estar las células embebidas dentro de una matriz, sino en la superficie de la misma. Extractos comerciales como el Matrigel o colágeno I son los más utilizados en esta técnica (Shamir and Ewald, 2014). La línea celular MDCK, que procede de riñón de perro, formó estructuras quísticas sobre un hidrogel de Matrigel en presencia del mismo componente mezclado en el medio de cultivo. En estas condiciones, las células mostraron polarización hacia el centro del quiste formando una luz en su interior. Otras dos líneas celulares, LLC-PK1 y RPTEC/TERT1, mostraron una respuesta similar con medio de cultivo enriquecido con Matrigel sobre un gel de este mismo compuesto o de colágeno (Rodríguez-Fraticelli *et al.*, 2015; Bosch-fortea *et al.*, 2019). Este modelo no reproduce completamente el microambiente ni la estructura *in vivo*, ya que solo hay matriz en la base del cultivo celular y las células están en contacto con un gran volumen de medio en la zona superior del compartimento donde se encuentran. Sin embargo, el cultivo celular en 2.5D es capaz de inducir la formación de estructuras tubulares y su mayor ventaja es que es un modelo que puede ser útil para diferentes análisis bioquímicos o ensayos de nefrotoxicidad debido al fácil acceso a las células.

Las proteínas derivadas de la matriz extracelular han demostrado ser la mejor opción en términos de diferenciación y proliferación celular, aunque las diferencias entre lotes y su alto coste han contribuido a buscar nuevas aproximaciones. Por esta razón, se han llevado a cabo estudios en el campo de los biomateriales optimizados para cultivo celular. El diseño de

1. Introducción

matrices extracelulares artificiales ha ido en aumento en los últimos años para sustituir las matrices biológicas por biomateriales sintéticos como andamiaje para el epitelio renal. El objetivo principal es obtener un material cuya composición pueda ser diseñada para proveer de propiedades bioquímicas y físicas al cultivo celular (Petkau-Milroy and Brunsveld, 2013).

Los sustratos artificiales tienen varias ventajas cuando se compara con el uso de proteínas de la matriz extracelular en cultivo 2D, ya que los biomateriales artificiales pueden ser adaptados y funcionalizados dependiendo de las necesidades de cada tipo celular. Además, sus propiedades bioquímicas y físicas pueden ser controladas para favorecer la diferenciación y proliferación en los modelos *in vitro* de riñón (Cruz-Acuña *et al.*, 2019).

1.5.1.3. Modelos 3D

El cultivo celular en 3D se basa en modelos donde las células se encuentran embebidas en matrices biológicas o sintéticas o bien en estructuras que confieren al modelo *in vitro* de una estructura tubular o quística. Los estudios sobre la morfogénesis tubular utilizando hidrogeles en 3D han sido relevantes para establecer qué vías de señalización, factores de crecimiento, interacciones celulares e interacciones célula-matriz extracelular están implicadas en la formación de estructuras tubulares en modelos *in vitro* (Karihaloo, Nickel and Cantley, 2005).

En un estudio en el que se utilizó la línea celular MDCK, se observó que la composición de la matriz extracelular regulaba los mecanismos de la formación de la luz tubular y su eficiencia. Hay varios agentes implicados en la morfología tridimensional cuando las células se encuentran embebidas dentro de un gel, como señales mecánicas e interacciones entre proteínas de la matriz. Estos factores pueden ser modificados variando la concentración de las proteínas de la matriz extracelular y su rigidez (DesRochers, Palma and Kaplan, 2014; Shamir and Ewald, 2014; Hirashima, Hoshuyama and Adachi, 2017). Se ha visto además que esta misma línea celular es capaz de formar estructuras tubulares de forma espontánea cuando las células están embebidas en hidrogeles, ya que la matriz extracelular tiene una gran influencia sobre la polarización de estas células y la formación de la luz tubular (Zegers *et al.*, 2003; Schlüter and Margolis, 2009).

Muchas de las investigaciones que se han realizado en los modelos basados en estructuras tridimensionales embebiendo las células en proteínas de la matriz extracelular se han llevado a cabo principalmente con Matrigel o diferentes colágenos como la principal fuente de proteínas de la matriz. Este modelo en 3D es el que más se ha utilizado en los últimos treinta

1. Introducción

años. Ya en los años noventa se observó que los factores TGF- α y EGF, que tienen similitudes estructurales, estimulaban la formación de estructuras tubulares con células primarias de ratón cuando eran embebidas en Matrigel (Taub *et al.*, 1990). En otro estudio se vio que estas células también formaban estructuras tubulares y glomerulares en siete días cuando se mezclaban con una suspensión de colágeno tipo I, y las estructuras tubulares continuaban alargándose en el tiempo que permanecían en cultivo (Joraku *et al.*, 2009). Células neonatales de rata fueron también sembradas en un hidrogel formado por una combinación de colágeno y Matrigel y el cultivo celular formó también estructuras de ambos tipos después de catorce días (Fomby *et al.*, 2010). Por otro lado, la línea celular MDCK también es capaz de formar este tipo de estructuras tubulares, y se vio que estas células podrían responder a un rango específico de dureza del hidrogel para que el fenómeno de tubulogénesis llegue a producirse (Hirashima, Hoshuyama and Adachi, 2017).

Una de las ventajas que ofrece este tipo de cultivo celular 3D es que permite el co-cultivo de diferentes líneas celulares para recrear un modelo de riñón más complejo. Un estudio en el que se comparó un sistema Transwell con un cultivo en 3D en un modelo vascularizado de túbulo proximal donde las células estaban embebidas en una mezcla de gelatina y fibrina (gelbrina), se observó que en el modelo en 3D había habido un aumento en la expresión de transportadores, a la vez que se constataron cambios tanto en la morfología como en la actividad metabólica (Lin *et al.*, 2019).

Además del colágeno o el Matrigel, se han utilizado diferentes matrices biológicas para desarrollar modelos tridimensionales. Tres líneas derivadas de riñón humano (HK-2, ciPTEC y células primarias del túbulo proximal) fueron sembradas en hidrogeles basados en una matriz sintética de starPEG funcionalizada con heparina, que es un glicosaminoglicano sulfatado. La matriz obtenida permitió la formación de estructuras tubulares con características morfológicas y funcionales similares a las encontradas *in vivo*. En este estudio se vio que los glucosaminoglicanos sulfato juegan un papel importante en la polarización celular en los modelos 3D con células del túbulo proximal. Este sistema permite modular la formación de dichas estructuras ajustando las propiedades del hidrogel en términos de degradabilidad y señalización mecánica en presencia de factores de crecimiento (Weber *et al.*, 2017). Por otro lado, un hidrogel basado en ácido hialurónico se utilizó en un modelo tridimensional con células de ratón de túbulo proximal cuyo cultivo fue mantenido hasta seis semanas. Las estructuras tubulares fueron caracterizadas y se observó que este modelo mantenía la expresión de marcadores específicos del riñón como el transportador OAT-1, y

1. Introducción

que también mantenían una luz accesible a nutrientes y también a fármacos (Astashkina *et al.*, 2012).

Una cuestión a tener en cuenta es que las proteínas de la matriz extracelular que se utilizan en estos modelos son principalmente de origen animal en vez de humano, por lo que no podrían utilizarse en modelos de terapia regenerativa de riñón. En base a esto, en un estudio se desarrolló un método para producir hidrogeles derivados de la ECM de la corteza de riñón humano. Se vio que esta matriz conservaba las propiedades tanto estructurales como bioquímicas que se encuentran en el tejido renal. Además, la composición de la matriz se podía modificar añadiendo otros componentes como colágeno tipo I para reproducir modelos de enfermedades renales (Hiraki *et al.*, 2018).

Una aproximación similar para obtener modelos 3D es aplicar dos capas diferentes de los extractos de matriz extracelular y cultivar las células entre esas dos capas, en vez de estar embebidas directamente en un hidrogel como en los modelos descritos previamente. Esta técnica se utilizó con células MDCK y se identificó el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) como inductor del proceso de ramificación de estructuras tubulares en un hidrogel en co-cultivo con fibroblastos (Montesano *et al.*, 1991; Montesano, Schaller and Orci, 1991). Esta misma técnica de sándwich se ha utilizado con la línea celular RPTEC/TERT1. Las células recrearon estructuras tubulares en la superficie de una matriz de Matrigel y después de dieciséis horas se aplicó una capa superior con la misma composición. Este cultivo celular se mantuvo hasta sesenta días y se observó que el transportador OAT3 solo se expresó en las células que se reorganizaron en túbulos cuando se compararon con el control. Además, mostraron mayor sensibilidad cuando fueron tratadas con cisplatino en comparación con el control en monocapa (Secker *et al.*, 2017). Por otro lado, el co-cultivo de tres tipos celulares con este método de cultivo celular permitió la organización de células de túbulo proximal para recrear túbulos. En este estudio, se combinó la técnica de cultivo 2.5D y 3D. Los fibroblastos renales fueron embebidos en un hidrogel de colágeno tipo I y tras su polimerización, se sembraron células endoteliales (HUVEC) en la superficie de dicho hidrogel. Tras este paso, una capa de Matrigel se dispuso recubriendo las células endoteliales y después, células de túbulo proximal fueron a su vez sembradas en la superficie del Matrigel, formando túbulos en la superficie tras cinco horas, recreando un cultivo celular 2.5D. Las células estaban completamente polarizadas y con una luz en el interior de los túbulos bien definida. Algunos marcadores como P-gp, Na⁺ - K⁺ - ATPasa y SGLT2 se observaron en este co-cultivo (Wang *et al.*, 2019). La línea celular HK-2 también formó estructuras tubulares

1. Introducción

con esta técnica de hidrogeles capa a capa y mantuvieron su estructura tubular hasta catorce días (Kher *et al.*, 2011).

Una de las limitaciones de los hidrogeles basados en proteínas de la matriz extracelular es la baja integridad mecánica ya que se ve reducida en cultivos celulares de larga duración. Por esta razón, un estudio combinó una matriz sintética de polímeros de seda con un hidrogel basado en una combinación de colágeno y Matrigel. Las matrices basadas en biomateriales proveen de una estructura adecuada que permite la función e interacción celular. Por otro lado, las moléculas presentes en la matriz juegan un papel importante en el soporte de estas estructuras y facilitan la señalización célula-matriz. Dos líneas celulares derivadas de riñón, MEK y mIMCD fueron sembradas en este tipo de matrices y formaron estructuras tubulares que fueron mantenidas durante dos semanas. Las células presentaban polarización y actividad en el transporte de fármacos. Este modelo fue además útil para el estudio de la enfermedad autosómica poliquística dominante (ADPKD) (Subramanian *et al.*, 2010, 2012).

1.5.2. Modelos complejos de riñón *in vitro*

Las nuevas tecnologías en el campo del cultivo celular han permitido desarrollar modelos de riñón *in vitro* más complejos, en los que es posible recrear estructuras con más de un tipo celular, además de introducir otras partes esenciales en la estructura del órgano como son la vascularización o la parte intersticial del mismo. Este tipo de modelos confieren al cultivo celular de señales tanto bioquímicas como biomecánicas. Las diferentes aproximaciones para llegar a generar estos modelos se basan en tecnología microfluídica para la obtención de modelos *kidney-on-a-chip*, en la bioimpresión para generar estructuras similares a las encontradas en la parte tubular de la nefrona, en la recellularización de matriz extracelular obtenida de riñón y en el desarrollo de organoides (Figura 1.4).

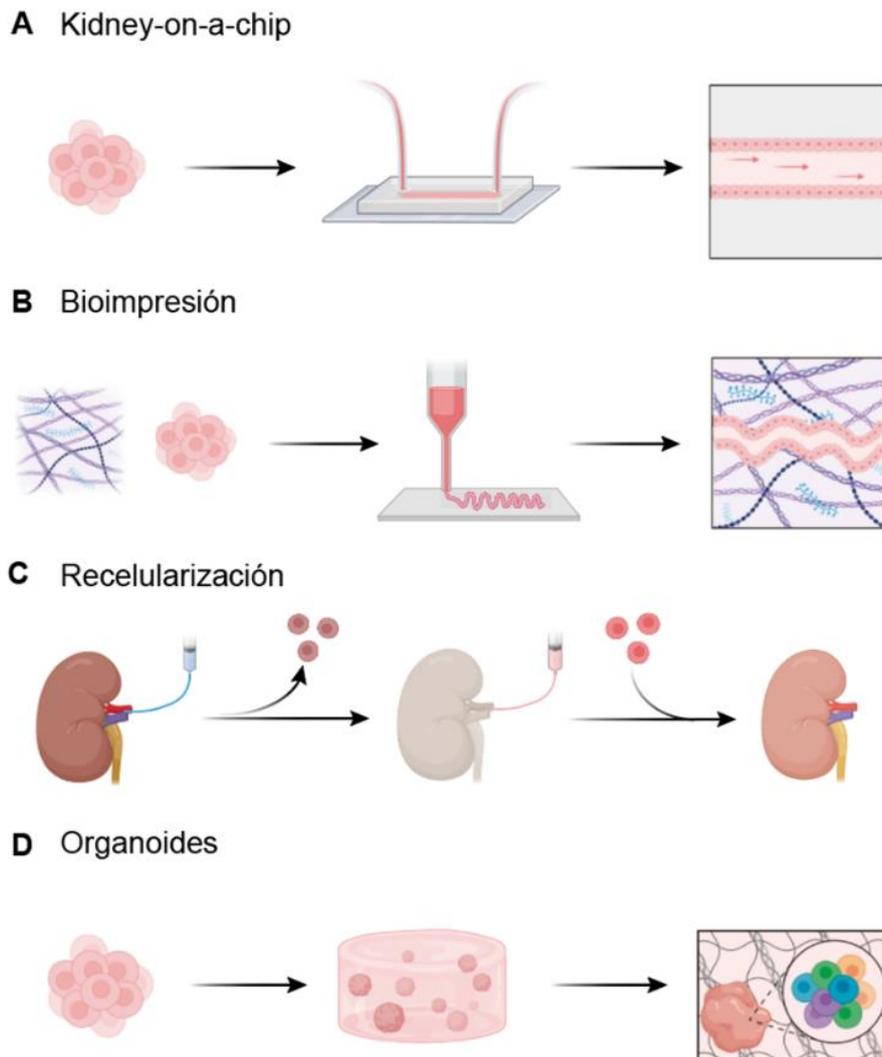


Figura 1.4. Modelos complejos de riñón in vitro. Las nuevas tecnologías [*kidney-on-a-chip* (A), bioimpresión (B), recelularización (C) y el desarrollo de organoides (D)] permiten la generación de modelos complejos, introduciendo en ellos la heterogeneidad celular, así como la parte vascular e intersticial de los tejidos, además de estímulos biomecánicos. Creado con BioRender.

1.5.2.1. Descelularización de matriz extracelular de riñón

Si bien el uso de materiales sintéticos para recrear un ambiente biomimético en modelos de riñón *in vitro* ha ido emergiendo en los últimos años, también se ha avanzado en el uso de órganos descelularizados del que poder obtener matrices biológicas. Esta técnica consiste en eliminar las células del órgano donante con enzimas, detergentes y diferentes soluciones de lisis para poder recelularizar dicha matriz con diferentes tipos celulares como células madre, células renales progenitoras o líneas celulares establecidas. Además de conservar la estructura, también contienen factores de crecimiento, citoquinas y otros factores que favorecen la adhesión celular, la proliferación y diferenciación a células renales (Figliuzzi, Bonandrini and

1. Introducción

Remuzzi, 2017). En un estudio realizado para ver la composición de la matriz extracelular obtenida, se observó que la laminina y el colágeno tipo IV estaban presentes, además de las membranas basales tanto del glomérulo como de la parte tubular de la nefrona. Las concentraciones de estas proteínas eran similares a las del tejido renal utilizado como control (Song *et al.*, 2013).

La matriz extracelular adulta conserva señales que promueven la diferenciación específica hacia tejido renal, como se pudo observar en un estudio llevado a cabo con células madre progenitoras de riñón. Por este motivo, el método de descelularización es clave para preservar moléculas relevantes de la matriz, pero también para mantener las glicoproteínas asociadas a ellas como los proteoglicanos heparan-sulfato (HSPG). Además, el estado de desarrollo en el que se encuentran las células utilizadas para resembrar estas matrices es también clave para recrear el tejido renal que se encuentra *in vivo* (Ullah *et al.*, 2020).

Este tipo de modelo podría ser una herramienta muy útil para la regeneración de tejido renal como alternativa al trasplante, pero desafortunadamente todavía queda mucho por hacer en este campo para poder recrear todas las funciones del riñón al tratarse de un órgano extremadamente complejo. Sin embargo, este tipo de matrices descelularizadas se están utilizando hoy en día como biotintas en modelos de riñón *in vitro* con resultados prometedores.

1.5.2.2. Bioimpresión

La impresión 3D en combinación con las biotintas arriba mencionadas o con materiales sintéticos han emergido como una herramienta muy útil en el desarrollo de modelos de diferentes tejidos, entre los que se encuentra también el tejido renal (Pati and Cho, 2017; Tröndle *et al.*, 2019).

Los polímeros termoplásticos como la policaprolactona (PCL) son unos de los materiales más utilizados en bioimpresión y en combinación con matriz renal descelularizada se ha visto que puede recrear una estructura similar al tejido nativo cuando se utilizaron células progenitoras renales de origen humano cultivadas en 2D sobre una malla electrohilada formada por fibras de proteínas de la matriz extracelular renal y PCL en la misma proporción (Sobreiro-Almeida *et al.*, 2020). También se ha mezclado un hidrogel derivado de la matriz extracelular renal con metacrilato para generar una biotinta que contiene directamente células primarias de riñón humano, para ser sembradas en un constructo generado por impresión

1. Introducción

3D. Este cultivo celular se pudo mantener hasta catorce días con un 90% de viabilidad celular (Ali *et al.*, 2019). Otro tipo de composición, esta vez de matriz extracelular renal porcina en combinación con alginato fue validada para el co-cultivo de RPTEC y HUVEC. Las células fueron encapsuladas en esta biotinta híbrida y fueron sembradas utilizando un sistema de impresión 3D (Singh *et al.*, 2020).

1.5.2.3. Organoides

En los últimos años ha surgido un nuevo modelo como futuro de la terapia celular y la medicina regenerativa. Este modelo se basa en los organoides, que son cultivos celulares autoorganizados con una estructura tridimensional y derivados de células madre principalmente, que se tratan con factores de crecimiento y otros compuestos para su diferenciación. Los organoides renales tratan de recapitular las estructuras específicas y las características espaciales de los glomérulos, los túbulos y la vasculatura (Bonventre, 2018).

Varios estudios han explorado la formación de organoides renales desde diferentes enfoques, pero todos tienen algunos puntos en común, como el uso de factores de crecimiento y el mantenimiento del cultivo de células madre en placas con *coating* de proteínas de la matriz extracelular en los primeros pasos de la diferenciación y proliferación celular (Takasato *et al.*, 2019). Hay que tener en cuenta las diferencias entre los lotes de estos factores y optimizar al máximo los protocolos para evitar variaciones en los experimentos con líneas de células madre pluripotenciales (PSCs), tanto embrionarias como inducidas (Miyoshi *et al.*, 2019). Varios informes establecieron el uso de PSCs para la diferenciación de células progenitoras de nefronas (NPCs). Éstos demostraron que el cultivo de células en 2D en placas con *coating* de Matrigel con diferentes factores de crecimiento y factores de transcripción específicos implicados en el desarrollo del riñón conducía a la proliferación de diferentes linajes de células renales. Cuando se cultivaron en superficies de baja adherencia, estas células se ensamblaron espontáneamente en complejas estructuras 3D conocidas como organoides (Xia *et al.*, 2013).

El riñón es un órgano altamente vascularizado, por lo que la presencia de marcadores endoteliales es clave en los organoides renales. Para recapitular un componente vascular, Montserrat *et al.* implantaron organoides renales en la membrana corioalantoidea (CAM) del embrión de pollo, que es un tejido extraembrionario altamente vascularizado. Tras la implantación, los vasos sanguíneos de la CAM invadieron los organoides renales y la circulación de la sangre del embrión dentro de ellos se produjo al cabo de cinco días. También

1. Introducción

realizaron experimentos para analizar la importancia de la rigidez de la matriz extracelular en la formación y el desarrollo de organoides renales (Garreta *et al.*, 2019).

Sin embargo, trabajar con PSCs tiene algunas limitaciones. Una de ellas es que su cultivo es económicamente muy costoso, lo que hace que no sea una técnica ampliamente utilizada ni de rutina en los laboratorios de fisiología renal. Otro problema es que el protocolo para inducir organoides renales requiere mucho tiempo, en torno a un mes, por lo que el uso de este tipo de cultivo requiere también una inversión de tiempo hasta llegar a obtener resultados. Además, la reprogramación de las células teniendo en cuenta su estabilidad genética en largos periodos de cultivo sigue siendo un problema para generar un modelo de riñón estable. No obstante, las células madre adultas confieren una mayor estabilidad genómica que las PSCs, además de acortar los tiempos del protocolo de diferenciación para obtener los organoides renales (Jun *et al.*, 2018).

1.5.2.4. *Kidney-on-a-chip*

Inicialmente, en 2005, la tecnología denominada *organ-on-a-chip* empezó a desarrollarse con el objetivo de combinar aspectos claves de la ingeniería de tejidos y la microfluídica para reproducir el microambiente y la arquitectura de un tejido, haciendo uso de dispositivos microfluídicos, facilitando así el desarrollo de modelos en 3D que son capaces de recrear características esenciales de los tejidos que intentan reproducir (Zhang *et al.*, 2018). La microfluídica se define como la tecnología de sistemas que manipula fluidos en la escala submilimétrica, utilizando canales de dimensiones entre diez y cien micras (Whitesides, 2006). Este tipo de tecnología ha permitido que en los modelos de *organ-on-a-chip* haya un control del microentorno celular y aportar a dichos modelos señales tanto bioquímicas como mecánicas en un ambiente más fisiológico para las células. Los dispositivos microfluídicos pueden ser útiles como una opción para hacer análisis a gran escala de la respuesta celular a fármacos, químicos, toxinas o patógenos y puede ser útil en el ámbito farmacéutico, cosmético e incluso en materia de medio ambiente (Huh *et al.*, 2010).

El comportamiento de los líquidos en microfluídica está regido por el tipo de flujo (laminar o turbulento), por la tensión superficial y por las fuerzas capilares. El número de Reynolds es un valor adimensional proporcional a la velocidad de un fluido y al tamaño del sistema, e inversamente proporcional a la viscosidad del fluido. Este valor determina si es un flujo es laminar o turbulento. En el caso de la microfluídica, el número de Reynolds está casi siempre en el régimen de flujo laminar, lo que hace que la dinámica del fluido sea predecible

1. Introducción

(Sackmann, Fulton and Beebe, 2014). El concepto de *shear stress* es esencial para entender cómo funcionan estos modelos, ya que es la clave para estudiar los cambios morfológicos y funcionales de las células cuando están sembrada en dispositivos microfluídicos y se les expone a *shear stress* cuando se les somete a un caudal laminar determinado (Figura 1.5). El *shear stress* depende de la viscosidad del fluido, el caudal y las dimensiones de la estructura por donde discurre dicho fluido. Técnicamente, se define como la fuerza tangencial que se produce sobre una superficie, generando una tensión sobre la misma.

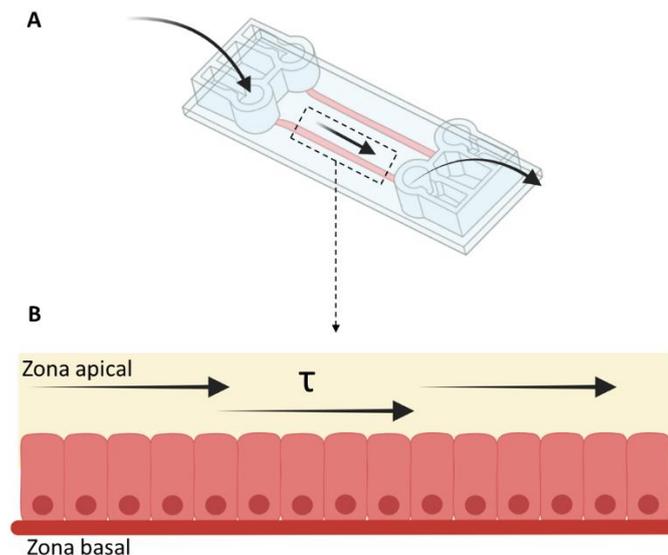


Figura 1.5. Aplicación de shear stress sobre cultivo celular en dispositivo microfluídico. El *shear stress* (τ) es una fuerza tangencial que se ejerce sobre el cultivo celular en la zona apical de las células dentro de los dispositivos microfluídicos (A) cuando se aplica un flujo determinado. Las flechas negras indican la dirección del flujo aplicado.

Uno de los primeros modelos de *kidney-on-a-chip* fue desarrollado por el grupo de Donald Ingber en el año 2013. El dispositivo consistía en un canal con una membrana recubierta con proteínas de la matriz extracelular que dividía el canal en un compartimento superior y otro inferior. En la parte superior se sembraron células epiteliales primarias de riñón humano formando una monocapa sobre la que se aplicó un caudal con un *shear stress* fisiológico de 0.2 dyn/cm^2 . Este modelo basado en tecnología microfluídica consiguió mimetizar lo que ocurre en el cuerpo humano ya que se produjo polarización de las células y la formación del cilio primario en comparación con el cultivo celular en Transwell que se utilizó como control. Además, este nuevo modelo hizo que las células renales exhibieran mayor transporte de albúmina, mayor reabsorción de glucosa y también mayor actividad fosfatasa alcalina (Jang *et al.*, 2013).

1. Introducción

Al someter a flujo células del túbulo proximal, utilizando la línea celular comercial llamada RPTEC/TERT1, se observaron cambios en la expresión de cerca de 10.400 genes con respecto a las células en estático, es decir, sin aplicar *shear stress*. También se vio aumento en la absorción de albúmina y la formación de uniones estrechas. El citoesqueleto también se reorganizó cuando se sometió a flujo el cultivo celular, además de observarse la presencia del cilio primario, un orgánulo mecanosensor implicado en varias vías de señalización celular y en la regulación de la morfología tubular (Ross *et al.*, 2021).

Más recientemente, dentro del uso de dispositivos microfluídicos, se han creado modelos más complejos haciendo uso de técnicas de bioimpresión para recrear estructuras tridimensionales más similares a las encontradas *in vivo*. Este tipo tecnología se ha utilizado para hacer un modelo de túbulo proximal en el que se utilizó matriz extracelular y mediante impresión se recreó una estructura tubular recubierta con células de túbulo proximal cuya luz podía ser perfundida con un *shear stress* fisiológico mediante la aplicación de flujo. Las células en este caso expresaron marcadores específicos de este tipo celular como la Na⁺/K⁺ATPasa, la acuaporina 1 (AQP1), k-cadherina y también estaba presente el cilio primario. Además, como en la mayoría de los modelos descritos de *kidney-on-a-chip*, se observó que las células con una perfusión controlada estaban más diferenciadas y polarizadas, aumentó el borde en cepillo, se produjo la deposición de proteínas de la membrana basal y aumentó la altura de las células, la expresión de megalina y la absorción de albúmina cuando se comparó con las mismas células en 2D sin perfusión. Otro factor a tener en cuenta en este modelo es que la rigidez que confirió la matriz extracelular era similar al encontrado en la corteza renal (Homan *et al.*, 2016). Al igual que con otros modelos descritos anteriormente, lo que se quiere conseguir son modelos más complejos, y para ello se recurre al co-cultivo de diferentes tipos celulares para crear estructuras más complejas y parecidas a lo que se encuentra en el riñón. Por este motivo, este mismo modelo de riñón *in vitro* se combinó con otro conducto similar al creado para las células renales pero con células endoteliales, recreando la estructura de un vaso sanguíneo, colocando ambas estructuras en paralelo para el estudio de la relación endotelio-epitelio en condiciones de homeostasis, pero también como modelo de enfermedades (Lin *et al.*, 2019).

Los diferentes tipos de modelos descritos han sido útiles para el estudio de la fisiología renal y para el estudio de enfermedades que afectan al riñón. Sin embargo, no se ha llegado a ningún consenso sobre qué tipo de modelos recapitulan mejor la estructura y función del tejido renal humano para así poder hacer uso de ellos de forma rutinaria en la investigación

1. Introducción

de la nefrotoxicidad tanto a fármacos ya comercializados como a nuevos fármacos en desarrollo.

1.6. Ensayos de nefrotoxicidad con modelos simples y complejos de riñón *in vitro*

En la actualidad, en los estudios preclínicos de nuevos fármacos, solo un 2-8% son rechazados por tener efectos nefrotóxicos. Sin embargo, la mayoría de los fármacos que producen nefrotoxicidad en la fase clínica no muestran estos mismos efectos en la fase preclínica, por lo que es evidente que hay que mejorar las estrategias para aumentar la predictibilidad de los modelos utilizados. Todavía no hay un modelo *in vitro* de riñón que sea ideal para el estudio de la nefrotoxicidad de fármacos, pero sí se están haciendo grandes avances al respecto, puesto que se están desarrollando modelos cada vez más complejos que tienen en cuenta la estructura tridimensional del riñón, los componentes de su matriz extracelular, el flujo al que están sometidas las células y también la combinación de varios tipos celulares, con el fin de mejorar la predicción del posible daño renal que puede causar la exposición a determinados fármacos (Faria *et al.*, 2019).

Varios de los modelos nombrados anteriormente han sido utilizados para ensayos de nefrotoxicidad. En un estudio donde se consiguió una estructura similar a la del túbulo proximal con el co-cultivo de fibroblastos, células endoteliales y células epiteliales de túbulo proximal en monocapa, se observó que había disminución de la viabilidad celular cuando éstas eran tratadas con cisplatino de una forma dosis-dependiente, y este efecto era revertido cuando se trataban con cimetidina (King *et al.*, 2017). La recelularización de matriz extracelular de riñón con células de túbulo proximal, en este caso ciPTEC-OAT1, recreando una estructura tridimensional, también se ha utilizado para ensayos de nefrotoxicidad con tres conocidos fármacos que causan daño renal, el cisplatino, tenofovir y ciclosporina A. Cuando las células fueron expuestas a estos fármacos se observó que eran sensibles a ellos y que podría ser una potencial plataforma para el cribado de nuevos fármacos antes del inicio de la fase clínica (Fedecostante *et al.*, 2018). Un modelo también basado en estructuras tridimensionales, en este caso generando esferoides con células renales, fue utilizado para comparar la sensibilidad a diferentes fármacos nefrotóxicos (cisplatino, ciclosporina A, acyclovir y doxorubicina) con el cultivo tradicional en 2D. Se observó que los esferoides

1. Introducción

renales eran más sensibles a cisplatino y ciclosporina A que las células en monocapa, viendo que la mayor parte de la muerte celular era debida a la apoptosis tras el tratamiento con dichos fármacos (Kang *et al.*, 2019).

Los modelos de *kidney-on-a-chip* también se han utilizado para testar la sensibilidad del cultivo celular tras haberse sometido a flujo con un *shear stress* fisiológico. Con ellos se han testado fármacos previamente citados como el cisplatino o la doxorubicina, y es un modelo que podría ser útil también en el cribado de nuevos fármacos ya que la toxicidad medida en estos dispositivos está más cerca de lo que sucede *in vivo* que los resultados obtenidos en cultivo celular convencional (Jang *et al.*, 2013; Qu *et al.*, 2018). Otro modelo de *kidney on-a-chip* ha sido utilizado en combinación con una plataforma, llamada OrganoPlate, que permite aumentar el número de ensayos independientes haciendo uso de cultivo celular recreando estructuras en tres dimensiones pudiendo aplicar *shear stress*, lo que les confiere más relevancia a nivel fisiológico que un cultivo tradicional en una placa multipocillo para el cribado de nuevos fármacos (Vormann *et al.*, 2018). Otra plataforma creada también para aumentar el número de ensayos en paralelo recreó estructuras tubulares embebidas en hidrogeles, las cuales mostraron mayor expresión de transportadores de fármacos que el cultivo control en 2D, lo que podría aumentar la sensibilidad a fármacos y tener unos resultados más próximos a lo que sucede *in vivo* (Bosch-fortea *et al.*, 2019).

Los modelos de riñón *in vitro* desarrollados hasta el momento han demostrado ser útiles para ensayos de nefrotoxicidad frente a nuevos fármacos, pero todavía queda mucho por avanzar. Estos nuevos modelos más complejos todavía no han logrado ser validados para las fases pre-clínicas en el desarrollo de fármacos y es debido a varias causas. Por un lado, son modelos que difícilmente pueden ser aplicables a gran escala para hacer cribados de fármacos debido a su complejidad, como los modelos basados en *organ-on-a-chip*, ya que la mayoría de los estudios que utilizan esta tecnología no usan dispositivos comerciales si no producidos a medida y esto limita su uso. Los modelos que hacen uso de proteínas de la matriz extracelular para recrear estructuras similares a las encontradas *in vivo* también tienen sus limitaciones, debido a que las células en estos modelos suelen estar embebidas dentro de hidrogeles y son de difícil acceso, por lo que los tratamientos con fármacos son difíciles de llevar a cabo en este tipo de modelo.

Actualmente se está avanzando en la recreación de estructuras tridimensionales partiendo de células madre, ya sean embrionarias o adultas, para hacer organoides renales, con la finalidad de crear estructuras más complejas y con más tipos celulares que cuando se utilizan líneas

1. Introducción

celulares comerciales, ya que el riñón es un órgano muy complejo con diversos tipos celulares. Estos modelos tienen la ventaja de que representan de manera más fidedigna el tejido renal por su complejidad, pero tienen también sus limitaciones, como por ejemplo que son protocolos que se alargan en el tiempo y económicamente son muy costosos, por lo que hacer cribados de fármacos con organoides es todavía un objetivo a alcanzar.

El modelo de riñón *in vitro* ideal todavía no se ha desarrollado, pero éste tendría que reunir ciertas características para que en un futuro pudiera utilizarse para reemplazar los modelos tradicionales de cultivo celular, y a su vez, disminuir el número de animales de experimentación que se utilizan para llevar a cabo ensayos de toxicidad a fármacos. Estas características podrían resumirse en las siguientes: uso de células de origen humano, recreación de estructuras tridimensionales que mimeticen las que se encuentran en el riñón, fácil acceso al cultivo celular para los ensayos con fármacos, fácil reproducción de resultados, uso de dispositivos comerciales, protocolos que sean accesibles y de fácil manejo, y, por último, que permitan testar fármacos a gran escala para reducir los tiempos y así también ahorrar costes.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO DE LA TESIS

2.1. Hipótesis

Los modelos de cultivo celular tradicionales utilizados hasta el momento no son suficientes para recrear el microentorno celular ni las características estructurales ni fisiológicas que se encuentran en el riñón. Por esta razón, en estudios de toxicidad de nuevos fármacos las células en cultivo convencional *in vitro* no responden de igual forma que en modelos animales y tampoco en las fases clínicas con pacientes. Por ello, el desarrollo de modelos de riñón *in vitro* más complejos, que se asemejen al tejido *in vivo* puede ser útil a su vez para el desarrollo de nuevos fármacos.

El uso de matrices biológicas con células de túbulo proximal renal genera estructuras complejas con forma tubular, haciendo que el fenotipo del cultivo celular sea más representativo del tejido renal, lo que hace que tanto su función como su morfología sean más biomiméticas en comparación con el cultivo celular tradicional.

El *shear stress* es un estímulo fisiológico que se produce en la zona apical de las células que forman el túbulo proximal. La aplicación de este estímulo mimetiza el microambiente físico-químico del tejido nativo, lo que representa de forma más fisiológica lo que ocurre en el riñón, mejorando el fenotipo de la línea RPTEC/TERT1 en comparación con el cultivo celular tradicional.

Los nuevos modelos de riñón *in vitro*, que se caracterizan por representar de forma más aproximada lo que ocurre en el tejido nativo, responden de forma diferente a la exposición a fármacos con potencial nefrotóxico cuando se comparan estos modelos más complejos con el cultivo celular tradicional.

2.2. Objetivos de la tesis

El objetivo principal es el desarrollo de modelos de riñón *in vitro* que incluyan estímulos biomecánicos y bioquímicos presentes *in vivo*, para su posterior validación como modelos de nefrotoxicidad y el estudio del daño renal producido por fármacos.

2.2.1. Objetivos específicos a desarrollar en cada capítulo

Desarrollo de un modelo de tubulogénesis inducida por componentes de la ECM para ensayos de nefrotoxicidad:

- Generación de estructuras tubulares directamente sobre superficies plásticas para eliminar el uso de hidrogeles y facilitar los ensayos de nefrotoxicidad producida por fármacos.
- Desarrollo de un modelo capaz de reducir costes y que sea una herramienta útil para ensayos de alto rendimiento.
- Caracterización del modelo de tubulogénesis y compararlo con el cultivo celular tradicional a partir de diferentes técnicas como la inmunofluorescencia, el transporte de fármacos y la expresión de marcadores específicos de las células epiteliales del túbulo proximal renal.

Desarrollo y comparación de modelos de cultivo perfundido en dispositivos microfluídicos para ensayos de nefrotoxicidad:

- Desarrollo de un modelo de *kidney-on-a-chip* con tecnología microfluídica para mejorar el fenotipo de la línea RPTEC/TERT1 y compararlo con el cultivo celular tradicional.
- Aplicación de shear stress fisiológico con diferentes sistemas fluidicos y analizar las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos.
- Caracterización del modelo *kidney-on-a-chip* mediante el estudio de la presencia de marcadores específicos y cambios en la expresión génica para compararlo con el modelo de cultivo celular tradicional.

Validación de los modelos experimentales en ensayos de nefrotoxicidad:

- Desarrollo de protocolos de toxicidad de fármacos con la línea celular RPTEC/TERT1.
- Comparación del efecto nefrotóxico de la daunorrubicina y el cisplatino en el modelo de tubulogénesis respecto al modelo de cultivo celular tradicional mediante estudios cinéticos.
- Comparación del efecto nefrotóxico de la daunorrubicina, el tacrolimus y el cisplatino en el modelo de *kidney-on-a-chip* respecto al modelo de cultivo celular tradicional mediante estudios cinéticos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. 1. Cultivo celular

La línea celular RPTEC/TERT1 (Evercyte GmbH, Austria) fue mantenida en medio de cultivo cuya composición es una mezcla de DMEM-F12 sin glutamina, sin HEPES (BioWest L0090) y DMEM-F12 sin glutamina, sin HEPES, sin glucosa (BioWest L0091) teniendo una concentración final de glucosa de 5 mM y suplementado con 10 mM HEPES (Biochrom AGL1613), 2 mM GlutaMax (Gibco 35050-038), hEGF 10 ng/ml (Sigma E9644), T3 5 pM (Sigma T6397), L-ácido ascórbico 3.5 µg/ml (Sigma A4544), transferrina Holo 5 µg/ml (Merck 616424), prostaglandina E1 25 ng/ml (Sigma P8908), hidrocortisona 25 ng/ml (Sigma H0396), selenito de sodio 8.65 ng/ml (Sigma S5261), G418 100 µg/ml (InvivoGen ant-gn-5) e Insulina 5 µg/ml (Sigma I9278). A este medio de cultivo se le denominó BW5C.

Las células se mantuvieron en cultivo celular en frascos de 25 cm² (TPP, 90026), con un volumen de 6ml, hasta llegar a la confluencia en un incubador a 37°C con 5% de CO₂. Para hacer el pase de las células, primero se aspira el medio de cultivo y se añaden 5 ml de PBS 1x (Lonza, BE17-516F). Se vuelve a aspirar y se añaden 500 µl de tripsina-EDTA 1x (Gibco, 25300054); a continuación, se deja el frasco en el incubador durante 3-5 minutos hasta que las células dejan de estar adheridas a la superficie del mismo. Para inhibir la acción de la tripsina, se añaden 500 µl de inhibidor de tripsina D'TI (Gibco, R007100) y se añaden 4ml de medio de cultivo. Una vez obtenida la suspensión celular en un tubo, se añaden 100 µl a 10 ml de solución Isoton en un recipiente previamente preparado para hacer el conteo celular, para el que se utiliza un contador de células (Beckman, Z Series Coulter Counter). Para el mantenimiento de la línea celular en cultivo se siembran a una densidad de 6x10⁴ células/cm² en un frasco de 25 cm² con 5 ml de medio de cultivo BW5C, que ha sido equilibrado en el incubador 15 minutos antes del pase celular.

3.2. Protocolo de cultivo celular para la generación del modelo de tubulogénesis 2.5D

3.2.1. Tubulogénesis 2.5D sobre hidrogeles de Matrigel y Colágeno I

El primer paso fue preparar un hidrogel de colágeno I a partir del stock (Corning, 354236; 3,36 mg/ml, colágeno I de cola de rata) para tener una concentración final de 2 mg/ml en un volumen final de 200 μ l (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Preparación de solución de colágeno 2 mg/ml. Proporciones de todos los componentes de la solución de colágeno I a partir del stock de 3.36 mg/ml.

Hidrogel	Volumen (μ l)
Colágeno I stock	119
NaOH 1 N	2,97
DMEM 5x	40
Agua MilliQ	37,98

Para generar hidrogeles con diferentes composiciones, se mezclaron soluciones de colágeno I y Matrigel (MG) (Corning, 354234) en tres proporciones diferentes (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Preparación de los diferentes hidrogeles con colágeno I y Matrigel. Se prepararon diferentes proporciones de colágeno I 2 mg/ml con MG, a las que se les añadió medio de cultivo en una proporción 2:1.

Proporción Col I/MG	Colágeno I 2.0 mg/ml (μ l)	Matrigel (μ l)	Concentración mix colágeno I + MG (mg/ml)	Concentración final del hidrogel diluido 2:1 (mg/ml)
90: 10	225	25	2.83	1.88
70 : 30	175	75	4.49	2.99
50 : 50	125	125	6.15	4.1

3. Material y métodos

Con el fin de comprobar cómo se comportan las células sobre los diferentes hidrogeles, se utilizó el μ -Slide *Angiogenesis* (IBIDI, 81506), que contiene quince pocillos para testar las diferentes condiciones. Los pocillos constan de una parte inferior donde se añade el hidrogel, y debido a su pequeño tamaño solo es necesario un volumen de 10 μ l, en comparación con el volumen que sería necesario en una placa multipocillo de cultivo celular convencional. Además, debido a su geometría, no se genera menisco en el hidrogel, haciendo que la superficie del mismo sea plana y que las células crezcan de forma regular, lo que permite también una mejor visualización. A su vez, el volumen de medio de cultivo del pocillo es también bajo, de 50 μ l, en comparación con una placa multipocillo convencional (Figura 3.1). Dos ventajas de este formato respecto a una placa multipocillo es que el material de la base tiene unas propiedades ópticas que permiten una óptima visualización de las células mediante microscopía convencional, de fluorescencia y confocal. La segunda ventaja es que el formato *slide* permite que pueda usarse directamente en microscopía y también en un lector de placas.

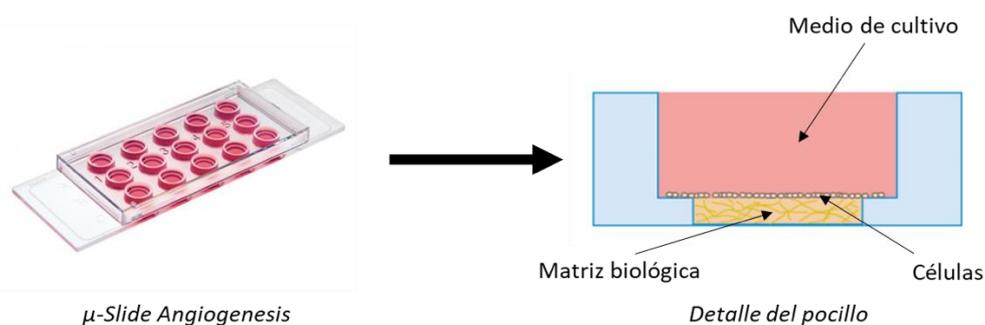


Figura 3.1. μ -slide *Angiogenesis* de IBIDI con detalle del pocillo. Cada *slide* consta de 15 pocillos, y cada pocillo está dividido a su vez en dos alturas. En la base del pocillo el diámetro es menor y es donde se añade el hidrogel. Una vez polimerizado el hidrogel se siembran las células sobre él, quedando el cultivo celular encima de la matriz biológica.

Una vez preparadas las diferentes soluciones de colágeno-Matrigel, se añadieron 10 μ l por pocillo en el μ -Slide *Angiogenesis* y se incubó a 37°C durante 30 minutos hasta que polimerizan los hidrogeles. Una vez polimerizados, se sembraron en su superficie las células a una concentración de: 4×10^5 c/ml en un volumen de 50 μ l/pocillo, para alcanzar una densidad de 160.000 células/cm². Para comprobar la capacidad de tubulogénesis de la línea celular RPTEC/TERT1, se sembraron las células con o sin un 5% de Matrigel añadido a la suspensión celular. Tras 24h, el tipo de estructuras que se habían formado sobre los hidrogeles se documentó mediante microscopía de campo claro y se valoró la generación de las estructuras tubulares de forma subjetiva mediante la toma de fotos en el microscopio, tanto de campo claro como con microscopía confocal.

3.2.2. Cultivo celular con lamininas L511 y L521

El hidrogel que se utilizó para sembrar las células sobre su superficie fue el anteriormente mencionado, constituido por una mezcla entre colágeno I y Matrigel en una proporción 90:10 al que se añadió medio de cultivo en una proporción 2:1 respecto al hidrogel (Tabla 2) en un μ -Slide *Angiogenesis*. En este caso, la suspensión celular de RPTEC/TERT1 a la misma concentración previamente descrita, se mezcló con 10% Laminina 511 (BioLamina, LN511-0202), 10% Laminina 521 (BioLamina, LN521-02), o 10% Laminina 511 + 10% Laminina 521. La concentración del stock de ambas lamininas es 0.1 mg/ml en HBSS, por lo que la concentración final fue de 0.01mg/ml. Tras 24h se observó si en las diferentes condiciones se habían generado estructuras tubulares mediante microscopia de campo claro.

3.2.3. Tubulogénesis 2.5D directamente sobre *slide* con *coating* de ECM

Para reproducir el modelo de tubulogénesis 2.5D en ausencia de hidrogel se cultivaron las RPTEC directamente sobre la superficie del μ -Slide *Angiogenesis* que previamente había recibido un *coating* con proteínas de la ECM. Para ello se analizaron siete condiciones diferentes detalladas en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Diferentes tipos de coating con colágeno I, laminina 511 y laminina 521. Se testaron siete tipos de coatings diferentes, todos ellos en una proporción 1:10.

Tipo de recubrimiento	Composición
Colágeno I (stock 3.36 mg/ml) (1:10)	5 μ l colágeno I + 45 μ l ácido acético 0.02 N
Colágeno I + Laminina 511 (1:10)	2.5 μ l colágeno I + 2.5 μ l L511 + 45 μ l HBSS
Colágeno I + Laminina 521 (1:10)	2.5 μ l colágeno I + 2.5 μ l L521 + 45 μ l HBSS
Matrigel (1:10)	5 μ l MG + 45 μ l medio de cultivo BW5C
Matrigel-GFR (1:10)	5 μ l MG-GFR + 45 μ l en BW5C
Laminina 511 (1:10)	5 μ l L511 + 45 μ l HBSS
Laminina 521 (1:10)	5 μ l L521 + 45 μ l HBSS

3. Material y métodos

Para testar los diferentes *coatings* se recubrió cada pocillo con 25 μl de cada dilución y se dejó una hora a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se lavaron los pocillos con HBSS y finalmente se sembraron las células RPTEC/TERT1 de dos formas, añadiendo a la suspensión celular un 5% de MG o sin él, a una concentración de 4×10^5 c/ml, con un volumen de 50 μl /pocillo, lo que resulta en una densidad de 160.000 células/ cm^2 . Tras tres días en cultivo celular se tomaron fotografías utilizando un microscopio de campo claro para observar la conformación que habían adquirido las RPTEC/TERT1 en las diferentes condiciones.

3.4. Protocolo de siembra en dispositivos microfluídicos

3.4.1. Protocolo de siembra en dispositivo *be-gradient*

El dispositivo microfluídico denominado *be-gradient*, fue fabricado con COP y el diseño fue desarrollado en el grupo TME Lab de la Universidad de Zaragoza. Consta de dos canales laterales y una cámara central, la cual está comunicada con los canales laterales por unos pilares que separan ambos compartimentos. La pieza de COP fue adherida a una placa de Petri p60 con adhesivo biocompatible, siendo la misma placa la base sobre la que se siembran las células. Previo a su uso, los dispositivos ya montados en las placas se esterilizaron perfundiendo etanol al 70% por las entradas tanto de los canales laterales como de la cámara central. Tras 10 minutos, se aspiró y se hicieron tres lavados con agua destilada estéril. Para favorecer la adhesión celular y el paso del medio a través de los canales y la cámara, se hizo un tratamiento con plasma de oxígeno con una máquina de tratamiento de superficie por plasma (Diener electronic, Plasma Surface Technology). Los parámetros utilizados fueron: presión 30% 50% oxígeno durante un minuto. Finalmente, la cámara central es donde se siembra el cultivo celular y los canales laterales se utilizan para perfundir el medio de cultivo y que llegue a la cámara central, ya que están comunicadas ambas partes por los pilares (Figura 3.2). Las dimensiones del dispositivo son las siguientes:

- Área cámara central: 13.394 mm^2
- Volumen cámara central: 4.0182 mm^3
- Área canal lateral: 9.0125 mm^2
- Volumen canal lateral: 2.7037 mm^3

3. Material y métodos

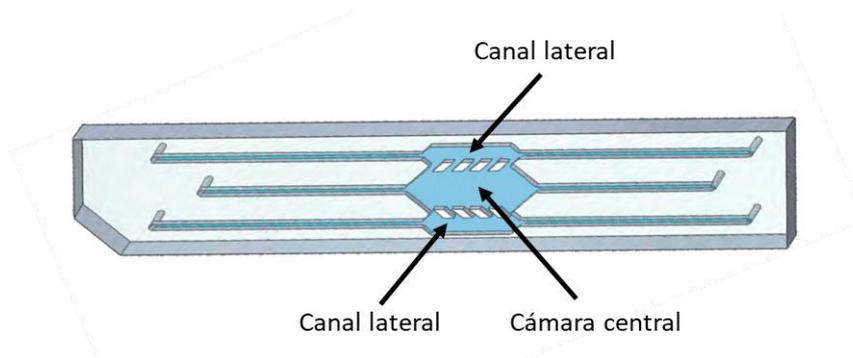


Figura 3.2. Diseño del dispositivo microfluídico de COP. El dispositivo consta de una cámara central, donde se sembraron las células RPTEC/TERT1, y dos canales laterales por donde se perfundi6 el medio de cultivo para el mantenimiento del cultivo celular.

Las células RPTEC/TERT1 fueron sembradas a partir de una concentración inicial de 5.5×10^6 c/ml. A la suspensión celular obtenida se a6adi6 un 20% de Matrigel y se pipetearon $10 \mu\text{l}$ dentro de la c6mara central. El n6mero de c6mulas en los $10 \mu\text{l}$ de la suspensi6n celular fue de 44.000 c6mulas. El volumen total de la c6mara central es de $4 \mu\text{l}$, pero se pipetearon los $10 \mu\text{l}$ para asegurar que la c6mara central quedara completamente ocupada por la suspensi6n celular con el 20% de Matrigel. Por lo tanto, te6ricamente el n6mero de c6mulas que finalmente se sembraron en la c6mara central fue 17.600 c6mulas, resultando en una densidad aproximada de 130.000 c6mulas/ cm^2 . Tras dejar que se adhirieran las c6mulas durante una hora, se a6adi6 medio de cultivo BW5C por los canales laterales sin quitar el medio de cultivo con Matrigel de la c6mara central, y finalmente se llen6 de medio de cultivo la placa Petri p60 donde estaba adherido el dispositivo. Tras cuatro d6as en cultivo celular se procedi6 a hacer inmunofluorescencia para observar las estructuras tubulares dentro del dispositivo mediante microscop6a de fluorescencia.

3.4.2. Siembra en dispositivo microflu6idico de tres canales (COP-3)

El dispositivo, denominado comercialmente BE-FLOW (BeOnChip), al que nos referiremos de aqu6 en adelante como COP-3, consta de tres canales paralelos con reservorios en cada extremo del canal (Figura 3.3). Las dimensiones del dispositivo son especificadas en la Tabla 3.4:

3. Material y métodos

Tabla 3.4. Especificaciones del dispositivo BE-FLOW de tres canales (COP-3).

Dispositivo COP-3	
Altura canal	0.2 mm
Anchura canal	1.2 mm
Longitud canal	24.6 mm
Área canal	29.52 mm ²
Volumen canal	5.9 µl
Altura reservorio	9.36 mm
Diámetro reservorio	2.2 mm
Volumen reservorio	28.2 µl

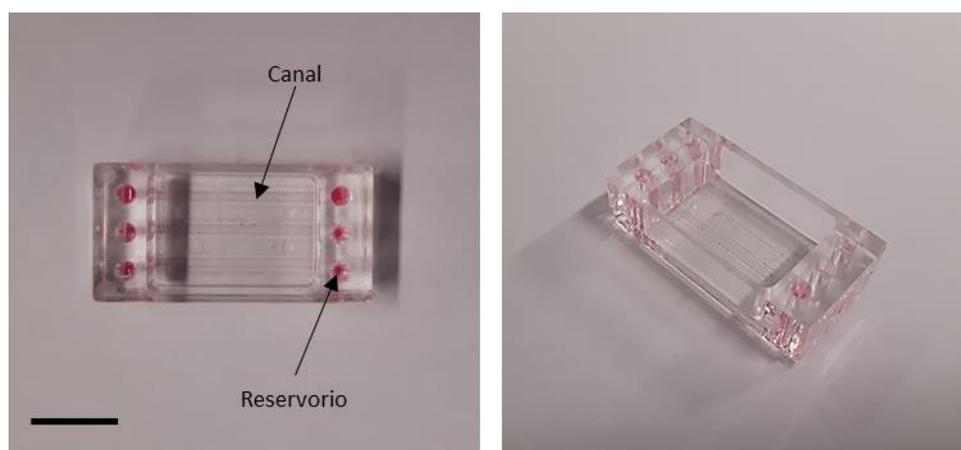


Figura 3.3. Dispositivo microfluídico de tres canales BE-FLOW (COP-3). El dispositivo está fabricado con COP y está adherido a una lámina del mismo material mediante adhesivo biocompatible. Está formado por tres canales paralelos, cada uno de ellos con un reservorio en los extremos del canal. Barra de escala 10 mm.

El suelo del dispositivo es una lámina de COP adherida a la pieza superior, también de COP, mediante adhesivo biocompatible. Previo a la siembra de las células, se aplicó plasma de oxígeno al 30%, a una presión del 50%, durante un minuto y posteriormente se esterilizaron los canales con etanol al 70% durante diez minutos y se eliminó pasando agua destilada tres veces por los canales.

Para realizar la siembra en los dispositivos se utilizó la línea celular RPTEC/TERT1. Tras la tripsinización, se sembraron a una concentración de 12.5×10^6 células/ml. En cada canal se

3. Material y métodos

añadieron 10 μl , es decir, 423.500 células/ cm^2 de la suspensión celular a dicha concentración, y se esperó tres horas hasta que las células estuviesen adheridas a la superficie del canal. Tras ese tiempo, se añadieron 60 μl de medio de cultivo BW5C para llenar los reservorios. Los dispositivos, que tras la siembra estaban en torno a un 50% de confluencia, aunque había cierta variabilidad entre dispositivos, se dejaron en estático, es decir, en el incubador sin la aplicación todavía de *shear stress*, durante cinco días hasta observar una monocapa completa en los canales, con un cambio de medio cada 24h.

3.4.3. Siembra en dispositivo microfluídico de dos canales (COP-2)

Este dispositivo microfluídico (Be-flow estándar, BeOnChip), consta de dos canales en paralelo con reservorios en ambos extremos, además de un reservorio también a cada extremo al que se le añade agua destilada estéril para disminuir la evaporación del medio de cultivo de los reservorios (Figura 3.4). El material utilizado para su fabricación es el mismo que el del chip COP-3, pero en este dispositivo las diferentes piezas están adheridas mediante termocompresión en lugar de con adhesivo biocompatible. Para favorecer la adhesión celular, estos dispositivos también están tratados con plasma de oxígeno. Las dimensiones del dispositivo se detallan en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Dimensiones del dispositivo de dos canales Be-flow (COP-2).

Dispositivo COP2	
Altura canal	375 μm
Anchura canal	1.5 mm
Longitud canal	43 mm
Área canal	64.5 mm^2
Volumen canal	28.5 μl
Altura reservorio	5 mm
Diámetro reservorio	3.6 mm
Volumen reservorio	185 μl

3. Material y métodos

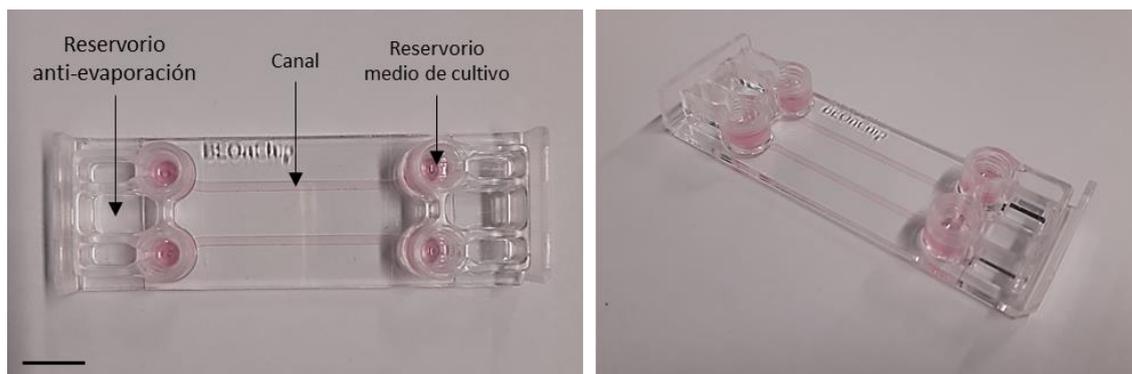


Figura 3.4. Dispositivo microfluídico de dos canales BE-FLOW de BeOnChip (COP-2). Este dispositivo tiene un área igual a la de un portaobjetos convencional. Consta de dos canales independientes en paralelo donde se siembran las células, y un reservorio a cada lado del canal para añadir medio de cultivo. Entre los reservorios de los canales hay un reservorio al que se añade agua o PBS para evitar la evaporación del medio de cultivo. Barra de escala 10 mm.

Antes de llevar a cabo la siembra, se aplicó un *coating* en ambos canales de colágeno I (Corning, 354236). Se parte de un stock de Colágeno I de rata a 3,36 mg/ml, que es diluido en ácido acético 0.02 N en una proporción 1:10, por lo que la concentración final de colágeno I es 33,60 $\mu\text{g/ml}$. Se añaden 50 μl de esta solución de trabajo por canal y se deja en el incubador a 37°C durante una hora. Pasado este tiempo, se aspira la solución, se hacen tres lavados con 200 μl de HBSS por canal y se aspira para retirarlo completamente.

La siembra en los dispositivos se hizo a una concentración de 2.2×10^6 células/ml de medio de cultivo ProxUp y se añadieron 30 μl de la suspensión celular, es decir, 102.325 células/ cm^2 . Después de 3h se rellenaron los reservorios con 200 μl de medio de cultivo. El medio de cultivo ProxUp (Evercyte, MHT-003) está compuesto por DMEM/F12 (1:1) (PAN-Biotech, Cat# P04-41154), 10 mM HEPES-buffer (Sigma-Aldrich, Cat# H0887), 10 ng/ml hEGF (Sigma-Aldrich, Cat# E9644), 5 pM T3 (T3, Sigma-Aldrich, Cat# T6397), 3.5 $\mu\text{g/ml}$ L-ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Cat# A4544), 5 $\mu\text{g/ml}$ holo-transferrina (Merck Millipore, Cat# 616424), 25 ng/ml prostaglandina E1 (Sigma-Aldrich, Cat# P8908), 25 ng/ml hidrocortisona (Sigma-Aldrich, Cat# H0396), 8.65 ng/ml selenito de sodio (Sigma-Aldrich, Cat# S5261), 5 $\mu\text{g/ml}$ insulina (Sigma-Aldrich, Cat# I9278) y 100 $\mu\text{g/ml}$ G418 (InvivoGen, Cat# ant-gn-5). Los dispositivos COP-2 se dejaron en un balancín (Perfusion rocker Mini, MIMETAS) a 0.5 rpm con una inclinación de 7° dentro del incubador a 37°C. El flujo teórico que se aplicaba con el balancín fue calculado con MatLab y corresponde a 14.25 $\mu\text{l/min}$, lo que equivale según la geometría del canal a un *shear stress* de 0.01 dyn/cm^2 , muy por debajo del fisiológico. Tras 72h en esas condiciones, con renovación del medio de cultivo cada 24h, llegaron a formar una monocapa completa en los canales.

3.4.4. Siembra en dispositivo microfluídico de seis canales IBIDI (PS-6)

Este dispositivo de poliestireno (*μ-Slide* VI 0.4, Ibidi), consta de seis canales en paralelo con reservorios en cada extremo del canal que permiten conexiones fluidicas de tipo luer (Figura 3.5). Las dimensiones del dispositivo son las referidas en la Tabla 6.

Tabla 6. Dimensiones del dispositivo de seis canales IBIDI (PS-6).

Dispositivo PS6	
Altura canal	0.4 mm
Anchura canal	3.8 mm
Longitud canal	17 mm
Superficie cultivable	30 mm ²
Volumen canal	30 μl
Volumen reservorio	60 μl

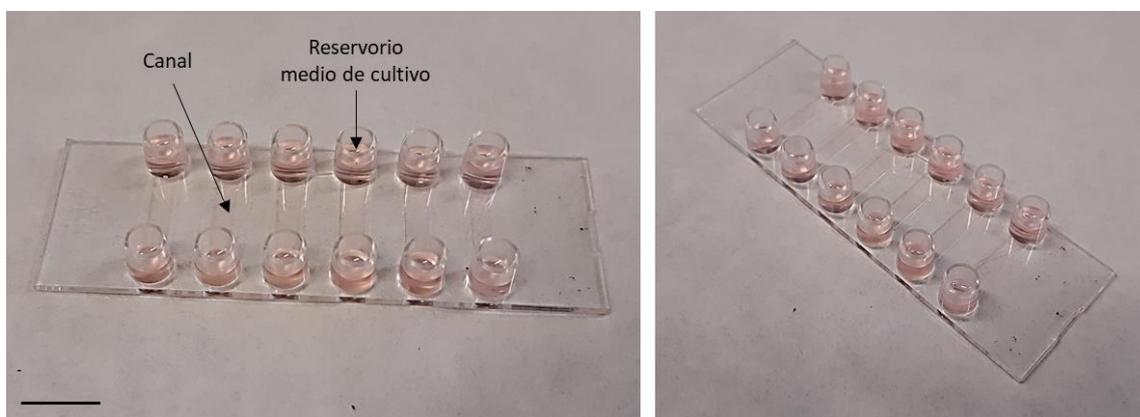


Figura 3.5. Dispositivo microfluídico de seis canales de IBIDI (PS-6). Este dispositivo consta de seis canales en paralelo donde se sembraron las RPTEC/TERT1. Cada canal tiene un reservorio en cada uno de sus extremos para añadir el medio de cultivo. Barra de escala 10 mm.

En este caso, se siguieron dos protocolos de siembra de las RPTEC/TERT1. En el Protocolo 1, se sembraron las células a una concentración de 4.5×10^6 células/ml. De esta suspensión celular se añadieron 30 μl/canal, resultando una densidad de 225.000 células/cm². Una vez sembradas las RPTEC/TERT1, se dejaron en una cámara húmeda para evitar la evaporación

3. Material y métodos

en un incubador a 37°C durante 24h. Tras este tiempo, se añadieron 120 µl/canal de medio de cultivo BW5C.

En el Protocolo 2, se sembraron las células a una concentración de 2.2×10^6 células/ml, lo que equivale a 110.000 células/cm². Se añadieron 30 µl de la suspensión celular y se esperaron 24h para añadir 120 µl de medio BW5C en cada canal. En este caso, se mantuvo el cultivo celular en un balancín a 0.5 rpm con un ángulo de 7°, con un cambio de medio cada 24h hasta llegar a la confluencia pasadas 96h.

3.5. Aplicación de *shear stress* en dispositivos microfluídicos

3.5.1. Cálculo del *shear stress* aplicado en el cultivo celular en los dispositivos microfluídicos

La fórmula utilizada para el cálculo del *shear stress* viene determinada por la viscosidad del medio de cultivo sin suero (dyn x sec/cm²), por el caudal (cm³/sec) y por la geometría rectangular del canal, teniendo en cuenta la altura del canal al cuadrado y la anchura. La viscosidad del medio de cultivo sin suero utilizada para el cálculo del *shear stress* en todos los casos es de 0.0072 dyn x sec/cm².

$$\tau \text{ (dyn/cm}^2\text{)} = \frac{6 \times \text{Viscosidad medio de cultivo (dyn x } \frac{\text{sec}}{\text{cm}^2}\text{)} \times \text{Caudal (} \frac{\text{cm}^3}{\text{sec}}\text{)}}{\text{Altura canal}^2 \text{ (cm)} \times \text{Anchura canal (cm)}}$$

3.5.2. Calibración de la bomba peristáltica

Para la aplicación de flujo con la bomba peristáltica (Ismatec, Masterflex Reglo Independent Channel Control (ICC)), primero hubo que calibrarla para conocer el caudal que se generaba, para así saber qué flujo es necesario para alcanzar el *shear stress* fisiológico que se quería aplicar sobre el cultivo celular en los dispositivos. Para ello, se calibró la bomba para cada uno de los dispositivos y el procedimiento fue el mismo en todos los casos.

Se tomaron medidas del flujo a diferentes velocidades dadas por la bomba peristáltica, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 19 rpm. Para cada una de las velocidades, se tomaron dos medidas, rellenando el

3. Material y métodos

reservorio con agua, y se midió el flujo durante 10 minutos. Previamente, se pesan los tubos Eppendorf donde se va a recoger el volumen de agua, y tras las medidas, se vuelven a pesar los tubos, restando este último valor al peso del tubo Eppendorf vacío. Como la densidad del agua es de 1 g/ml, se obtuvieron finalmente las unidades en $\mu\text{l}/\text{minutos}$, dividiendo los μl de cada medida entre los 10 minutos en los que se había recogido el volumen de agua. El caudal obtenido en $\mu\text{l}/\text{min}$ se convierte a cm^3/s , y junto a las dimensiones del canal y la viscosidad, se obtiene el *shear stress* aplicado a cada una de las velocidades de la bomba peristáltica. Para poder conocer el caudal necesario para llegar al *shear stress* teórico que se quiere aplicar finalmente en el cultivo celular, se calcula el caudal para diferentes valores de *shear stress*, teniendo en cuenta las dimensiones del canal de los dispositivos y la viscosidad del medio de cultivo que se va a utilizar. Esto se hace mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Caudal } (\mu\text{l}/\text{min}) = \frac{60000 \times \tau \times \text{Ancho canal (cm)} \times \text{Altura(cm)}^2}{6 \times \text{Viscosidad (dyn x sec/cm}^2)}$$

Hay que hacer una recta de calibración para poder interpolar los datos obtenidos y así calcular las revoluciones por minuto (rpm) necesarias para aplicar el caudal que finalmente se va a utilizar para aplicar el *shear stress* tanto por debajo del fisiológico como el fisiológico, que en todos los casos será alrededor de 0.2 dyn/cm^2 . Esta recta de calibración se obtiene mediante la fórmula siguiente fórmula:

$$y = ax + b$$

El valor R^2 debe ser 1 o próximo a esa cifra para saber que la recta de calibración es correcta. Finalmente, se interpolan los datos del caudal calculados teóricamente en la recta de calibración, y se obtienen finalmente las rpm que hay que utilizar en la bomba peristáltica para alcanzar el *shear stress* a aplicar según el caudal.

3.5.3. Medidas de flujo de bomba peristáltica con sensor

Para observar el tipo de flujo pulsátil aplicado con la bomba peristáltica, se conectó el circuito completo de tubos con el dispositivo COP-3, y antes del chip se conectó un sensor de flujo (Sensirion LG16-0430) para recoger los datos del patrón de flujo que se aplicaba justo a la entrada del dispositivo.

3.5.4. Perfusión en dispositivo COP-3

Tras sembrar el dispositivo y obtener una monocapa completa en los canales, se aplicó un flujo de medio de cultivo BW5C mediante una bomba peristáltica (Figura 3.6). Para impulsar el medio de cultivo con la bomba peristáltica, se utilizó tubo Tygon de un diámetro interno de 0.25 mm (VWR, 224-0144). Este tubo a su vez se conectó mediante conectores 1/16"-luer macho (IBIDI, Cat. No. 10826) y 1/16"-luer hembra (IBIDI, Cat. No. 10825) a tubo Tygon de 0.79 mm de diámetro interno (Saint-Gobain, Tygon S3 E-3603). Los conectores luer son conectores cónicos que pueden ser hembra o macho, y que se acoplan entre ellos mediante rosca, con el fin de conectar tubos diferentes sin que haya fugas del medio de cultivo. Los tres canales del dispositivo se conectaron en serie con este mismo tubo ya que el diámetro externo del tubo, que es 2.38 mm, y el diámetro interno de los reservorios del dispositivo es aproximadamente el mismo, por lo que las conexiones se hicieron directamente, sin necesidad de conectores, introduciendo el tubo en los reservorios a presión.

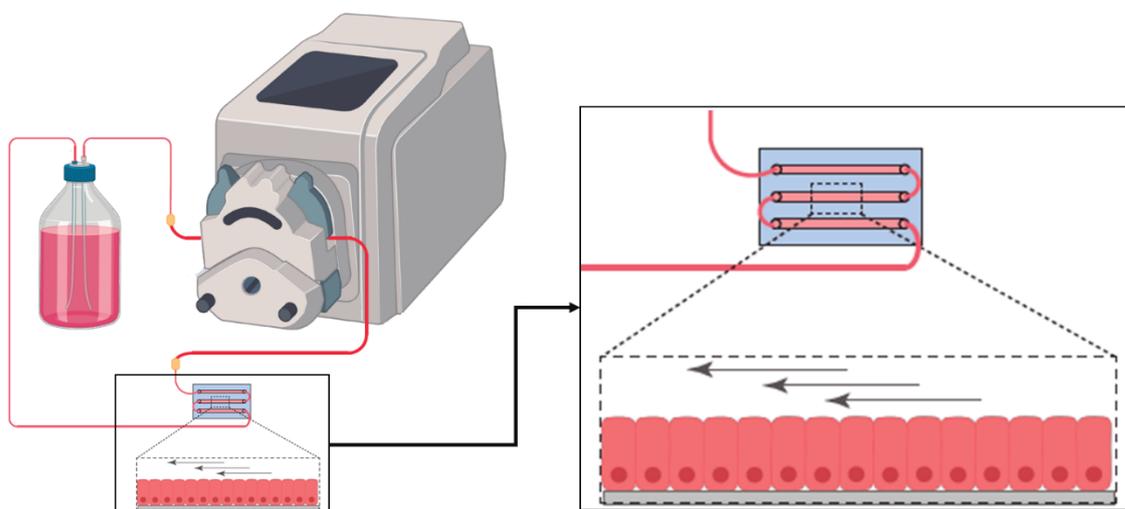


Figura 3.6. Sistema a flujo con bomba peristáltica con el dispositivo COP-3. El medio de cultivo fue perfundido en el COP-3 con una bomba peristáltica. El circuito cerrado consta de un reservorio con medio de cultivo conectado al dispositivo con tubo Tygon.

Antes de conectar el dispositivo al circuito cerrado, éste se cebó con el medio de cultivo BW5C que se va a utilizar para el experimento a flujo, y así evitar la aparición de burbujas de aire en los tubos, además de para equilibrar los gases disueltos en el medio cultivo con la temperatura del incubador a 37°C. Para ello, se monta todo el sistema de tubos, y la parte donde posteriormente se va a conectar el dispositivo se sustituye por tubo Tygon de diámetro interno 0.8 mm conectado por sus extremos con conectores luer hembra 1/16". Se ceba el sistema durante una hora y se procede a conectar el dispositivo. Para ello, se utiliza una pinza

3. Material y métodos

en el extremo del tubo de la bomba peristáltica que va a ir conectado mediante un conector luer macho 1/16" al conector luer hembra 1/16" situado a la entrada del tubo Tygon conectado al primer canal del dispositivo. Esto se hace para evitar el vaciamiento de los tubos y que quede medio de cultivo en el conector luer macho 1/16" del tubo de la bomba peristáltica para no introducir aire en el dispositivo. El dispositivo se conecta a una jeringuilla con 3 ml de medio por el luer hembra 1/16" de la salida de flujo del dispositivo. De esta manera, se van rellenando los tubos conectados en serie del dispositivo, hasta llegar al tubo Tygon de entrada de flujo al dispositivo. Una vez llega el medio hasta el conector luer hembra 1/16", se conecta con el luer macho 1/16" del tubo Tygon de la bomba peristáltica previamente obstruido con la pinza. De esta manera no quedan burbujas dentro del sistema y ya puede conectarse a la bomba peristáltica (Figura 3.7).

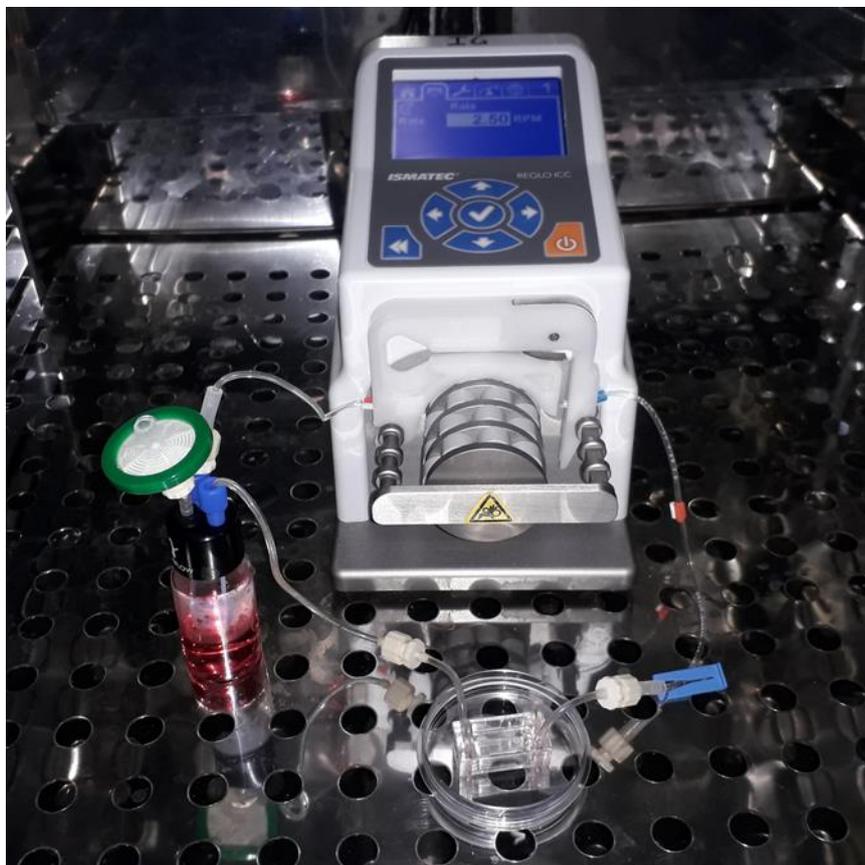


Figura 3.7. Sistema a flujo con dispositivo COP-3 en incubador. Como se observa en la imagen, el reservorio con medio de cultivo está conectado a un tubo Tygon que va directamente a la bomba peristáltica, la cual impulsa el medio a través del tubo hasta llegar al dispositivo COP-3, en el que sus tres canales están conectados en serie. Una vez que el medio de cultivo pasa por el COP-3, vuelve al reservorio, recirculando así el medio de cultivo por todo el sistema.

3. Material y métodos

Teniendo en cuenta las dimensiones de los canales del dispositivo, la bomba peristáltica se programó a 2.5 rpm equivalentes a un caudal de 13.33 $\mu\text{l}/\text{min}$, aplicando así un *shear stress* de 0.2 dyn/cm^2 . El cultivo celular se mantuvo bajo el estímulo del flujo de medio de cultivo BW5C, con un volumen de 5 ml recirculando en el sistema cerrado, durante 72h. Simultáneamente, se usó como control de cultivo convencional sin *shear stress* otro dispositivo sembrado en las mismas condiciones al que se mantenía con renovación del mismo medio de cultivo cada 24h.

3.5.5. Perfusión en dispositivo de COP-2

Flujo pulsátil - Bomba peristáltica

Una vez los canales presentaban una monocapa completa, se aplicó flujo con la bomba peristáltica con 3 ml de medio de cultivo BW5WF añadido en el reservorio. El medio BW5WF no tiene los complementos del medio BW5C utilizado para la proliferación y mantenimiento del cultivo celular. Está compuesto por DMEM-F12 sin glutamina, sin HEPES (BioWest L0090) y DMEM-F12 sin glutamina, sin HEPES, sin glucosa (BioWest L0091) teniendo una concentración final de glucosa de 5 mM al que se añade una concentración final de 10 mM de HEPES (Biochrom AGL1613) y 2 mM de GlutaMax (Gibco 35050-038).

En este caso, se utilizó tubo Tygon con un diámetro interno de 0.51 mm (228-1686, VWR) para impulsar el medio de cultivo con la bomba peristáltica. El resto del sistema se compone de tubo PTFE con un diámetro interno de 1/16" (Darwin, BL-PTFE-1680-20) y conectores a rosca de PFA 1/4"-28 (Darwin microfluidics, LVF-KFI-06) con férulas de ETFE 1/16" (Darwin microfluidics, LVF-KFI-06) para asegurar las conexiones. Estas conexiones sirven para conectar los dos canales en serie, y las salidas y entradas al reservorio, estableciendo un circuito cerrado (Figura 3.8). Estos tubos PTFE estaban conectados en sus extremos con conectores luer hembra 1/16" a los conectores luer macho 1/16" del tubo Tygon del circuito.

3. Material y métodos

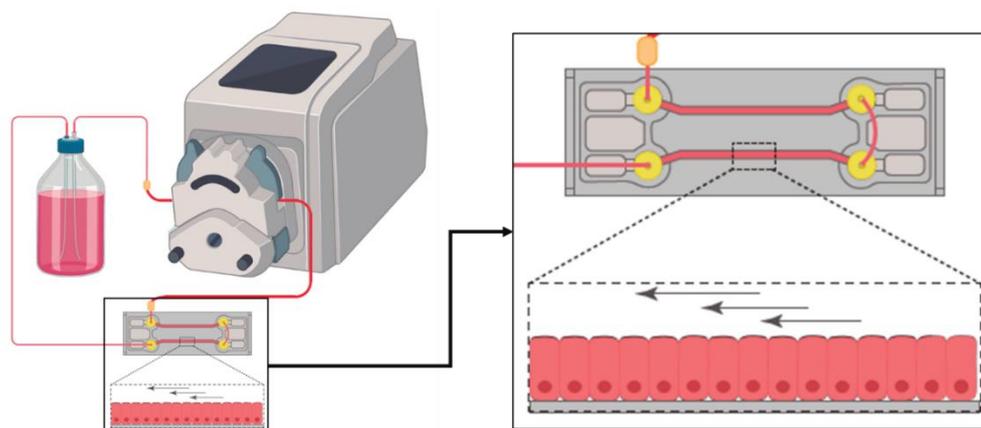


Figura 3.8. Sistema a flujo con bomba peristáltica con el dispositivo COP-2. El medio de cultivo fue perfundido en el COP-2 en este caso con una bomba peristáltica. El circuito cerrado consta de un reservorio con medio de cultivo conectado al dispositivo con de tubo PTFE. Los dos canales se conectaron en serie con tubo PTFE.

Para cebar el sistema se utilizó la misma técnica previamente descrita con el dispositivo COP-3. Tras cebar el sistema con los 3 ml de medio BW5WF durante una hora, se conectaron los dispositivos a flujo durante 72h (Figura 3.9).

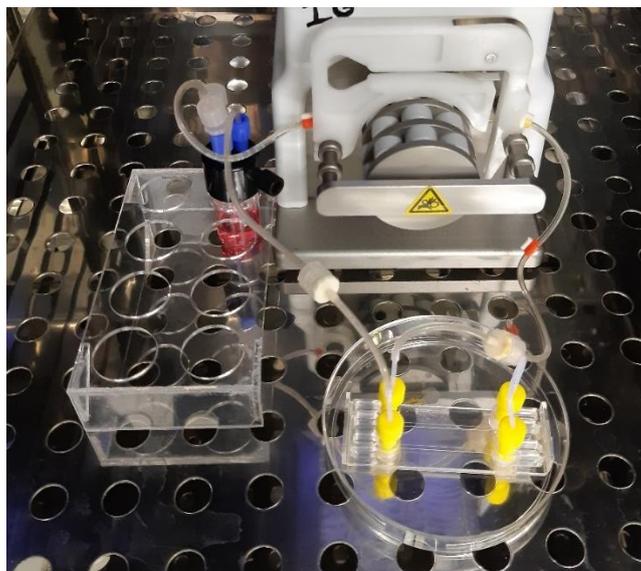


Figura 3.9. Sistema a flujo con dispositivo COP-2 en incubador. Este sistema es similar al descrito anteriormente con el dispositivo COP-3, con la diferencia de que el dispositivo COP-2 está conectado con tubo FEP y con conectores a rosca en las entradas a los canales.

En cada experimento se sembraron dos COP-2; uno se mantuvo el flujo durante 72h sin *shear stress* fisiológico, a 9 $\mu\text{l}/\text{min}$, correspondiente a un *shear stress* de 0.03 dyn/cm^2 , y otro con un *shear stress* fisiológico de 0.24 dyn/cm^2 , obteniendo un caudal de 70 $\mu\text{l}/\text{min}$. Durante los experimentos a flujo se sembraron 6 pocillos de una placa de 96 como control en estático,

3. Material y métodos

es decir, en condiciones de cultivo celular tradicional en un incubador a 37°C con 5% CO₂, con el mismo medio de cultivo BW5WF y se mantuvieron durante 72h.

Flujo lineal - Sistema por control de presión

Para aplicar flujo no pulsátil se utilizó el sistema de control microfluídico mediado por presión de Fluigent (bomba de presión) (Figura 3.8). Este sistema consta de una controladora conectada a una toma de aire con la que se regula el paso del mismo con un manómetro. Una vez el sistema alcanza la presión necesaria para funcionar (1000-1200 mbar), se puede controlar la presión y el flujo que se quiere aplicar directamente desde la controladora o con el software desde el ordenador, donde queda un registro tanto de la presión que se necesita para mantener el sistema a flujo, como del caudal. Para aplicar flujo se necesitan los siguientes componentes, todos incluidos en el kit para microfluídica de Fluigent: tubo PTFE 1/16" OD x 1/32" ID, tubo PEEK 1/32" OD x 0.010" ID, adaptador PEEK 1/16" a 1/32", sensor de flujo Flow Unit tamaño M, dos tapones (Bottle-CAP series) para los reservorios de entrada y salida con conectores a rosca, y dos reservorios de cristal de 100 ml (Figura 3.10).

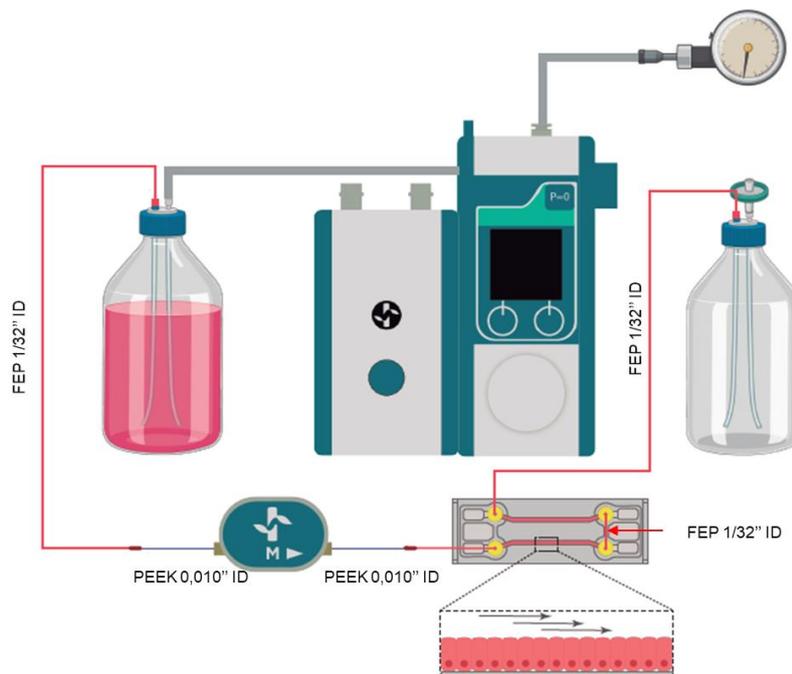


Figura 3.10. Sistema de control de presión para aplicar flujo en dispositivo COP-2. Este sistema, a diferencia de la perfusión con bomba peristáltica, es un sistema abierto, donde se añade el volumen de medio de cultivo necesario en un reservorio inicial y en el extremo final del circuito se sitúa un reservorio final donde se va recogiendo el medio que ha pasado por el dispositivo.

3. Material y métodos

Para cebar el sistema y rellenar los tubos que salen desde el reservorio inicial, donde se añade un volumen total de 100 ml de medio de cultivo BW5WF hasta llegar a la entrada del dispositivo COP-2, se conecta el sistema y se aplica flujo hasta que el medio de cultivo llega al extremo del tubo de entrada al dispositivo. Una vez conectada la entrada, se aplica un flujo bajo de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$, y se van conectando los tubos con los conectores de rosca conforme se van llenando de medio de cultivo, hasta llegar al tubo PTFE de salida, que está conectado al reservorio final. Una vez conectado todo el sistema, se aplicó el mismo flujo que con la bomba peristáltica, de 70 $\mu\text{l}/\text{min}$, correspondiente a un *shear stress* fisiológico de 0.24 dyn/cm^2 en las superficies internas del canal. En este caso el sistema no era cerrado, habiendo un reservorio a la entrada y otro a la salida del dispositivo (Figura 3.11). Cada 24h se volvía a rellenar el reservorio de entrada con el mismo medio que había pasado por el sistema, manteniendo el cultivo celular durante 72h.

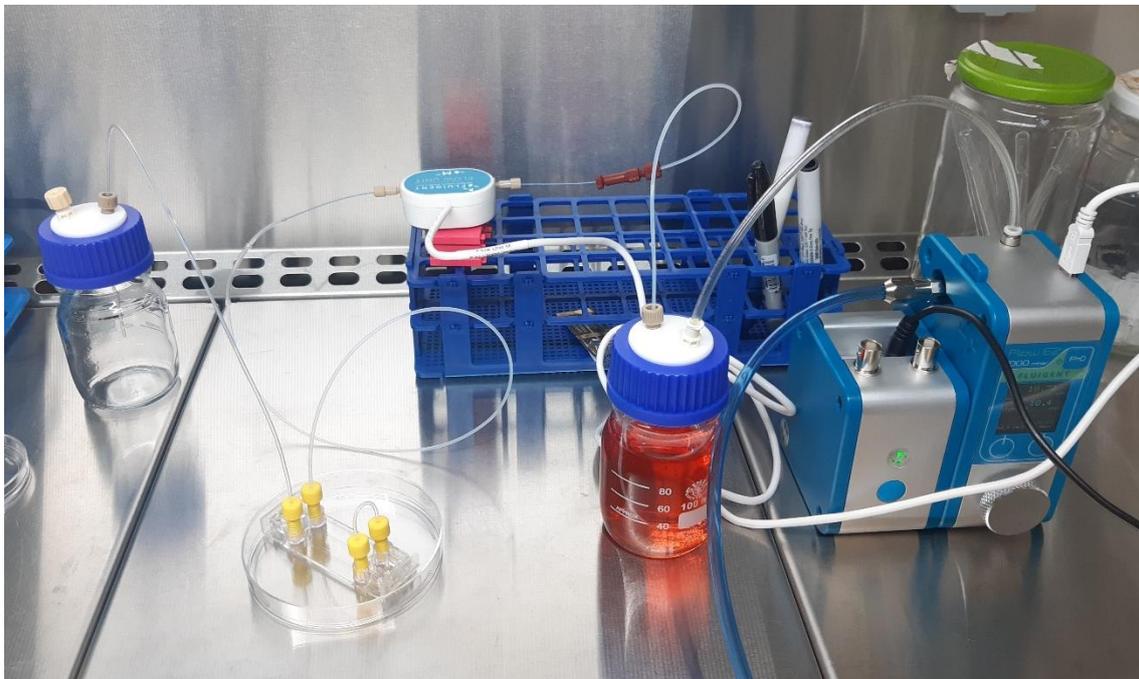


Figura 3.11. Preparación del sistema por control de presión Fluigent. En este sistema, la fuente de aire entra a la controladora mediante un tubo, que a su vez está conectado a un manómetro para poder controlar la presión con la que llega el aire. Una vez se llega a la presión necesaria para que el sistema pueda funcionar, que en este caso son 1000-1200 mbar, ya se puede empezar a perfundir flujo a un caudal determinado. El aire a presión entra al reservorio donde se encuentra el medio de cultivo, y por la fuerza que ejerce la presión del aire, el medio va circulando por el tubo FEP hasta llegar al sensor de flujo, el cual da la información sobre el caudal y la presión que está pasando por el sistema. Con esos datos se puede modificar el flujo hasta alcanzar el necesario para aplicar un *shear stress* determinado.

3.5.6. Perfusión en dispositivo PS-6

Para impulsar el medio con la bomba peristáltica se utilizó tubo Tygon con un diámetro interno de 0.51 mm (VWR, Tygon LMT55 SC0053T). Para el resto del sistema se usó tubo de silicona de un diámetro interno de 0.8 mm (IBIDI, Ref.: 10841) en el Protocolo 1, y tubo Tygon de diámetro interno 0.8 (Fisher, Tygon R3603, ref. 1517-6494 en el Protocolo 2. Para las conexiones entre los canales del dispositivo se utilizaron conectores de tipo luer 1/16" (Figura 3.12). Para reducir la introducción de burbujas que pudieran haberse formado en los tubos antes de la llegada al dispositivo, se puso un atrapaburbujas en la entrada fluídica del primer canal por donde entra el medio de cultivo al dispositivo con los 6 canales conectados en serie. Este atrapaburbujas estaba formado por un conector luer en T (Qosina, ref. 80144), en cuyo extremo superior se conectó un tapón de silicona (Qosina, ref. 80149) que al ser de un material poroso permitía la salida del aire si se habían formado burbujas en el tubo. La parte inferior del conector iba directamente al primer canal del dispositivo, y la otra salida del conector en T estaba conectada al tubo por donde entra el medio de cultivo.

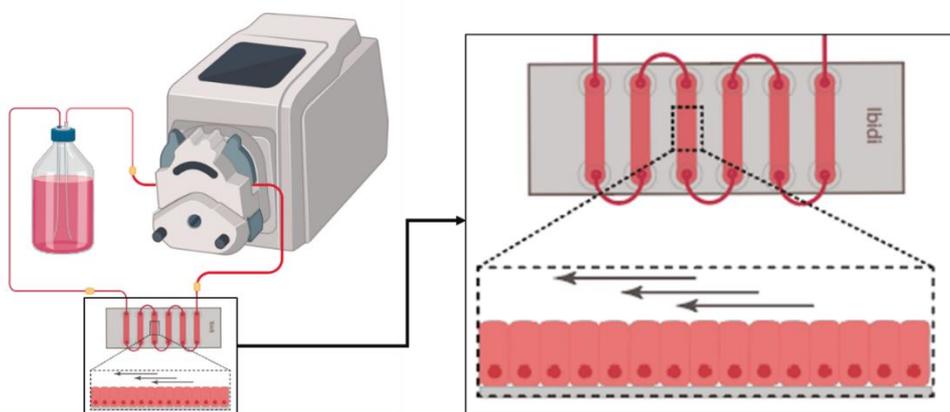


Figura 3.12. Sistema a flujo con bomba peristáltica con dispositivo PS-6. El sistema utilizado fue un circuito cerrado donde se conectó el reservorio con el medio de cultivo mediante tubos y los diferentes canales del dispositivo se conectaron entre sí en serie.

Para el Protocolo 1, una vez sembradas las RPTEC/TERT1 en los canales y sin haber llegado a la confluencia, se conectó el dispositivo a flujo, con el sistema previamente cebado utilizando la misma técnica que en los dos dispositivos anteriores, con medio de cultivo BW5C para someterlas a un flujo bajo de $30 \mu\text{l}/\text{min}$, correspondiente a un *shear stress* de $0.003 \text{ dyn}/\text{cm}^2$, con el fin de que llegaran a confluencia con un recambio constante de medio.

Después de 48h, y al haber formado una monocapa completa en los seis canales, se cambia el medio de cultivo a BW5WF y se aplicaron dos regímenes de flujo diferentes durante 72h:

3. Material y métodos

80 $\mu\text{l}/\text{min}$ con un *shear stress* de 0.01 dyn/cm^2 y 1600 $\mu\text{l}/\text{min}$, con el que se aplica un *shear stress* de 0.2 dyn/cm^2 (Figura 3.13). El volumen total recirculado durante el experimento con BW5WF fue de 5ml en ambos protocolos.

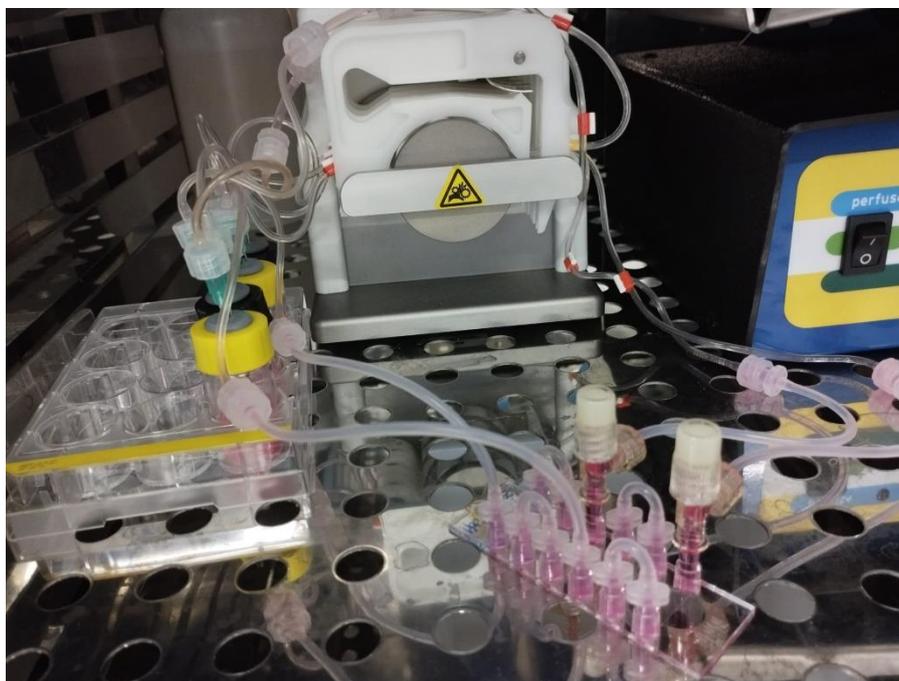


Figura 3.13. Dispositivo PS-6 conectados a flujo dentro del incubador. Este sistema es similar al descrito anteriormente para los dispositivos COP-3 y COP-2 con perfusión de medio de cultivo mediante bomba peristáltica. En este caso, los tubos utilizados para conectar los canales en serie del dispositivo PS-6 son de silicona, en vez de tubo Tygon como en el COP-3 o tubo FEP como en el COP-2.

En el Protocolo 2 de siembra de los dispositivos, estos se conectaron al sistema a flujo con la bomba peristáltica una vez las células habían formado una monocapa totalmente confluyente en los canales de los PS-6, a diferencia del Protocolo 1, que se conectaron al sistema cuando todavía no habían alcanzado la confluencia. Una vez obtenida la monocapa, se conectaron a flujo con los mismos parámetros que con el Protocolo 1.

3.6. Protocolo visualización daunorrubicina en túbulos

Las estructuras tubulares de RPTEC/TERT1 sobre *coating* de colágeno I se trataron con daunorrubicina 50 μM , partiendo de una solución de trabajo de 50 mM. Se añadieron 50 μl de daunorrubicina 50 μM en medio de cultivo DMEM sin rojo fenol (Lonza, BE12-917F) en los pocillos y se dejaron incubar durante 24h a 37°C en el incubador. Pasado este tiempo,

3. Material y métodos

se lavaron tres veces los pocillos con DMEM sin rojo fenol y se tomaron imágenes de campo claro y fluorescencia con el microscopio widefield invertido Olympus IX81.

3.7. Inmunofluorescencia

Para llevar a cabo la técnica de inmunofluorescencia tanto en el modelo de tubulogénesis como en el modelo *kidney-on-a-chip*, primero se lavan las células con PBS tres veces para eliminar los restos de medio de cultivo. Se retira el PBS y se fijan las muestras con paraformaldehído (PFA) 4% (Thermo Fisher, 15424389) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavan los pocillos o los canales de nuevo tres veces con PBS, se retira y se permeabilizan las muestras con Tritón X-100 (Sigma, T8787) al 0.2% en PBS 10x. Se deja 10 minutos a temperatura ambiente y se vuelven a lavar tres veces las muestras con PBS. Para amortiguar la autofluorescencia de las muestras, se utiliza NH_4Cl 50 mM, el cual se prepara con 850 μl de agua MilliQ, 100 μl de PBS 10x y 50 μl de NH_4Cl 1M para tener 1 ml de solución. Se incuba 10 minutos y se vuelven a repetir los lavados con PBS. Para bloquear y así evitar señales inespecíficas, se utiliza una solución de bloqueo a partir de 600 μl de PBS 10x, 66mg BSA (Sigma, A9647) para una concentración final de 0.1%, 600 μl suero de cabra (Sigma, G6767) para tener una concentración final de 10% y 4.8 ml de agua MilliQ, para obtener 5 ml de la solución de bloqueo. Ésta se añade y se deja incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se añaden los anticuerpos primarios en solución de bloqueo en una proporción 1:200. Los anticuerpos primarios son el anticuerpo policlonal anti-ZO-1 de conejo (Thermo Fisher, 40-2200), el anticuerpo monoclonal de anti-tubulina acetilada de ratón (Santa Cruz, sc-23950) y el anticuerpo monoclonal anti-vimentina (Santa Cruz, sc-6260). Después de añadir los anticuerpos primarios se deja incubar en cámara húmeda a 4°C hasta el día siguiente. Transcurrido ese tiempo, se lavan las células tres veces con PBS y se añaden los anticuerpos secundarios diluidos en solución de bloqueo en una proporción 1:500. Los anticuerpos secundarios utilizados Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (Thermo Fisher, A-11008) y Alexa Fluor 546 Goat anti-Mouse IgG (H+L) (Molecular Probes, A11030). La faloidina 546 (Molecular Probes, A22283) se añade junto con los anticuerpos secundarios a una proporción también de 1:500. Se incuba durante una hora y media a temperatura ambiente y se lava tres veces con PBS. Finalmente se tiñen los núcleos con DAPI (Molecular Probes, D3571) en PBS en una dilución 1:1000 y se deja al menos 30 minutos antes de su visualización en el microscopio confocal (Nikon Eclipse Ti)

3. Material y métodos

para la toma de imágenes. En el caso de las células que recrean estructuras tubulares sin la base de hidrogel, se visualizaron y tomaron imágenes directamente donde habían sido sembradas, en el *u-slide angiogenesis*. Sin embargo, las formas tubulares que estaban sobre el hidrogel no alcanzaban a verse debido a la distancia focal del microscopio, por lo que para su correcta observación hay que extraer los geles de los pocillos del *slide*. Para ello, se utilizan unas pinzas con las que se retira el hidrogel del pocillo y se deposita sobre un portaobjetos de vidrio. Una vez está el hidrogel en una posición correcta, se coloca un cubreobjetos encima en el que previamente se ha puesto medio de montaje Vectashield y se sella con laca de uñas transparente. Estas muestras hay que dejarlas hasta el día siguiente para evitar que el cubreobjetos se mueva y pueda dañar el hidrogel.

3.8. Expresión de genes por RT-PCR convencional

Para obtener las muestras el primer paso es realizar la extracción de RNA, la cual se hizo siguiendo el protocolo del fabricante del kit utilizado (Norgen Total RNA Purification Kit, Cat.37500). Una vez obtenido el RNA se cuantificó haciendo uso de un espectrofotómetro de amplio espectro (NanoDrop ND-1000). La concentración final fue obtenida en ng/ μ l. Como criterio de calidad del RNA extraído se comprobó la pureza del mismo con dos medidas de absorbancia, 260/280 y 260/230. A 260 nm se miden los ácidos nucleicos y a 280 nm las proteínas; para que esta relación sea aceptable debe estar en un rango de 1,8 a 2,1. Si es inferior podría indicar la presencia de proteínas u otros contaminantes. La relación 260/230 indica la posible presencia de sustancias químicas que quedan tras la extracción del RNA y su rango es de 2 a 2,2. Si es inferior podría indicar la presencia de contaminantes como alcoholes empleados en la extracción.

Para obtener cDNA a partir de las muestras de RNA se realizó una retrotranscripción inversa. Para ello, se llevó a cabo una RT-PCR (Thermo Fisher, High Capacity cDNA Reverse transcription kit, 4368814). Se descongelan en hielo todos los componentes del kit y se prepara un volumen final de 10 μ l/muestra con los siguientes volúmenes para llevar a cabo la reacción:

- 1 μ l de 10x RT Buffer
- 0,4 μ l de 25x dNTPs (100 mM)
- 1 μ l de 10x RT Random primers

3. Material y métodos

- 0,5 µl de MultiScribe Reverse Transcriptase 50 u/ µl
- Muestra de RNA hasta 7,1 µl (se pueden utilizar hasta 1 µg de RNA por cada 10 µl de reacción)
- Agua DEPC hasta completar el volumen final de 10 µl

Tras añadir la mezcla de todos los componentes en cada tubo, se centrifuga para que el contenido de la reacción baje al fondo del tubo. Finalmente, se inicia la reacción en el termociclador (Thermo Fisher, Veriti 96 Well Thermal Cycler) siguiendo el siguiente protocolo:

- 25°C, 10 minutos
- 37°C, 120 minutos
- 85°C, 5 minutos
- 4°C, hasta que se saca la reacción del termociclador

Las muestras de cDNA obtenidas pueden conservarse a -20°C si no van a ser procesadas el mismo día.

Tras obtener el cDNA, se procedió a realizar la PCR multiplex con un kit comercial (Ibiam lab, Bian-Taq DNA Polymerase, i01-105), con los amplicones obtenidos para cada par de *primers* de los genes que se querían analizar. Los *primers* se repartieron en cuatro mixes (Tabla 3.7), agrupando los genes con pares de bases con un peso molecular diferente para poder observar la expresión en la electroforesis sin que se solapasen las bandas.

Tabla 3.7. Genes que se analizaron por PCR multiplex.

	Gen	Pares de bases
MIX 1	Megalina	185 pb
	KSP	125 pb
	DPP4	102 pb
MIX 2	THP	358 pb
	αSma	172 pb
	SGLT2	110 pb

3. Material y métodos

MIX 3	APN	232 pb
	GAPDH	157 pb
	GGT1	85 pb
MIX 4	AQP2	350 pb
	NKCC2	149 pb
	NCC	70 pb

Para ello se prepararon las muestras con los diferentes componentes del kit (Tabla 3.8 en tubos de 0.2 ml de la siguiente forma: Para cada muestra se preparó un mix de todos los componentes, que se añadieron a diferentes tubos, y finalmente se añadió el volumen de cDNA necesario para cada muestra.

Tabla 3.8. Componentes de la RT-PCR con el volumen y la concentración final.

	Volumen	Concentración final
10x PCR buffer completo	2 μ l	1x
dNTPs mix 10 mM	0,4 μ l	200 μ M
Mix primers 4 μM	2,5 μ l	0,5 μ M
DSF Taq Polimerasa	0,1 μ l	0,05 uds/ μ l
cDNA	X μ l	200 pg/ μ l
Agua estéril	Hasta completar 20 μ l	

Para llevar a cabo la reacción, se utilizó el mismo termociclador con los siguientes pasos:

1. Desnaturalización a 94°C, 2 minutos
2. Desnaturalización a 94°C, 30 segundos
3. Anillamiento a 62°C, 30 segundos
4. El paso 2 y 3 se repiten durante 40 ciclos
5. Extensión a 72°C, 1 minuto 30
6. Extensión final a 72°C, 5 minutos

3. Material y métodos

7. 4°C hasta sacar las muestras del termociclador

Una vez obtenidos los amplicones, se pasa a realizar la electroforesis en gel de agarosa 2%. Para un volumen final de 100 ml de gel, se disuelven 2 gr de agarosa en polvo (Lonza, SeaKem LE Agarose, ref. 50004) en tampón SB 1x en agua destilada a partir del stock de SB 20x. El tampón SB es una solución tampón que se utiliza para la separación de DNA, y está compuesto de borato de sodio a una concentración de 100 mM en agua destilada. La mezcla se introduce en el microondas hasta que se disuelva completamente la agarosa y se añaden 5 µl de bromuro de etidio, el cual se intercala entre las bases de DNA y emite fluorescencia cuando se ilumina con una luz ultravioleta. Se vierte el gel en el soporte donde se va a realizar la electroforesis y se deja hasta que polimerice completamente. Una vez polimerizado el gel de agarosa, se añade tampón SB 1x a la cubeta, dejando sumergido el gel, y se preparan las muestras con el tampón de carga. Éste se añade para facilitar la carga de las muestras ya que contiene glicerol, lo cual da peso a la muestra para que el DNA precipite al fondo de los pocillos. Ayuda también a conducir la corriente y a controlar el pH. A los 20 µl obtenidos de cada muestra se añaden 4 µl del tampón de carga. De los 24 µl finales de cada muestra, se utilizan 12 µl para cargar las muestras en los pocillos correspondientes. En uno de los pocillos del gel se añaden 10 µl de control de carga de 100-1000 pb. Una vez preparado el gel con las muestras, se conecta la cubeta a la fuente de alimentación con los electrodos en la posición correcta y se aplica una carga de 200 V durante 35 minutos. Para la visualización de las bandas en el gel, se utiliza un transiluminador con luz ultravioleta y se tomaron imágenes para su posterior análisis.

3.9. Cuantificación de la expresión génica mediante qPCR

La extracción de RNA total se llevó a cabo con Trizol (Invitrogen, 15596026). Las muestras se incubaron durante 5 minutos para favorecer la completa disociación de los complejos nucleoproteicos, y a continuación se añade 200 µl de cloroformo por cada mililitro de Trizol utilizado en la lisis. Se incuba 3 minutos y se centrifugan las muestras a 12.000g a 4°C durante 15 minutos. La mezcla se separa en tres fases, una en el fondo del tubo de color rojizo que contiene el cloroformo, una interfase y una fase acuosa incolora en la parte superior. Ésta última se transfiere a un nuevo tubo, se añade 0,5 µl de glicógeno libre de RNAasas a cada

3. Material y métodos

muestra y seguidamente se añaden 0,5 ml de isopropanol por cada mililitro de Trizol utilizado en la lisis. Se incuba 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 12.000g a 4°C durante 10 minutos. El RNA total precipita en el fondo con una consistencia de gel blanquecino en el fondo del tubo. Se descarta el sobre nadante y se resuspende el pellet en 1 ml de etanol 75% por cada mililitro de Trizol usado en la lisis. Se centrifuga de nuevo, a 7.500g a 4°C durante 5 minutos y se vuelve a descartar el sobrenadante. El pellet resultante se deja secar de 5 a 10 minutos, y finalmente éste se resuspende en 6 µl de agua DEPC. Una vez obtenida la muestra de RNA, se cuantificaron todas las muestras con el kit de ensayo de alta sensibilidad de RNA Qubit (Thermo Fisher, Qubit RNA High Sensitivity (HS), Q32852) y se midieron en el fluorímetro Qubit 3.0.

Una vez obtenidas las muestras de RNA, se llevó a cabo la retro-transcripción para obtener el cDNA con el kit comercial PrimeScript RT Master Mix (Takara, RR036A). Para ello, se prepara cada muestra con 2 µl de 5X PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time), 500 ng de RNA en el volumen necesario y completar la mezcla con agua destilada libre de RNAasas hasta completar un volumen de 10 µl. La retro-transcripción se lleva a cabo a 37°C durante 15 minutos, después a 85°C para la inactivación por calor de la retro-transcriptasa y finalmente a 4°C hasta sacar la muestra del termociclador previamente mencionado.

Con el cDNA que se obtiene a partir de la retro-transcripción, se procede a la amplificación de las secuencias de interés, correspondientes a los marcadores detallados en la Tabla 3.9. Cada muestra se prepara con el kit comercial Premix Ex Taq (Probe qPCR) (Takara, RR390L) de la siguiente forma, para obtener un volumen final de 20 µl/muestra, preparando duplicados de cada una de ellas:

- 10 µl Premix Ex Taq (2x)
- 2 µl de la sonda
- 6 µl de agua DEPC
- 2 µl de cDNA

Con las muestras ya preparadas, se lleva al termociclador, en este caso ViiA 7 Life technologies, y se procede a la realización de la qPCR siguiendo los siguientes ciclos:

- Un ciclo a 95°C, tres minutos
- 40 ciclos a 95°C 30 segundos seguido de 60°C durante 1 minuto.

3. Material y métodos

Se analizaron marcadores de transición epitelio-parénquima (EMT), expresión de transportadores, de estrés celular y de daño renal (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Marcadores utilizados en la qPCR para el modelo de tubulogénesis y para el modelo kidney-on-a-chip.

Perfil	Marcador	TIPO	Secuencia de referencia
CONTROL	RPLP0	Control endógeno	NM_001002
EMT	Fibronectin	Matriz extracelular	NM_145235
EMT	αSMA	Matriz extracelular	NM_001141945
EMT	Vimentin	Matriz extracelular	NM_001017921
TRANSPORTE	OAT1	Túbulo proximal	NM_153278
TRANSPORTE	OAT3	Túbulo proximal	NM_004254
TRANSPORTE	OCT1	Túbulo proximal	NM_153187
TRANSPORTE	OCT2	Túbulo proximal	NM_003058
TRANSPORTE	AQP1	Túbulo proximal	NM_001185060
METABOLISMO	AMPKα1	Estrés celular	NM_206907
METABOLISMO	AMPKα2	Estrés celular	NM_006252
METABOLISMO	GAPDH	Estrés celular	NM_002046
METABOLISMO	mTOR	Estrés celular	NM_004958
HIPOXIA	HIF1A	Estrés celular	NM_181054
HIPOXIA	HIF2A	Estrés celular	NM_001430
HIPOXIA	HO-1	Estrés celular	NM_002133(1)
DAÑO RENAL	KIM1	Daño	NM_012206
DAÑO RENAL	NGAL	Daño	NM_005564

Una vez obtenidos los datos de los ciclos donde se amplifican las secuencias de interés, se pasó a analizar las diferentes condiciones con el método de análisis $2^{-(ddCt)}$ (Schmittgen and Livak, 2008). El primer paso es calcular el dCt de cada gen de todas las muestras respecto al gen de referencia, que en este caso es RPLP0. Este valor se obtiene restando los Ct del gen de referencia a los Ct de cada uno de los genes a analizar. Una vez obtenidos los valores dCt, hay que calcular el valor ddCt, que se obtiene restando el dCt de las muestras control a los dCt de las muestras del modelo de tubulogénesis o del modelo *kidney-on-a-chip*. El valor final se obtiene a partir de la fórmula $2^{-(ddCt)}$, y este valor es el que finalmente se analiza para observar diferencias en la expresión de los genes de interés.

3.10. Preparación de cisplatino, daunorrubicina y tacrolimus

El cisplatino o cis-diaminodichloroplatino(II), (CDDP) es un agente alquilante basado en el platino y utilizado en quimioterapia. El cisplatino (Sigma, P4394), cuyo peso molecular es 300 g/mol, se preparó en una disolución de NaCl 0.9% en agua destilada a una concentración de 3 mM y almacenado a 4°C.

El tacrolimus, FK-506 monohidrato (Sigma, F4679), es un fármaco inmunosupresor utilizado de forma común en trasplantes alogénicos. Este fármaco, cuyo peso molecular es 822.03 g/mol, fue diluido en DMSO a una concentración de 24.33 mM y almacenado a -20°C

La daunorrubicina (Sigma, 30450) es un fármaco quimioterapéutico de la familia de las antraciclinas. Ésta, con un peso molecular de 563.99 g/mol, fue preparada en agua destilada a una concentración de 50 mM y almacenada a -20°C.

3.11. Citotoxicidad en el modelo de tubulogénesis

Tras el protocolo de siembra y mantenimiento de las RPTEC/TERT1 para la formación de túbulos en el μ -Slide Angiogenesis (IBIDI) previamente descrito, donde se formaron túbulos sobre un hidrogel o sin hidrogel, se cambió el medio de cultivo BW5C a medio sin factores de crecimiento, BW5WF. Dichas estructuras tubulares y células sembradas en una placa de 96 pocillos como control fueron expuestas a los citotóxicos daunorrubicina y cisplatino (CDDP). Tanto para el tratamiento con daunorrubicina como para el CDDP se prepararon las siguientes diluciones en medio de cultivo BW5WF: 0, 15, 30, 50, 100 y 300 μ M. Se añadió 50 μ l de cada dilución a los túbulos, habiendo dos pocillos por condición, y 100 μ l de cada una de ellas en la placa de 96 pocillos, con tres pocillos por condición. Se mantuvo el cultivo celular 24h con el tratamiento, y tras ese periodo de tiempo se renovó el medio de cultivo. Pasadas otras 24h, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular con PrestoBlue.

3.12. Citotoxicidad en el modelo *kidney-on-a-chip*

Tras aplicar dos regímenes de flujo en los dispositivos PS-6, uno de ellos con un *shear stress* de 0.03 dyn/cm² y otro con un *shear stress* fisiológico de 0.2 dyn/cm² durante 72h, se trataron las RPTEC/TERT1 tanto en los dispositivos como en una placa de 96 pocillos como control de cultivo celular tradicional. Se aplicaron tratamientos con daunorrubicina, tacrolimus y cisplatino. Las concentraciones de daunorrubicina añadidas al medio de cultivo BW5WF fueron 0, 50, 100, 150, 200 y 300 µM. En el caso del tacrolimus, fueron 0, 15, 30, 50, 75 y 100 µM. Por último, las concentraciones utilizadas con el cisplatino fueron 0, 15, 30, 50, 100 y 300 µM.

Se aplicó el tratamiento con los diferentes fármacos tanto a los dos dispositivos PS-6 como a la placa de 96 pocillos en el incubador a 37°C y 5% CO₂. Los PS-6 se mantuvieron dentro del incubador en un balancín y la placa en estático, durante un periodo de 24h. Tras este tiempo, se renovó el medio de cultivo y se mantuvieron las células en las mismas condiciones otras 24h. Pasado este tiempo, se llevó a el ensayo de viabilidad celular.

3.13. Protocolo de análisis de la viabilidad celular

3.13.1. Análisis de la viabilidad celular en el modelo de tubulogenesis.

Tanto en los pocillos del *µ-Slide Angiogenesis* como en la placa multipocillo control, se lavaron las células tres veces con HBSS. Tras los lavados, se añadió una dilución de PrestoBlue (Life technologies A13262) en medio de cultivo BW5WF en una proporción 1/20, 50 µl/pocillo para los túbulos y 80 µl/pocillo en la placa de 96 pocillos. La técnica de PrestoBlue se basa en la actividad reductora de las células vivas, por lo que se basa en la actividad metabólica celular. El compuesto que se utiliza en esta técnica es la resazurina, que al entrar en contacto con células vivas se reduce a resorufina, un compuesto rojo que puede medirse por fluorescencia. Para realizar la lectura de la fluorescencia emitida por el PrestoBlue, se utilizó un lector de placas (Biotek Synergy HT) equipado con filtros de excitación 528/90 y emisión 590/35. Los datos que se muestran en las gráficas de toxicidad a los diferentes fármacos se corresponden con los datos relativos de los datos obtenidos de fluorescencia en el lector de placas.

3.13.2. Análisis de la viabilidad celular en el modelo *kidney-on-a-chip*

Antes de aplicar el tratamiento en las células expuestas a *shear stress*, se realizó un ensayo de viabilidad celular con PrestoBlue para tener en cuenta posibles diferencias en la proliferación celular de las células que habían estado a un flujo bajo y a un flujo alto. Tras aplicar *shear stress* durante 72h, se añadió PrestoBlue en una proporción 1/20 en medio de cultivo BW5WF. Para ello, se retiró el medio de cultivo de los reservorios, dejando medio en los canales para que no se dañase el cultivo celular. Posteriormente, se añadieron 30 μ l de PrestoBlue 1/20 por uno de los reservorios y el exceso se retiró por el reservorio del lado opuesto del canal. Finalmente, se volvieron a añadir 30 μ l/canal de la dilución de PrestoBlue y se utilizó el lector de placas para cuantificar la fluorescencia. Una vez terminada la lectura, se renovó el medio de cultivo para eliminar el PrestoBlue y se procedió al tratamiento con los diferentes fármacos.

Después del tratamiento con daunorrubicina, cisplatino y tacrolimus, se llevó a cabo el análisis de la viabilidad celular tras la exposición a los compuestos nefrotóxicos, siguiendo los mismos pasos previamente mencionados, tanto en los dispositivos PS-6 como en la placa multipocillo. Una vez obtenida la lectura de la fluorescencia de PrestoBlue en el lector de placas, se procedió a seguir con un protocolo para obtener el porcentaje de células vivas mediante el cristal violeta. En este caso, se lavaron los pocillos y los canales de los dispositivos con HBSS y tras retirarlo se añadió metanol frío (100 μ l/canal y pocillo) durante 10 minutos para fijar las células. Se lavaron las muestras con PBS y una vez totalmente secas se añadió cristal violeta (Sigma C0775) a una concentración de 0.1% en agua destilada (80 μ l/canal y pocillo). Se dejó durante 30 minutos para teñir los núcleos de las células y pasado este tiempo, se lavaron los pocillos y los canales de los PS-6 con abundante agua para eliminar el exceso de cristal violeta. Una vez los pocillos y los canales estaban completamente secos, se añadió ácido acético al 10% en agua destilada para lisar las células (80 μ l/canal y pocillo), y se mantuvo la placa y los PS-6 en agitación (IKA MS 3 digital) durante 20 minutos. Finalmente se obtuvo una lectura de la absorbancia a 590 nm con el mismo lector de placas. A continuación, se procedió a cuantificar el número de células. Las gráficas de porcentajes de viabilidad celular (PrestoBlue) y número de células vivas (cristal violeta) se refieren a datos relativos, calculados a partir de los datos obtenidos de fluorescencia y absorbancia, respectivamente.

3.14. Cálculo del EC50

Para calcular el EC50 se utilizó el software GraphPad Prism 6. El primer paso fue transformar los datos de todas las medidas de los diferentes experimentos por separado a escala logarítmica. Una vez obtenida la curva de respuesta al fármaco en base logarítmica, se calculó el EC50 de cada experimento independiente de cada una de las condiciones. Para ello se ajustaron los datos transformados a una curva con progresión no lineal mediante la siguiente ecuación:

$$Y = 100 / (1 + 10^{(X - \text{LogEC50})})$$

Una vez obtenidos los EC50 de cada experimento independiente, se agruparon en las tres condiciones de cada modelo, tanto del modelo de tubulogénesis como en el modelo *kidney-on-a-chip* y se calculó la media y la desviación estándar para cada condición.

3.15. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con el software GraphPad Prism 6. Las gráficas muestran la media con su desviación estándar (SD). El test estadístico empleado para el análisis de los resultados de qPCR fue el ANOVA de dos vías. El test estadístico que se utilizó para el cálculo del EC50 de los diferentes fármacos fue el ANOVA de una vía no paramétrico con corrección mediante test de Turkey, valor $p < 0.05$.

4. DESARROLLO DEL MODELO DE TUBULOGÉNESIS

4.1. Introducción

Los modelos renales tridimensionales han demostrado ser una herramienta poderosa para el estudio del desarrollo del riñón, las enfermedades renales y también como modelos para testar fármacos que puedan provocar nefrotoxicidad. Existe una clara tendencia a sustituir el cultivo celular tradicional porque no recapitula aspectos clave encontrados en el riñón *in vivo* (King *et al.*, 2017). A lo largo de los años, se han descrito algunos modelos renales sofisticados que demuestran que es posible recrear estructuras similares a los túbulos proximales renales. Algunos de estos modelos se basan en el papel de los componentes de la ECM y los factores de crecimiento implicados en el proceso de tubulogénesis. Los primeros intentos de explicar cómo se produce la ramificación renal *in vitro* mostraron que los factores de crecimiento específicos y los componentes de la ECM eran cruciales para recrear estructuras similares a los (Taub *et al.*, 1990; Montesano, Schaller and Orci, 1991).

Los componentes de la ECM se han utilizado comúnmente para recrear estructuras similares a los túbulos en 3D, pero hay materiales sintéticos que también pueden recapitular estas estructuras *in vitro*. Los hidrogeles sintéticos como el polietilenglicol (PEG) o el polímero biofuncional de poli(etilenglicol) diacrilato (PEGDA) fueron funcionalizados para proporcionar soporte biomecánico a las células cuando se sembraron dentro de un hidrogel (Chung *et al.*, 2008).

Hay varios agentes que intervienen en la morfología 3D dentro de los hidrogeles, como las señales mecánicas y las interacciones proteicas. Estos factores pueden cambiarse modulando la concentración de proteínas y la rigidez del hidrogel utilizado para el modelo (DesRochers, Palma and Kaplan, 2014; Shamir and Ewald, 2014; Hirashima, Hoshuyama and Adachi, 2017). De esta forma, se ha demostrado que las células renales recrean estructuras similares a los túbulos dentro de una matriz específica de forma espontánea, ya que la ECM influye en su polarización y en la formación del lumen (Zegers *et al.*, 2003; Schlüter and Margolis, 2009).

Los protocolos de cultivo tridimensional comienzan con la siembra de células previamente mezcladas con diferentes proteínas extracelulares. La mayoría de los estudios se basan en el uso de Matrigel o colágenos como fuente de estas proteínas. Las mezclas comerciales o las proteínas aisladas derivadas de la ECM se han utilizado ampliamente para recubrir superficies o fabricar hidrogeles tridimensionales. El Matrigel es uno de los extractos de proteínas solubles más conocidos, que se obtiene a partir de tumores Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de ratón (Kleinman and Martin, 2005). Contiene algunas de las proteínas más importantes

4. Desarrollo del modelo de tubulogénesis

de la matriz extracelular como la laminina, el colágeno IV, la entactina y el proteoglicano de heparán sulfato.

A principios de los 90 se demostró que el TGF- α y el EGF, que tienen similitudes estructurales, estimulaban la formación de túbulos cuando se cultivaban células renales primarias de ratón dentro de Matrigel (Taub *et al.*, 1990). Las células renales primarias de ratón dieron lugar a la formación de túbulos cuando se mezclaron con una suspensión de colágeno tipo I. Se añadió medio de crecimiento después de la siembra de las células y tras siete días aparecieron estructuras similares a los túbulos y glomérulos. Estas estructuras fueron capaces de alargarse en un corto periodo de tiempo (Joraku *et al.*, 2009). En otro estudio, las células renales de rata neonatal sembradas en una matriz biológica de colágeno-Matrigel también desarrollaron una arquitectura 3D que mostró estructuras tubulares y también estructuras similares a glomérulos que aparecieron después de 14 días de cultivo celular (Fomby *et al.*, 2010).

Además, la funcionalización específica de los hidrogeles con bioligandos permite que las células renales interactúen con la ECM, lo cual es esencial para la morfogénesis y la polarización en los cultivos celulares 3D. Con esta premisa, se sembraron MDCK en hidrogeles de polietilenglicol (PEG) funcionalizados con el péptido RGD o la laminina-1 y las células formaron quistes perfectamente polarizados con un lumen en su interior (Chung *et al.*, 2008).

En el caso de los modelos 2.5D, se requiere la adición de proteínas de la ECM al medio de cultivo para inducir la diferenciación y la morfología específicas del tejido. A menudo se utilizan extractos comerciales de ECM como Matrigel y Colágeno I (Shamir and Ewald, 2014). La línea celular MDCK tipo 2 creció formando quistes cuando el medio de cultivo se mezcló con un 2% de Matrigel y dicha suspensión celular se puso sobre una capa de Matrigel. La plasmolipina (PLLP), cuya expresión induce la activación de la vía de señalización Notch, esencial para la polarización y diferenciación celular, se incrementó durante la formación del lumen en las estructuras quísticas generadas (Rodríguez-Fraticelli *et al.*, 2015). LLC-PK1 y RPTEC/TERT1 tuvieron una respuesta similar cuando se cultivaron con medio enriquecido con Matrigel sobre hidrogeles de Matrigel o colágeno (Bosch-forkea *et al.*, 2019).

Los modelos tridimensionales mencionados, basados en el uso de proteínas de la matriz extracelular para recrear estructuras quísticas o tubulares que se asemejen al fenotipo que se observa *in vivo*, tienen algunas limitaciones que hacen que no sean utilizados de forma rutinaria en la práctica. Muchos de los protocolos empleados en este tipo de modelos hacen

4. Desarrollo del modelo de tubulogénesis

uso de líneas celulares de origen animal, y la tendencia en los últimos años va encaminada a trabajar con líneas celulares, ya sean primarias o continuas, cuyo origen es humano. Otro de los inconvenientes que pueden tener es que son protocolos demasiado alargados en el tiempo y requieren una mano experta para llevarlos a cabo. El hecho de que en la mayoría de los modelos desarrollados hasta ahora las células estén embebidas en una matriz de proteínas de la ECM hace que el coste económico se eleve puesto que el volumen necesario de este tipo de compuestos es elevado, y debido a esto el uso de este tipo de componentes es limitante a la hora de desarrollar modelos de este tipo. Además, al estar las células embebidas dentro de un hidrogel en la mayoría de los casos, el acceso a ellas es complicado para realizar ensayos de transporte o de toxicidad frente a fármacos.

Por estas razones, todavía es necesario el desarrollo un modelo que recree las estructuras tubulares que se encuentran en el riñón humano, que sea accesible y de fácil manejo para que pueda ser utilizado de forma rutinaria en el *screening* de nuevos fármacos. Es por ello que hemos desarrollado un modelo *in vitro* 2.5D con una línea celular establecida, con un protocolo sencillo y que permite tener acceso directo a las células.

4.1.1. Hipótesis

El uso de matrices biológicas con células de túbulo proximal renal genera estructuras complejas con forma tubular, haciendo que el fenotipo del cultivo celular sea más representativo del tejido renal, por lo que tanto su función como su morfología sean más biomiméticas en comparación con el cultivo celular tradicional.

4.1.2. Objetivos específicos

- Generación de estructuras tubulares directamente sobre superficies plásticas para eliminar el uso de hidrogeles y facilitar los ensayos de nefrotoxicidad producida por fármacos.
- Desarrollo de un modelo capaz de reducir costes y que sea una herramienta útil para ensayos de alto rendimiento.
- Caracterización del modelo de tubulogénesis y compararlo con el cultivo celular tradicional a partir de diferentes técnicas como la inmunofluorescencia, el transporte de fármacos y la expresión de marcadores específicos de las células epiteliales del túbulo proximal renal.

4.2. Resultados

4.2.1. Generación de estructuras autoorganizadas sobre hidrogeles

Para comprobar si la línea celular RPTEC/TERT1 tenía capacidad de formar estructuras tridimensionales sobre diferentes matrices biológicas, se probaron cinco condiciones mezclando colágeno I y Matrigel en distintas proporciones. Además de las diferentes proporciones de ambos componentes, la suspensión celular que se añadió sobre los hidrogeles tenía un 5% de Matrigel, a diferencia de la condición control, que no contenía Matrigel. Después de 24h en cultivo celular, se observaron estructuras tanto quísticas como tubulares, dependiendo de la proporción de los dos componentes del hidrogel, cuando las células habían sido resuspendidas con un 5% de Matrigel (Figura 4.1, F-J). En los controles sin el 5% de Matrigel, las células se dispusieron en monocapa menos en la condición donde el hidrogel era 100% Matrigel, donde las células formaron estructuras esféricas (Figura 4.1, A-E). La condición donde más estructuras tubulares se generaron fue en el hidrogel formado por un 90% de colágeno I y 10 % de Matrigel con las células con un 5% de Matrigel (Figura 4.1, F). Con este protocolo se consiguió la formación de estructuras mayoritariamente tubulares en dicha condición, siendo la formación de quistes predominante en el resto de las condiciones, sobre todo en las que el porcentaje de Matrigel es mayor en la proporción del hidrogel.

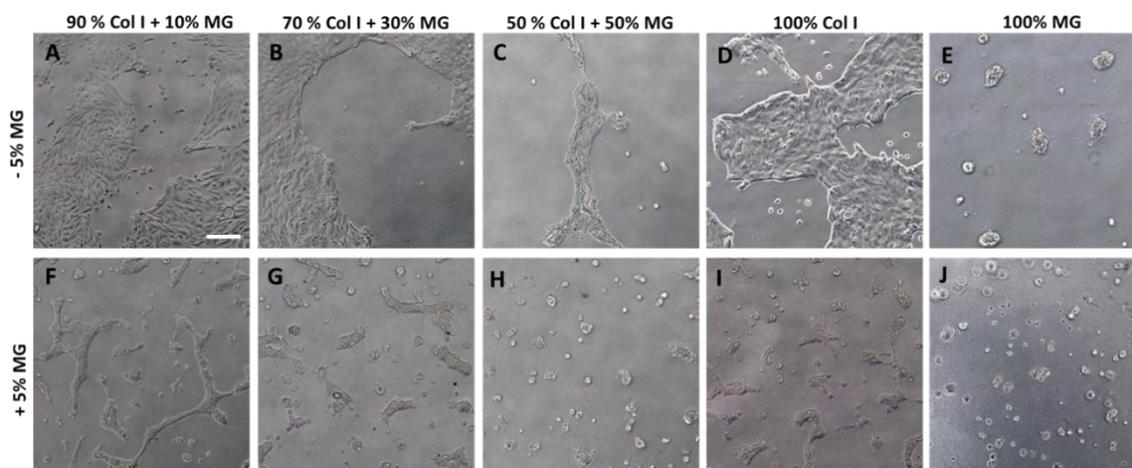


Figura 4.1. Formación de estructuras autoorganizadas sobre hidrogeles. En las condiciones donde no se añadió un 5% de Matrigel a la suspensión celular, las células se dispusieron en monocapa sobre los hidrogeles (A-E). En la condición con un 5% de Matrigel, se formaron estructuras tubulares o quísticas dependiendo de la composición del hidrogel (F-J). Barra de escala 50 μ m.

4. Desarrollo del modelo de tubulogénesis

Con el fin de corroborar que la razón por la que las células formaban estructuras tubulares era el añadir un 5% de Matrigel a la suspensión celular antes de sembrar las RPTEC/TERT1 sobre la matriz biológica, se utilizaron dos tipos de lamininas. La laminina es uno de los componentes de la matriz extracelular, la cual se ha visto que juega un papel importante en la morfogénesis de estructuras ramificadas de células renales en modelos de cultivo celular en 3D (Chen *et al.*, 2004).

Siguiendo el protocolo para la formación de estructuras tubulares, se observó que cuando se resuspendieron las células con un 10% de Laminina 511, Laminina 521 o una mezcla de ambas, en lugar de Matrigel, no formaron estructuras tubulares sobre el hidrogel de colágeno sobre el que se sembraron las células (Figura 4.2B, C, D). Como control positivo se sembraron las células con un 5% de Matrigel sobre el mismo tipo de hidrogel y sí se produjo la formación las estructuras tubulares previamente mencionadas (Figura 4.2A).

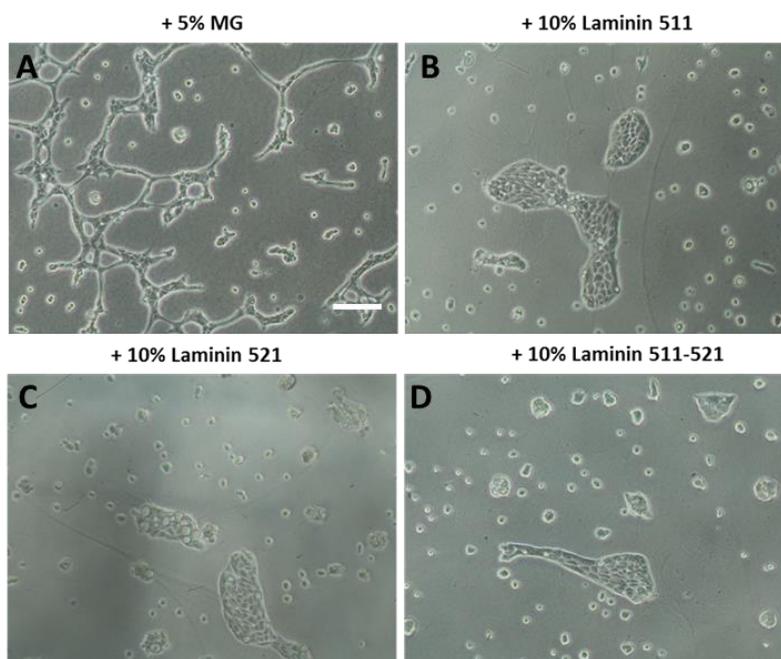


Figura 4.2. La formación de estructuras tubulares depende de la presencia de varios de los componentes de la ECM. Las células RPTEC/TERT1 fueron sembradas sobre un hidrogel de colágeno I. Las células a las que se le añadieron lamininas no generaron estructuras tubulares (B, C, D) en comparación con la condición en la que se añadió un 5% de Matrigel a las células (A). Barra de escala 50 μ m.

Estos resultados sugieren que otros de los componentes del Matrigel son los implicados en la formación de estas estructuras autoorganizadas con morfología tubular, ya que solo con el uso de la laminina no se consiguió esta disposición. El componente principal del Matrigel es la laminina, con un 60% del total de su composición, pero con estos resultados se demuestra

4. Desarrollo del modelo de tubulogénesis

que esta proteína por sí misma no es capaz de generar estructuras tubulares en las RPTEC/TERT1, pero sí cuando se utiliza con otros componentes de la ECM y los factores de crecimiento que se encuentran en el Matrigel.

4.2.2. Generación de estructuras autoorganizadas sobre recubrimientos de superficie

Una vez comprobado que el factor determinante para la formación de túbulos es la presencia de MG en el medio de cultivo, se quiso comprobar si podía reproducirse este efecto en ausencia de hidrogel, sembrando las células directamente sobre la superficie plástica de la placa multipocillo y comprobar a su vez el efecto de diferentes *coatings*. En este punto, se vio que, en ausencia de MG en el cultivo celular, no se formaron estructuras 3D en ninguna condición (Figura. 4.3).

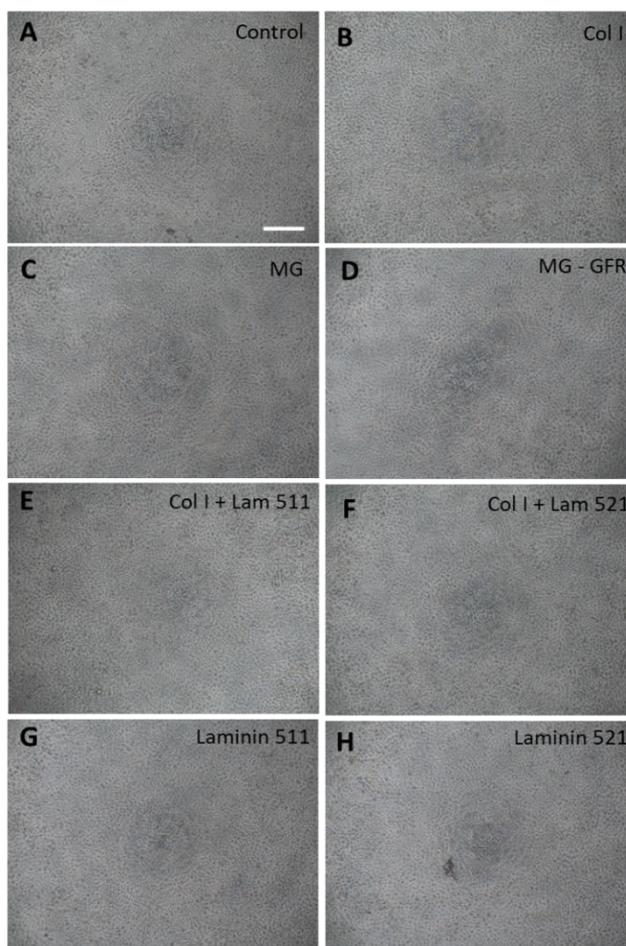


Figura 4.3. Formación de monocapa celular de RPTEC/TERT1 sobre coatings. Las células no formaron estructuras tubulares sobre los diferentes *coatings* en ninguna de las condiciones si no que cubrieron los pocillos con una monocapa celular confluyente. Barra de escala 100 μm .

4. Desarrollo del modelo de tubulogénesis

Por otro lado, se observó que tras 24h de la siembra, se habían formado estructuras mayoritariamente autoorganizadas con forma tubular y también formas quísticas, éstas últimas en menor cantidad, en todas las condiciones con la adición de un 5% MG en la suspensión celular, incluso en la condición control donde no se había recubierto el pocillo con ninguna proteína ni combinación de proteínas de la ECM (Figura 4.4).

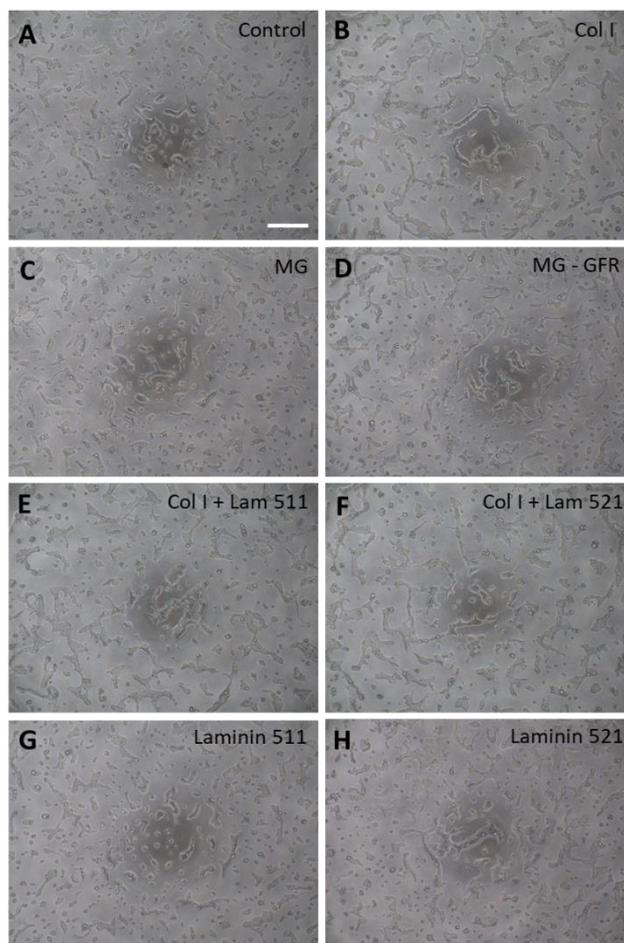


Figura 4.4. Formación de estructuras autoorganizadas sobre coatings en presencia de Matrigel. Las RPTEC/TERT1 formaron estructuras autoorganizadas con aspecto tubular y quístico sobre todos los *coatings* (B-H), incluso en la condición donde no se había recubierto la superficie del pocillo con ninguna proteína de la ECM (A).

4.2.3. Generación de estructuras autoorganizadas tubulares en dispositivos microfluídicos

Como se observó que la línea celular utilizada formaba estructuras autoorganizadas tubulares sin necesidad de sembrar las células sobre una matriz biológica o sobre un *coating* de proteínas de la ECM, se adaptó el protocolo de siembra para poder generar las mismas estructuras en

4. Desarrollo del modelo de tubulogénesis

un dispositivo microfluídico (Figura 4.5). El objetivo de sembrar las RPTEC/TERT1 en el dispositivo era la creación de un gradiente con un factor de crecimiento añadido al medio de cultivo en uno de los canales laterales para ver cómo afectaba a la elongación o ramificación de los túbulos. En este caso, hubo que aumentar la concentración de Matrigel en la suspensión celular ya que la concentración de células también era mayor en comparación con el protocolo establecido en pocillos de placa de 96 o en los μ -slide *Angiogenesis*.

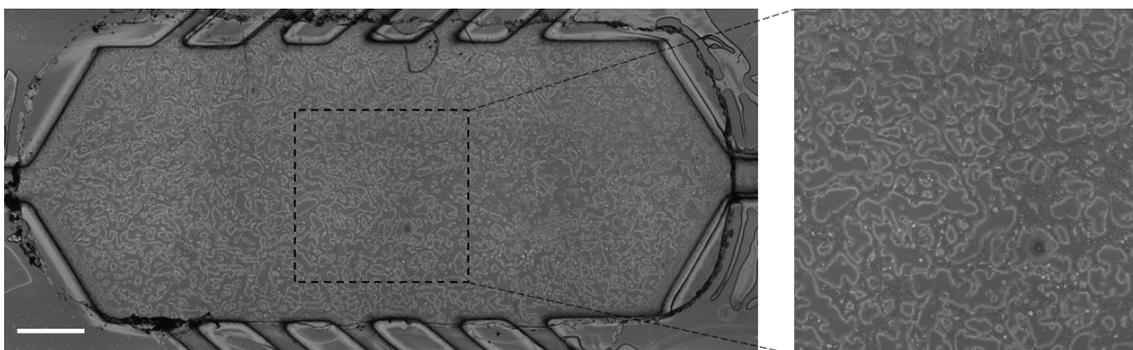


Figura 4.5. Formación de estructuras autoorganizadas con forma tubular en el dispositivo microfluídico. La línea celular RPTEC/TERT1 se sembró en la cámara central a una densidad de 130.000 células/cm² un 20% de MG añadido en la suspensión celular. Tras 24h se observó que las estructuras tubulares estaban adheridas a la base del dispositivo. Barra de escala 500 μ m.

Las células recubrieron toda la superficie de la cámara central del dispositivo, recreando estructuras autoorganizadas con morfología tubular a las 24h tras la siembra (Figura 4.5). Los canales laterales fueron utilizados para renovar el medio de cultivo y que éste pudiese perfundir a través de los pilares laterales hacia la cámara central.

2.2.4. Caracterización de las estructuras autoorganizadas tubulares generadas en cultivo 2.5D por inmunofluorescencia

Con el objetivo de caracterizar el grado de diferenciación alcanzado en el cultivo 2.5D, se analizaron diferentes marcadores epiteliales presentes en las células del túbulo proximal. Esto se llevó a cabo mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, siete días después de la siembra de las RPTEC/TERT1 sobre un hidrogel compuesto por colágeno I y Matrigel en una proporción 90:10, y sin dicho hidrogel, añadiendo el 5% de Matrigel necesario a la suspensión celular para generar las estructuras tubulares descritas anteriormente.

Para ello se utilizaron tres marcadores: faloidina para observar la disposición de los filamentos de actina, tubulina acetilada para observar el cilio primario y el citoesqueleto y la *zonula occludens* (ZO-1), que es un tipo de unión estrecha presente en células epiteliales.

4. Desarrollo del modelo de tubulogénesis

Se observó que la actina delimitaba el interior del túbulo, situándose en la parte apical de las células, hacia el interior de la luz de la estructura tubular (Figura 4.5 B). La presencia de ZO-1 demostró la unión entre las células, delimitando su contorno (Figura 4.5 C, F), y se vio que la tubulina acetilada se encontraba mayormente en el cilio primario, un orgánulo mecanosensor presente en este tipo celular, y que también marca la polarización de estas células hacia la luz tubular, ya que se encuentra en la parte apical de las células (Figura 4.5E).

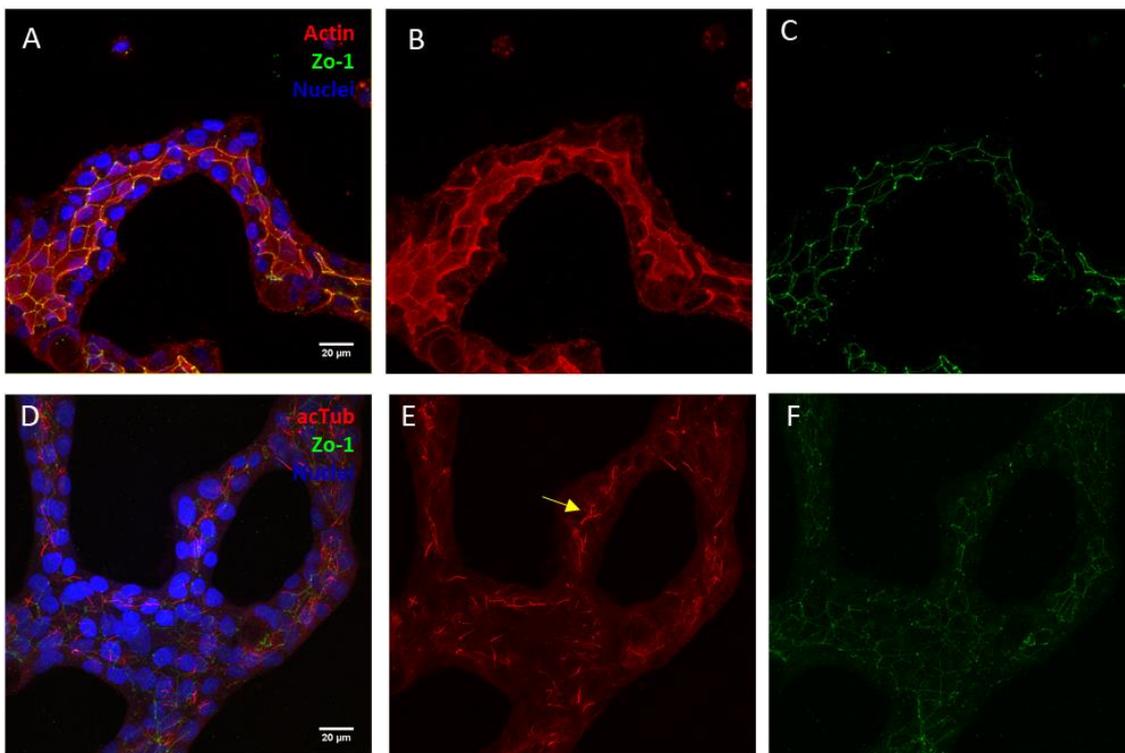


Figura 4.5. RPTEC/TERT1 con 5% Matrigel sobre hidrogel de colágeno I + Matrigel (90:10). Imágenes de microscopía confocal donde se observan las formaciones tubulares de RPTEC/TERT1 sobre hidrogel. Se observa la tubulina acetilada formando parte del cilio primario. La flecha amarilla de la imagen señala la zona donde se encuentran los cilios (E). El lumen de la formación tubular se ve delimitado por la ubicación de la actina en la parte apical de las células (B). La ZO-1 muestra la unión entre las células del túbulo proximal (C, F). Barra de escala 20 μm .

Por otro lado, cuando se llevó a cabo la misma técnica de inmunofluorescencia en las RPTEC/TERT1 formando estructuras tubulares sin un hidrogel en la base, se observaron los mismos marcadores que en las células sembradas sobre el hidrogel. La actina estaba presente en el citoesqueleto y también se vio mayor presencia de la misma en la parte apical de las células, sugiriendo así la polarización celular hacia el interior del túbulo (Figura 4.6 B). La ZO-1 estaba igualmente presente en las células (Figura 4.5 C, F), delimitando el contorno celular, y la tubulina acetilada se localizó también en el cilio primario, aunque esta vez de

4. Desarrollo del modelo de tubulogénesis

forma no tan polarizada hacia el interior de las estructuras tubulares generadas y en menor número, en comparación con las células sobre el hidrogel (Figura 4.6 E).

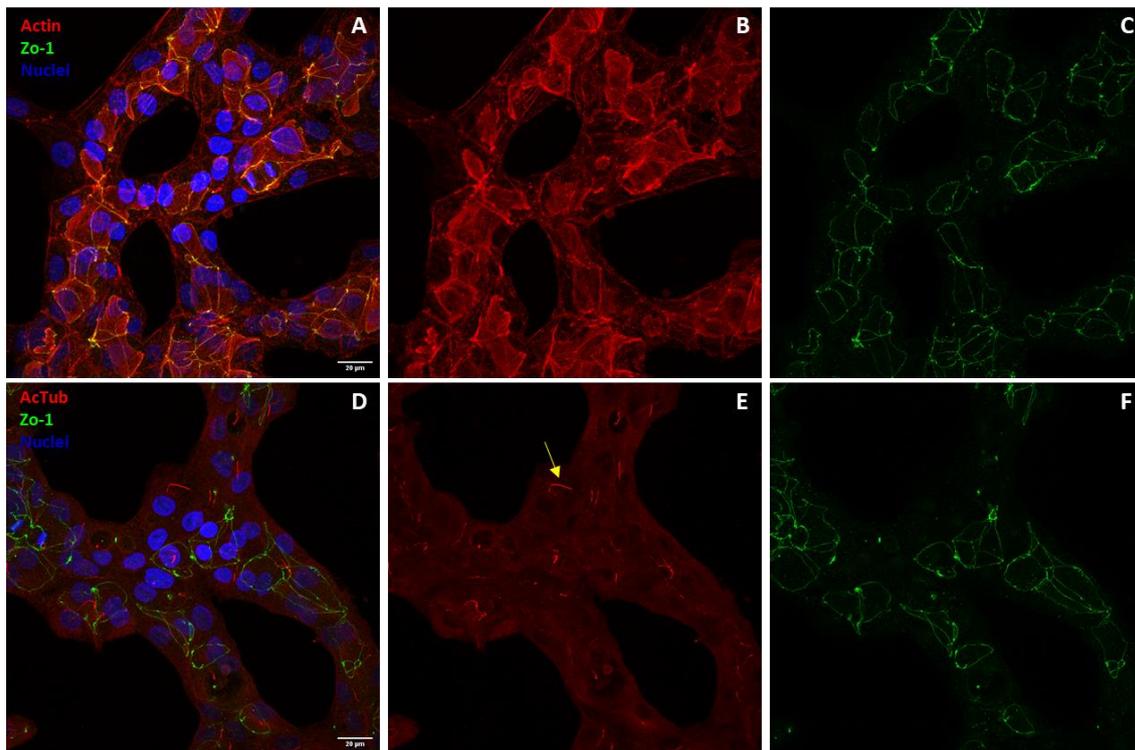


Figura 4.6. RPTEC/TERT1 con 5% de Matrigel sin hidrogel. Imágenes de microscopía confocal donde se observan las formaciones tubulares de RPTEC/TERT1 sin base de hidrogel. Se observa la actina en rojo (B) la ZO1 en verde delimitando el contorno celular (C, F) y la tubulina acetilada formando parte del cilio primario, donde se ha marcado con una flecha amarilla uno de los cilios observados en la imagen (E). Barra de escala 20 μ m.

En ambos modelos se pudo visualizar la actina acumulada en la parte apical de las células, delimitando la luz del túbulo. La ZO-1 también está presente en los dos modelos, aunque en las células donde no había hidrogel en la superficie se vio que no todas las células estaban marcadas. En el caso del cilio primario, sí se vio en ambos modelos, pero en menor en los túbulos que se habían formado sin la base de hidrogel (Figura 4.6 E).

Por otro lado, se quiso analizar si las RPTEC/TERT1 expresaban algún marcador de dediferenciación, como la vimentina, que es una proteína fibrosa que forma los filamentos intermedios del citoesqueleto y está presente en células endoteliales, pero no en células epiteliales. En las RPTEC/TERT1, tanto en el modelo sin hidrogel como con hidrogel, se observó la presencia de vimentina en el citoesqueleto (Figura 4.7 A, B).

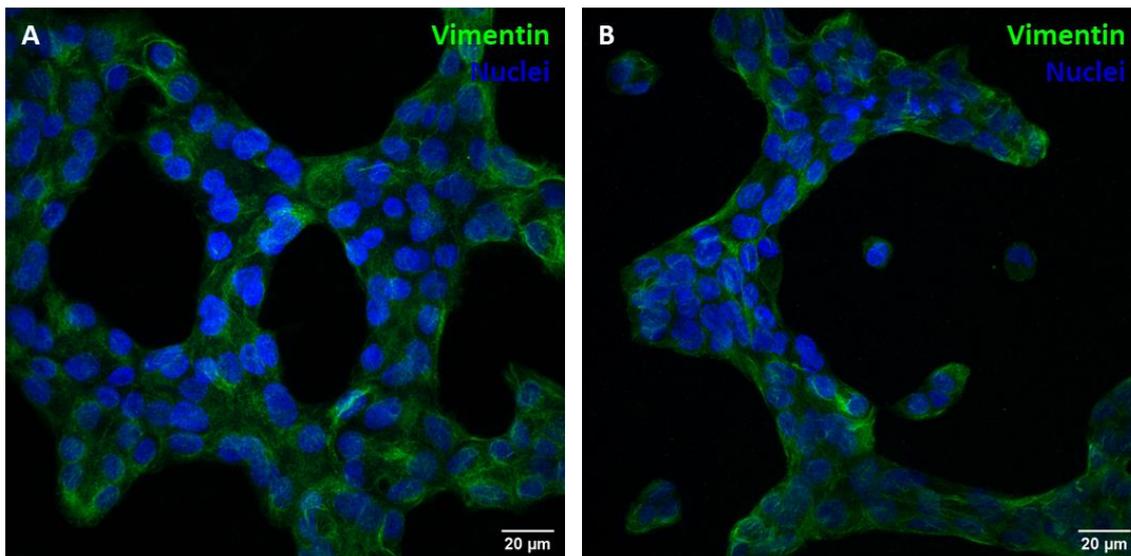


Figura 4.7. Presencia de vimentina en estructuras tubulares. Las RPTEC/TERT1 dieron positivo en la tinción de vimentina, que en las imágenes se ve en verde, tanto en el modelo sin hidrogel (A) como con hidrogel (B). La vimentina es un marcador específico de células endoteliales y no epiteliales como las RPTEC/TERT1. Barra de escala 20 μm .

4.2.5. Transporte de daunorrubicina en estructuras tubulares

Con el fin de comprobar si las estructuras tubulares realmente tenían una luz en el interior y ver si eran capaces de transportar fármacos hacia el lumen, se utilizó daunorrubicina, que por su coloración rojiza permitía visualizar el transporte vectorial del fármaco desde el medio de cultivo donde había sido diluido hasta la luz de los túbulos. Para ello, se trataron las RPTEC/TERT1 formando estructuras tubulares sobre hidrogel con daunorrubicina a una concentración de 50 μM durante un periodo de 24h. Pasado este tiempo, se observó que el fármaco se acumulaba en la zona central de las estructuras tubulares, delimitando así la luz de los túbulos que se habían formado (Figura 4.8).

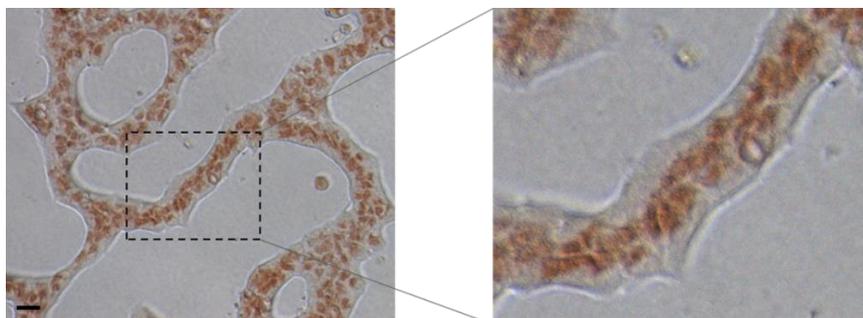


Figura 4.8. Tratamiento con daunorrubicina en RPTEC/TERT1 formando estructuras tubulares. Las RPTEC/TERT1 sobre hidrogel se trataron con daunorrubicina a una concentración de 50 μM durante 24h. Se observó que el fármaco se había acumulado en la luz de las formaciones tubulares. Barra de escala 20 μm .

4. Desarrollo del modelo de tubulogénesis

Con este resultado se demostró que los túbulos eran funcionales, ya que se había producido la acumulación del nefrotóxico en la luz de las estructuras tubulares y que había sido transportado desde el medio de cultivo hacía el interior de los túbulos. Este efecto no se observó a concentraciones altas ya que las células habían perdido su morfología y no se veía la estructura tubular definida.

4.2.6. Expresión génica de marcadores renales en RPTEC/TERT1 en el modelo de tubulogénesis

Las células del túbulo proximal expresan diferentes marcadores específicos de esta parte de la nefrona y, para comprobar el efecto de las condiciones aplicadas a la expresión de marcadores, se llevó a cabo una RT-PCR para comprobar variaciones entre las muestras control en monocapa respecto a las estructuras tubulares generadas sobre el hidrogel de colágeno I y Matrigel. Se comprobó que genes que se expresan en el túbulo proximal renal humano como DDP4, GGT1 y SGLT2, estaban presentes tanto en el control como en las estructuras tubulares (Figura 4.9). La megalina, que es un receptor para la endocitosis mediada por caveolas y que se expresa en el túbulo proximal, no se observó en ninguna de las condiciones. Sin embargo, otros marcadores como α -SMASMA, KSP y NKCC2 sí se expresaron en ambas condiciones, aunque no deberían estar presentes ya que se expresan en otras partes de la nefrona, pero no en el túbulo proximal.

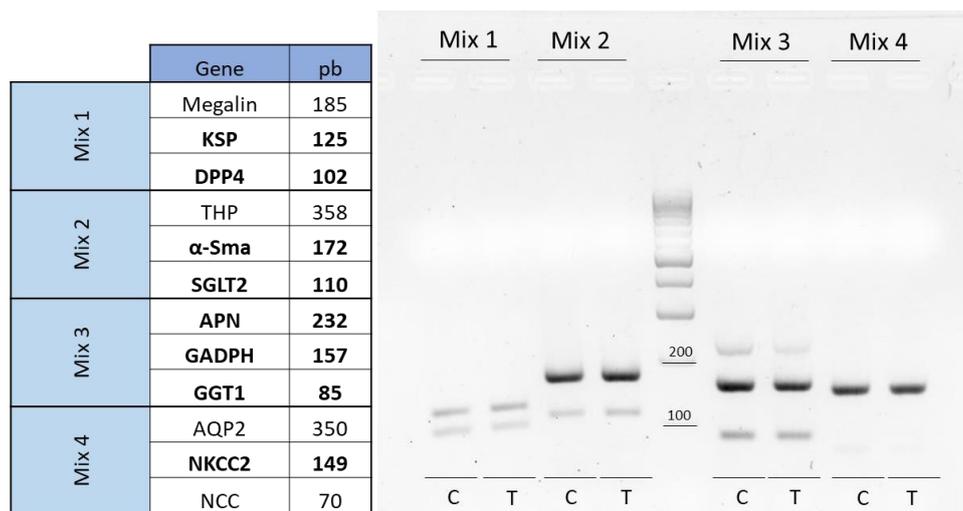


Figura 4.9. Expresión de diferentes genes en RPTEC/TERT1 mediante RT-PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 2% donde se observan las bandas de los diferentes genes que se expresan en las células RPTEC/TERT1 tanto en la condición control (C) en monocapa como en las estructuras tubulares (T) sobre hidrogel. Entre los mixes 1,2 y 3,4 está el control de carga de 100-1000 pb.

4. Desarrollo del modelo de tubulogénesis

Con el fin de analizar de forma cuantitativa la expresión de marcadores renales específicos en la línea celular utilizada, se llevó a cabo un análisis mediante qPCR de varios genes, tanto específicos como no específicos de las células del túbulo proximal (Figura 4.10). Se observó un aumento en la expresión del transportador OCT1 cuando las células estaban formando estructuras tubulares sin hidrogel en la base, mientras que para el transportador AQP1 se vio aumento de expresión tanto en la condición con hidrogel como sin hidrogel respecto al control en monocapa. Estos cambios en la expresión no fueron significativos estadísticamente debido a la variabilidad entre los experimentos y al bajo número de experimentos independientes.

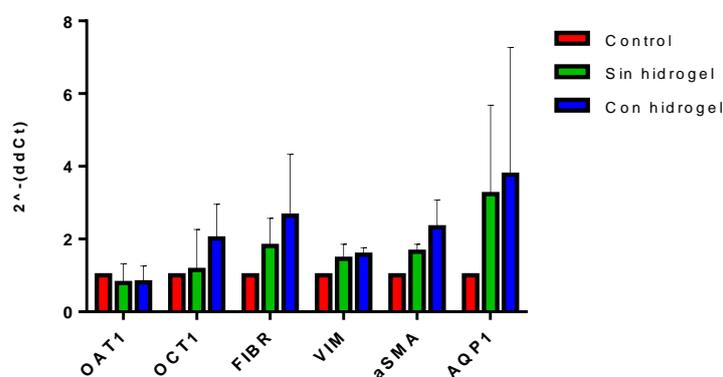


Figura 4.10. Expresión de diferentes marcadores presentes en la línea celular RPTEC/TERT1. Se analizó la expresión de transportadores y marcadores de desdiferenciación en los tres modelos, tanto en el control como en los túbulos con o sin gel. No se hallaron diferencias significativas entre los modelos, pero sí vio el aumento en la expresión de OCT1, fibrina, vimentina, α -SMA y AQP1 en los modelos de tubulogénesis. Two-way ANOVA. n=3

Sin embargo, también se observó un incremento no significativo de expresión en fibronectina, vimentina y α -SMA, que no son marcadores específicos de este tipo celular, cuando las células formaban túbulo en ambos modelos respecto al control (Figura 4.10). Por otro lado, otros transportadores presentes en el túbulo proximal renal humano como OCT2 y OAT3 fueron también analizados, pero no se observó expresión de ninguno de ellos en los tres modelos estudiados.

4.3. Discusión

El uso de matrices biológicas para obtener modelos tridimensionales que se asemejen a las estructuras encontradas en los tejidos es una técnica ampliamente utilizada. En el caso del riñón, se han desarrollado modelos *in vitro* utilizando diferentes proteínas de la matriz extracelular para generar estructuras tubulares, con el fin de estudiar la morfogénesis y el desarrollo del riñón, pero también para generar modelos de enfermedades y para ensayos de toxicidad frente a fármacos (Taub *et al.*, 1990; Sakurai *et al.*, 1997; DesRochers *et al.*, 2013; King *et al.*, 2017). Con el fin de recrear diferentes partes de la nefrona, en estos modelos se han utilizado líneas celulares establecidas, líneas primarias y también células madre. Estas últimas con finalidad de ser posteriormente diferenciadas a diferentes linajes de células renales.

Uno de los parámetros a tener en cuenta a la hora de recrear estructuras tubulares sobre hidrogeles es la rigidez de los mismos. Cada tejido tiene unas propiedades elásticas específicas definidas por su módulo elástico de Young y está relacionado con la función primaria del órgano. La rigidez del hueso (15000-20000 kPa) es completamente diferente de la rigidez encontrada en el riñón (5-10 kPa). La rigidez de la ECM induce la reorganización de la actina y la contractilidad, ambas implicadas en la adhesión, la migración, la proliferación o la diferenciación. En cuanto a la topografía, se sabe que la estructura de la superficie puede estar implicada en la polarización celular, la alineación de las fibras de actina o la formación de adhesiones focales. La adhesión celular, la orientación, la migración y la morfología pueden ser moduladas en función de las características topográficas del sustrato (Otero, Navajas and Alcaraz, 2020)(Kim *et al.*, 2012). Por otra parte, la dimensionalidad de la superficie del cultivo celular, que es un parámetro relacionado con la forma en que se distribuyen las células en un tejido específico, es una variable que también se ha sugerido que desempeña un papel en la proliferación y autorrenovación celular. La distribución física de las proteínas de la ECM afecta a diferentes parámetros celulares, como la morfogénesis de las células diferenciadas y la proliferación (Nur-E-Kamal *et al.*, 2006). Se ha observado que la elasticidad de la superficie donde se lleva a cabo el cultivo celular de células renales afecta a su disposición en el espacio y a su morfología. La dureza del plástico de una placa de Petri ($> 10^9$ Pa) no es la misma que la del parénquima renal normal (1-2 kPa), por lo que, dependiendo del sustrato utilizado para el cultivo, las células renales tienden a formar diferentes estructuras. En la línea celular LLC-PK1 se observó que en matrices más rígidas, con una dureza mayor a 0.7 kPa, las células se expandían y proliferaban más que en matrices

4. Desarrollo del modelo de tubulogénesis

menos rígidas (0.2 kPa) (Chen, Lin and Tang, 2014). Este efecto se observó también en la línea celular de origen humano RPTEC. Se sembraron las células en geles compuestos de PEG, en los cuales se puede controlar la rigidez, a diferencia de las matrices basadas en componentes biológicos como Matrigel o diferentes tipos de colágeno. Se vio que conforme aumentaba la rigidez de los geles, la presencia de adhesiones focales también aumentaba (Beamish, Chen and Putnam, 2017). Estas adhesiones focales están correlacionadas con la adhesión al sustrato, su expansión y proliferación en el mismo (Handorf *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos con las RPTEC/TERT1 sobre hidrogeles de diferente composición (Figura 4.1 A-E) pueden estar relacionados con la rigidez de los mismos. Cuando las células se sembraron sobre los hidrogeles, se vio que en 24h éstas se expandieron más en aquellos donde la proporción de colágeno era mayor, empezando a formar una monocapa en su superficie (Figura 4.1 A, B y D). Por otro lado, en las matrices formadas solo por MG, las células formaron estructuras esféricas sobre la superficie del hidrogel (Figura 4.1 E). La rigidez de la matriz, la presencia de laminina en los hidrogeles con mayor proporción de MG y los factores de crecimiento pueden estar relacionados con la disposición de las células en la superficie.

Con el fin de estudiar si el MG podía influir directamente en la formación de estructuras de tipo quístico o tubular en vez de formar una monocapa, éste se añadió en un 5% al medio de cultivo con las RPTEC/TERT1 sobre los diferentes hidrogeles (Figura 4.1 F-J). En estudios previos se observó que cuando se añadían diferentes concentraciones de MG, 0.5%, 2% y 5%, la condición donde se formaban estructuras tubulares era la del 5%, ya que a concentraciones menores no se observaban. A concentraciones más bajas las células mRPTEC, células primarias de ratón, se extendían y proliferaban en la superficie (Chen, Lin and Tang, 2014). Por esta razón, en el modelo aquí desarrollado se tomó como punto de partida la concentración de 5% MG en el medio de cultivo cuando se sembraron las RPTEC/TERT1 sobre los diferentes hidrogeles. Cuando la concentración de colágeno I era mayor (Figura 4.1 F, G e I) la formación de estructuras fue predominante respecto a estructuras quísticas. Por el contrario, en las condiciones con mayor concentración de MG, las estructuras formadas fueron esféricas y durante el tiempo que se mantuvieron en cultivo no se produjo la elongación de estructuras tubulares a partir de dichos quistes (Figura 4.1H, J). Como se ha dicho anteriormente, el Matrigel está compuesto por tres proteínas principales de la membrana basal, siendo la laminina la que se encuentra en mayor proporción, de aproximadamente un 60% respecto al colágeno IV, que se encuentra en un 30% y la entactina en un 8%. Por esta razón se quiso comprobar si la laminina por sí misma era capaz de generar

4. Desarrollo del modelo de tubulogénesis

estructuras tubulares. Se observó que utilizando laminina en la suspensión celular como se había hecho con el Matrigel, no se generaron las estructuras tubulares, lo que sugiere que en el modelo aquí descrito son necesarios más componentes de la membrana basal aparte de la laminina para obtener estructuras tridimensionales. Un estudio con la misma línea celular, RPTEC/TERT1, utilizó una matriz biológica compuesta de laminina y entactina (L-E), y fue co-cultivada con fibroblastos. La combinación de todos ellos dio como resultado la generación de estructuras tubulares sobre los hidrogeles. La razón para utilizar esta matriz de L-E fue que el MG tiene la desventaja de que sus componentes varían según el lote y es difícil conocer la concentración real de todos sus componentes. Utilizando solamente esta matriz L-E se reducían variables y podía observarse el efecto de la laminina como componente principal de la membrana basal. Sin embargo, cuando utilizaron la matriz L-E sin el co-cultivo con los fibroblastos, las RPTEC/TERT1 no generaron estructuras tubulares, sugiriendo así que los factores de crecimiento secretados por los fibroblastos eran necesarios para que este proceso de tubulogénesis ocurriera (Adelfio, Szymkowiak and Kaplan, 2020). Estos datos corroboran los que fueron obtenidos en los experimentos con las lamininas 511 y 521 (Figura 4), en los que no se observó la formación de túbulos en comparación con la condición donde se utilizó el 5% de MG con este mismo propósito.

Otra forma de utilizar las proteínas de la matriz extracelular es recubriendo la superficie sobre la que se van a sembrar las células con un *coating*, favoreciendo así su adhesión y pudiendo producir cambios en la disposición del cultivo celular sobre el sustrato. Como los resultados en los hidrogeles sugerían que era más importante la presencia de factores bioquímicos que el hecho de crecer las células en un sustrato más elástico como el hidrogel, decidimos comprobar si se podía inducir la tubulogénesis directamente sobre el plástico, haciendo *coatings* con diferentes proteínas de la ECM. Cuando se añadió el 5% de MG al medio de cultivo, se observó la formación de estructuras tubulares en todas las condiciones, incluso en la condición control en la que no se había recubierto el pocillo con ningún *coating*. De esta forma se corroboró de nuevo que la adición del MG a la suspensión celular era el factor determinante para la formación de los túbulos, independientemente de si había un hidrogel o un recubrimiento en la superficie.

Una de las ventajas de utilizar únicamente MG en este modelo para la recreación de estructuras tubulares es que el protocolo se simplifica de forma sustancial, además de que en 24h ya se observan dichas estructuras, en comparación con otros modelos donde se han usado proteínas de la ECM, donde la formación de los túbulos lleva varios días. Además, en la mayoría de los modelos descritos las células se encuentran embebidas en la matriz

4. Desarrollo del modelo de tubulogénesis

biológica, lo que dificulta el manejo de este tipo de estructuras en 3D. Otro de los factores a tener en cuenta para el uso de este modelo es el soporte en el que se han generado las estructuras tubulares. El uso del μ -*slide angiogenesis* de IBIDI ofrece diferentes ventajas respecto al uso de una placa multipocillo convencional. El volumen necesario de medio de cultivo y el número de células imprescindibles para la formación de estructuras tubulares es mucho menor respecto a una placa de 96 pocillos, lo que reduce costes y aumenta el número de ensayos que pueden hacerse de partida. La geometría del pocillo hace que al añadir el hidrogel no se genere menisco, algo que sí ocurre en una placa de 96 pocillos, y esto interfiere en la disposición de las células sobre el hidrogel, ya que las propiedades del mismo pueden variar en los bordes y en el centro del pocillo al no tener la misma altura en todos los puntos. Este problema con los hidrogeles en una placa convencional se elimina con el uso de este *slide*. Otra de las ventajas que ofrece es la propiedad óptica del material con el que está fabricado el *slide*, que es muy similares a las del cristal, por lo que su visualización, tanto en microscopia de campo claro, como en fluorescencia o microscopía confocal es mucho mejor que en una placa convencional, donde la óptica tiene varias limitaciones, sobre todo a la hora del uso de técnicas de inmunofluorescencia. Si bien es cierto que las propiedades ópticas permiten la directa visualización de las estructuras en el mismo *slide*, en el caso de los hidrogeles sobre los que se generaron estructuras tubulares, hubo que extraerlos de los pocillos ya que la distancia focal del microscopio no permitía la visualización de los túbulos sobre el hidrogel, pero sí era posible cuando las células se sembraron en los pocillos sin hidrogel.

Un paso más a la hora de diseñar un modelo más complejo de túbulo proximal *in vitro* fue combinar la generación de túbulos, como se ha descrito previamente, con tecnología basada en microfluídica, la cual es relativamente nueva en el campo del cultivo celular y que se utiliza en la actualidad para el diseño de modelos más sofisticados. La microfluídica se ha aplicado al estudio de diferentes tejidos, entre ellos también el riñón, generando nuevos modelos que vienen a contribuir a la reducción de animales de experimentación como el único modelo más allá del cultivo celular tradicional válido para el estudio de toxicidad de fármacos (Kimura, Sakai and Fujii, 2018). Por esta razón se quiso combinar el cultivo celular en 3D haciendo uso de un dispositivo microfluídico, generando estructuras tubulares en el interior del mismo. Se consiguió generar túbulos dentro del dispositivo, pero el diseño de este era limitante a la hora de realizar diferentes análisis posteriores. Por un lado, las dimensiones de la cámara central donde se sembraron las células eran muy pequeña, por lo que la cantidad de muestra que se podía recoger de cada dispositivo no es suficiente para hacer posteriores

4. Desarrollo del modelo de tubulogénesis

análisis de expresión de genes mediante RT-PCR o qPCR. Otro factor a tener en cuenta con este diseño fue que era difícil generar un gradiente de difusión del medio de cultivo con factores de crecimiento o con fármacos nefrotóxicos desde los canales laterales a la cámara central donde se encontraban las células, debido a que las células no se encontraban completamente embebidas en un hidrogel, por lo tanto la entrada de los factores de crecimiento o el nefrotóxico mediante un gradiente de difusión a la cámara central no fue posible. Por estas razones se descartó este modelo de dispositivo para los ensayos de nefrotoxicidad.

Una de las características del epitelio del túbulo proximal es que sus células se encuentran polarizadas hacia la luz del mismo. Esta polarización tiene lugar ya durante el desarrollo del riñón, donde hay diversos mecanismos implicados en la morfogénesis de este órgano (Reidy and Rosenblum, 2009). En el modelo aquí descrito esta polarización sigue presente en las estructuras tubulares generadas con o sin un hidrogel en la superficie, y se pudo observar al utilizar diferentes marcadores para corroborar que las células se disponían hacia la luz de los túbulos. En el caso de la actina, se observó que se distribuyó de forma predominante en la zona apical de las células, delimitando visiblemente la luz de los túbulos formados sobre el hidrogel (Figura 4.6 B). En el caso de las estructuras tubulares generadas sin hidrogel, se observaron fibras de estrés de actina en el citoplasma, algo que no se observó en las células sobre hidrogel (Figura 4.7 B). Esto puede estar relacionado con la rigidez del sustrato, ya que en un estudio previamente mencionado, se vio el mismo efecto dependiendo de la rigidez del gel, que en este caso eran geles sintéticos con diferente elasticidad (Beamish, Chen and Putnam, 2017). La ZO-1 también es un marcador del grado de polarización de las células y en el caso de las RPTEC/TERT1 sobre el hidrogel se vio su expresión a lo largo de las estructuras tubulares, sin embargo, en las células sin hidrogel esta distribución por todo el túbulo no era tan visible (Figura 4.7 C, F). El número de cilios que se observó en la condición con hidrogel (Figura 4.6 E) fue mayor que sin el hidrogel (Figura 4.7 E), y esto puede estar relacionado con el estado de maduración de las células. El cilio primario está presente cuando las células están en confluencia y ya no predomina la proliferación. Esta diferencia entre las dos condiciones podría deberse a que las células cuando están en sustratos más rígidos tienden a proliferar mientras que en sustratos más elásticos predomina la diferenciación. Ambas condiciones mostraron una morfología más cercana a la que se observa en el parénquima renal nativo, siendo la condición con el hidrogel la que muestra una capa celular más polarizada y con mayor diferenciación del epitelio tubular renal. Sin embargo, en ambos modelos de tubulogénesis, con y sin hidrogel, se halló la presencia de vimentina (Figura 4.7)

4. Desarrollo del modelo de tubulogénesis

en el citoesqueleto de las RPTEC/TERT1, un marcador de células endoteliales y no de epiteliales, lo que podría sugerir una posible dediferenciación celular. Dado que con la inmunofluorescencia se pudo ver que la morfología representaba lo que se puede observar *in vivo*, se quiso hacer un análisis mediante qPCR de algunos marcadores que pueden encontrarse en estas células y observar así si se ha mejorado el fenotipo de las mismas cuando están formando estructuras tubulares respecto a un control en monocapa (Figura 4.10). En el caso de los transportadores OCT1 y AQP1 se observa una tendencia en la que su expresión aumenta en las formaciones tubulares respecto al control en monocapa, algo que se ha observado en otros estudios con cultivo celular en 3D (Wang *et al.*, 2019). También se analizó la expresión de OAT1 y OAT3, presentes en el túbulo proximal, pero se vio que no se expresaban en ninguna de las condiciones. Esto puede estar relacionado con que la línea celular RPTEC/TERT1 no exprese estos transportadores, como se vio en un estudio en el que se analizaron diferentes transportadores en esta misma línea celular y no se observó tampoco que se expresasen cuando se cultivaron las células en placas multipocillo (Secker *et al.*, 2019). En nuestro modelo también se observó el incremento en la expresión de marcadores relacionados con la transición epitelio-parénquima, la fibronectina, la vimentina y α -SMA, como se ha visto en otros tipos de células epiteliales renales en cultivo celular (Forino *et al.*, 2006).

Uno de los problemas detectado en el modelo de tubulogénesis aquí desarrollado es la alta variabilidad en la formación de estructuras tubulares. Es un proceso difícil de cuantificar y aunque el modelo está diseñado para que sea una técnica de fácil manejo y que pueda implantarse en un laboratorio sin necesidades técnicas específicas, tiene sus limitaciones. Los experimentos pueden ser heterogéneos y hay variables difíciles de controlar, como la formación de las estructuras tubulares. Esta puede ser la razón de la variabilidad vista en las muestras analizadas por qPCR, además de que se obtiene poca cantidad de RNA en estas muestras respecto a una placa multipocillo. A pesar de esto, el modelo ofrece algunas ventajas respecto al cultivo celular tradicional, ya que la disposición de las células formando estructuras tubulares, a diferencia de las células que forman una monocapa sobre una superficie, permite que la parte basal de los túbulos esté expuesta y así facilitar el transporte de sustancias hacia el interior del lumen. El hecho de que este tipo de estructuras también se generen sin la necesidad de un hidrogel hace más fácil el uso de este modelo para ensayos de transporte de fármacos o de sondas fluorescentes ya que los hidrogeles pueden adsorber dichas sustancias e interferir en los resultados.

5. DESARROLLO DEL MODELO

KIDNEY-ON-A-CHIP

5.1 Introducción

La tecnología microfluídica ha permitido a lo largo de los últimos años el desarrollo de nuevos modelos avanzados de cultivo celular. Esta nueva metodología ha permitido establecer el control en el microambiente celular debido a la posibilidad de perfundir líquidos y también partículas con las que las células pueden interactuar, recreando así un ambiente más fisiológico que el cultivo tradicional.

5.1.1. Tipos de dispositivos microfluídicos

El primer paso para el desarrollo y diseño de un dispositivo microfluídico es la elección del material con el que éste se va a fabricar ya que, dependiendo de las características requeridas, el material de elección puede ser diferente según las necesidades de los experimentos que se vayan a realizar con ellos. Desde que se comenzó a trabajar con este tipo de tecnología aplicada al cultivo celular hace casi dos décadas, los chips microfluídicos se han fabricado con diversos materiales con diferentes propiedades (Ren, Zhou and Wu, 2013).

Los dispositivos fabricados a partir de materiales basados en polímeros son los más utilizados en el campo de la microfluídica, ya que su superficie es fácilmente modificable para aplicaciones biomédicas y son biocompatibles con el cultivo celular (Gencturk, Mutlu and Ulgen, 2017). Estos polímeros se clasifican en elastómeros, termoestables y termoplásticos (Tabla 5.1). El polidimetilsiloxano (PDMS) es el elastómero más utilizado en microfluídica, debido en parte a su bajo coste económico, pero también a su fácil manejo. Además, ofrece la ventaja de que es un material versátil con el que hacer modelos complejos. Es permeable a gases, lo que permite que el cultivo celular pueda mantenerse a largo plazo. Sin embargo, tiene algunas limitaciones debido a que es un material hidrofóbico, lo que hace que su superficie tenga que ser tratada para que sea compatible con la adhesión celular, además de que es un material muy poroso, y se produce adsorción de pequeñas moléculas y lípidos desde el medio de cultivo al PDMS (Van Midwoud *et al.*, 2012; Mehling and Tay, 2014). Dentro del grupo de los polímeros termoestables, el SU-8 es el que más se ha utilizado para la fabricación de dispositivos microfluídicos (Tabla 5.1). Uno de sus usos ha sido la fabricación del molde con el que se producen los dispositivos de PDMS, pero también se ha utilizado directamente para hacer dispositivos microfluídicos. Uno de sus mayores problemas es la biocompatibilidad. Ésta se define como la capacidad de algunos materiales de estar en

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

contacto con tejidos sin producir un daño severo en el organismo en el que se utiliza. Este material puede dar problemas de biocompatibilidad dependiendo del tipo celular que se utilice, aunque el tratamiento de su superficie con diferentes técnicas, como la aplicación de plasma de oxígeno o el recubrimiento de su superficie mediante proteínas de la matriz extracelular mejora la adhesión y proliferación celular (Chen and Lee, 2021). Debido a la variabilidad en la biocompatibilidad y a su alto coste de producción, hoy en día no es el material de elección para modelos de *organ-on-a-chip*.

Por último, los polímeros termoplásticos como el poliestireno (PS), los polímeros cíclicos de olefina (COP) y los copolímeros cíclicos de olefina (COC) han emergido también en el campo de la microfluídica por presentar propiedades que les hacen que sean una buena opción para el cultivo celular (Tabla 5.1). Este tipo de materiales son transparentes, tienen baja adsorción, son resistente a químicos, además de no presentar autofluorescencia. Su bajo coste de producción, debido a que se pueden fabricar en grandes lotes por inyección en moldes, hace que sean un buen material de elección para la fabricación de dispositivos. El ensamblaje de sus piezas puede hacerse por termocompresión, lo que hace que se eliminen elementos de adhesión como adhesivos biocompatibles, los cuales pueden hacer que la geometría del dispositivo varíe, teniendo así el control sobre las dimensiones de los canales donde se van a sembrar las células. Además, su superficie puede ser también modificada mediante tratamientos de plasma de oxígeno y/o con *coatings* de proteínas de la ECM (Nunes *et al.*, 2010; Bernard *et al.*, 2019).

Hoy en día existen dispositivos comerciales hechos a partir de este tipo de polímeros termoplásticos, lo que favorece la estandarización de su uso para la generación de modelos *organ-on-a-chip*.

Tabla 5.1. Materiales más utilizados en la fabricación de dispositivos microfluídicos. Los materiales más utilizados para la fabricación de dispositivos se pueden clasificar en materiales inorgánicos, polímeros elastómeros y plásticos. Cada uno de ellos tiene sus ventajas e inconvenientes como se detalla a modo de resumen en la tabla.

Materiales inorgánicos	
Vidrio y silicona	<p>Ventajas:</p> <ul style="list-style-type: none">- Materiales termoestables- Compatibilidad con solventes <p>Desventajas:</p> <ul style="list-style-type: none">- Alto coste de fabricación- El proceso de fabricación requiere de materias peligrosas

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

		- Dificultad para el ensamblaje de los dispositivos (altas temperaturas, alta presión, entornos muy limpios)
Polímeros elastómeros y plásticos		
Elástómeros	PDMS	<p>Ventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Fabricación fácil y económica - Puede adherirse fácilmente a superficies de PDM o vidrio por contacto. - Alta elasticidad - Permeable a gases - Transparente <p>Desventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Matriz muy porosa - Incompatibilidad con solventes orgánicos - Absorción de moléculas pequeñas hidrofóbicas - Adsorción de biomoléculas - Cambios en la concentración de solutos por evaporación
Termoestables	SU-8	<p>Ventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estables a altas temperaturas - Resistente a la mayoría de solventes - Ópticamente transparentes <p>Desventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Alta rigidez - Elevado coste de fabricación
Termoplásticos	PMMA, PC, PS, COC, COP	<p>Ventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mejor compatibilidad con solventes que el PDMS - Producción a gran escala y poco coste - Mejor opción para producción de dispositivos comerciales - Transparentes - COP/COC No auto fluorescentes <p>Desventajas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Impermeables a gases

Datos recogidos de:(Van Midwoud *et al.*, 2012)

Abreviaturas: PDMS: polidimetilxiloxano, PMMA: polimetilmetacrilato, PC: policarbonato, PS: poliestireno, COC: copolímero de olefina cíclica, COP: polímero de olefina cíclica.

5.1.2. Técnicas de perfusión de medio de cultivo para la aplicación de *shear stress*

A la hora de aplicar *shear stress* al cultivo celular, se han utilizado diferentes estrategias para exponer a las células renales a dicho estímulo, que es fisiológico en el tejido renal *in vivo*. La forma más sencilla es utilizar herramientas que permitan mantener el medio en movimiento durante el cultivo celular, como pueden ser los balancines orbitales y los que se mueven en un eje horizontal (Figura 5.1 A). Este método es el más sencillo, pero requiere de un cambio de medio de cultivo con una frecuencia determinada dependiendo del metabolismo de las células que se cultivan en el dispositivo, y también depende del tamaño del reservorio de las entradas a los canales que albergan el cultivo celular. Además, la dirección del flujo no es unidireccional, y por tanto, no representa la fisiología del tejido renal nativo. Este tipo de flujo en dos direcciones opuestas hace que sea complicado calcular el *shear stress* real que se está aplicando sobre el cultivo celular, ya que el flujo varía en cada punto del ciclo del balancín (Figura 5.1 C). (Long *et al.*, 2017; Ferrell *et al.*, 2018; Vriend *et al.*, 2020). Uno de los métodos más reportados en la literatura para aplicar un flujo determinado sobre los canales de los dispositivos microfluídicos es el uso de la bomba peristáltica para impulsar el medio de cultivo a través de tubos conectados al dispositivo (Essig and Friedlander, 2003; Baudoin *et al.*, 2007; Maggiorani *et al.*, 2015). Una de sus grandes ventajas es que permite perfundir el medio de cultivo en un sistema cerrado, haciendo que el mismo medio de cultivo vaya recirculando por todo el sistema sin necesidad de renovarlo durante el experimento (Figura 5.1 B). Esto hace que el volumen de medio de cultivo necesario sea mucho menor que con otros sistemas, como la bomba de jeringuilla, y no hay que manipular el experimento hasta el punto final del mismo, lo que reduce riesgos de contaminaciones y de introducción de burbujas al no tener que renovar el medio de cultivo. El flujo que se genera es pulsátil, ya que el medio se impulsa mediante unos rodillos que hacen presión sobre los tubos, y esto genera unas ondas que hacen que el flujo no sea completamente lineal (Figura 5.1 D). Es un sistema de fácil manejo, y al poder utilizar un volumen reducido de medio de cultivo, hace que sea una buena opción para reducir costes, además de ofrecer la ventaja de poder recoger dicho medio de cultivo para posteriores análisis.

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

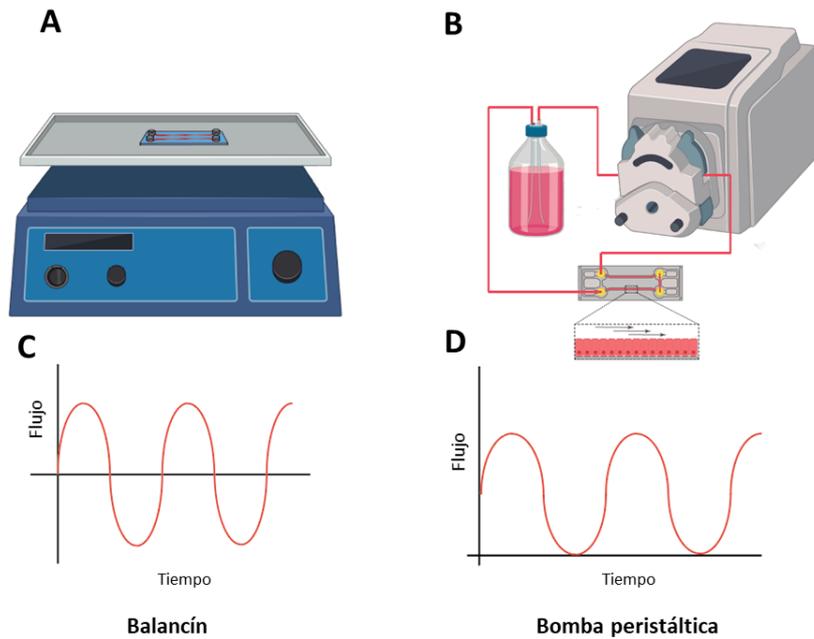


Figura 5.1. Tipo de flujo pulsátil generado por ondas de presión, aplicado con balancín y bomba peristáltica. El uso del balancín permite generar shear stress resultante del balanceo sobre un eje central, haciendo que el medio de cultivo circule en ambas direcciones en los canales de los dispositivos (A). La bomba peristáltica puede conectarse a un circuito cerrado de tubos conectados al dispositivo, lo que permite la recircularización del medio (B). En ambos casos el tipo de flujo aplicado es pulsátil (C, D).

Otras herramientas para aplicar flujo son las bombas de jeringuilla y los sistemas que utilizan la presión de una fuente de gas, en este caso aire a una presión conocida y controlada con un manómetro para impulsar el medio de cultivo. En estos casos el patrón del flujo resultante ya no es pulsátil, sino lineal (Figura 5.2 B, D). La bomba de jeringuilla es una herramienta fácil de utilizar y, aunque no sea un aparato económico, no requiere de equipamiento adicional específico (Figura 5.2 A). Es un sistema fácil de implementar en el laboratorio, pero tiene la gran desventaja de que funciona como un circuito abierto, en el que tiene que renovarse el medio para continuar el experimento si éste tiene una duración prolongada (Ross *et al.*, 2021). Además, si la bomba de jeringuilla no puede introducirse en el incubador y hay que dejarla fuera de él a temperatura ambiente, es probable que los gases del medio de cultivo de las jeringuillas no se equilibren con el incubador y puedan aparecer burbujas.

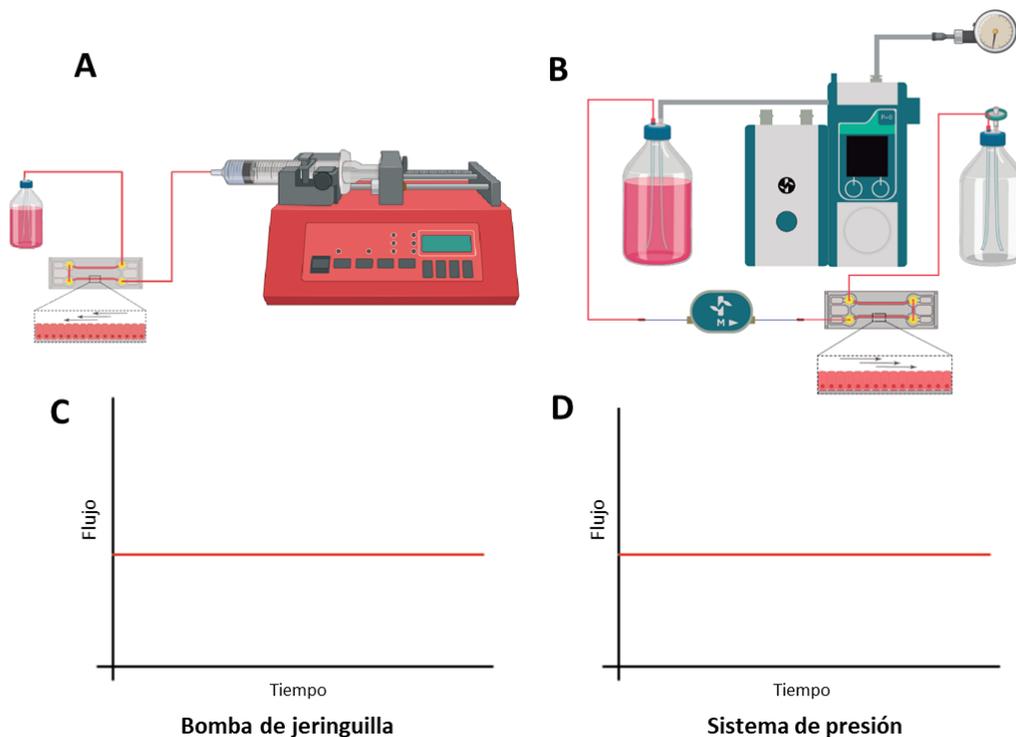


Figura 5.2. Tipo de flujo lineal generado por una presión constante. Este tipo de flujo se puede aplicar con bomba de jeringuilla (A) o con sistema de control de la presión (B). En los dos casos se utiliza una presión constante para generar un flujo lineal (C, D), sin ondas como en los casos anteriores.

Otra forma de aplicar flujo al cultivo celular es utilizar sistemas de control de presión que impulsen el medio de cultivo aplicando aire a una presión controlada y constante dentro del reservorio. Como resultado, se obtiene un caudal lineal en vez de pulsátil (Figura 5.2 B). Estos sistemas permiten regular la presión necesaria para que el medio circule a un flujo determinado, teniendo control tanto de la presión como del caudal utilizado con una mayor precisión. Tienen la ventaja de que su funcionamiento exige utilizar sensores que permiten monitorizar y obtener un registro del flujo y la presión de cabecera a lo largo del experimento. Como otras de las opciones antes mencionadas, también tiene sus limitaciones. Es un sistema que requiere de equipamiento específico y no es de fácil manejo. Los equipos más sencillos pueden utilizarse solamente como circuitos abiertos, aunque pueden utilizarse a modo de circuitos cerrados con mayor equipamiento, por lo tanto, mayor coste y un manejo más complicado que los sistemas abiertos. Además, estos sistemas pueden dar fallos, ya que la estabilidad de la presión del aire que llega al reservorio puede variar por causas ajenas al experimento y esto puede dar problemas a la hora de mantener un flujo estable.

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

En la Tabla 5.2. se hace un resumen de las ventajas e inconvenientes encontrados en los diferentes sistemas que se utilizan para aplicar flujo.

Tabla 5.2. Tipos de sistemas con sus ventajas e inconvenientes. Cada uno de los sistemas de aplicación de flujo en dispositivos fluidicos tienen sus ventajas e inconvenientes, dependiendo de diferentes factores como la manejabilidad, el volumen de medio utilizado, si son sistemas abiertos o cerrados y el rango de *shear stress* que permiten aplicar al cultivo celular.

Tipo de sistema	Ventajas	Desventajas
Balancín	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil manejo • Equipamiento económico • Poco volumen de medio de cultivo 	<ul style="list-style-type: none"> • Renovación de medio de cultivo frecuente • Rango pequeño de shear stress
Bomba peristáltica	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil manejo • Permite sistema cerrado • Experimentos a largo plazo • Volumen bajo de medio de cultivo 	<ul style="list-style-type: none"> • Necesidad de conectores • Requiere práctica en su uso • Aparición de burbujas en el sistema
Bomba de jeringuilla	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil manejo • Equipamiento económico • Flujo lineal 	<ul style="list-style-type: none"> • No permite recircularización de medio • Gran volumen de medio de cultivo • Renovación de medio constante • Aparición de burbujas por desequilibrio entre gases
Sistema a presión	<ul style="list-style-type: none"> • Control de la presión y el flujo a lo largo del experimento • Obtención de datos de presión y flujo • Flujo lineal y menor desviación 	<ul style="list-style-type: none"> • Equipamiento no económico • Dificultad para recircularizar medio de cultivo • Gran volumen de medio de cultivo • Aparición de burbujas

5.1.3. Tecnología *organ-on-chip* para el cultivo de células renales

El concepto de *organ-on-chip* se puede definir como una plataforma avanzada que mimetiza estructuras fisiológicas en condiciones donde se les aplica un flujo, recreando un microambiente similar al encontrado en el cuerpo humano. Este término puede crear confusión, ya que realmente con este tipo de nuevos modelos no se intenta recrear un órgano como tal si no la parte mínima del tejido que pueda exhibir características típicas del mismo, así como alguna de sus funciones. En el caso del riñón, se han desarrollado diferentes modelos haciendo uso de esta tecnología, recreando diferentes estructuras de la nefrona.

En los primeros modelos donde se combinaba el cultivo celular con la aplicación de un flujo que ejerciese *shear stress* sobre las células, se utilizaron células de origen animal, como el cultivo primario de células renales de ratón C57B1/6, las líneas celulares LLC-PK1 (cerdo) y MDCK (perro), o cultivo primario de riñón de rata (Tabla 5.3). El material utilizado para la mayoría de estos modelos fue el PDMS (Paoli and Samitier, 2016).

Tabla 5.3. Primeros modelos de *kidney-on-a-chip*.

Tipo celular	Tipo de dispositivo	Flujo	Referencia
C57B1/6 (ratón) LLC-PK1 (cerdo)	Canal central entre dos cubreobjetos de vidrio	Flujo laminar de 1 y 5 ml/min	(Essig <i>et al.</i> , 2001)
MDCK (perro)	Dispositivo de PDMS con microcanales y microcámaras	0, 10, 25, 50 μ l/min	(Baudoin <i>et al.</i> , 2007)
Cultivo primario de riñón de rata (IMCD: inner medullary collecting duct)	Dispositivo de PDMS con membrana porosa	Fluid shear stress 0.1 Pa	(Jang and Suh, 2010)
Primary Human Proximal Tubule Epithelial Cells (HPTECs)	Dispositivo de PDMS con membrana porosa	Fluid shear stress 0.02 Pa	(Jang <i>et al.</i> , 2013)

5. Desarrollo del modelo *kidney-on-a-chip*

Las células epiteliales del túbulo proximal renal están expuestas a *shear stress*, y la tecnología de microfluidos permite aplicar dicho estímulo mediante la perfusión de medio de cultivo celular a través de los canales que conforman el dispositivo microfluídico. Esta tecnología permite recrear el microambiente de las células renales y se ha visto que su uso puede aumentar la expresión de marcadores específicos de las células epiteliales tubulares proximales, como ZO-1, el cilio primario, la polarización celular y la reorganización del citoesqueleto (Essig and Friedlander, 2003; Vriend *et al.*, 2020). Sin embargo, también hay estudios en los que se ha observado que al aplicar *shear stress*, como por ejemplo en la línea celular HK-2, la ZO-1 aparecía de forma discontinua en la membrana plasmática y el cilio primario desaparecía frente al control donde no se había aplicado flujo (Maggiarani *et al.*, 2015).

Los modelos renales basados en esta tecnología han ido evolucionando a lo largo de los años y también se han desarrollado modelos más complejos, con co-cultivo de células renales con células endoteliales para el estudio de la función de reabsorción en el túbulo proximal (Vedula *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2019). También se ha combinado la microfluídica con el cultivo de organoides de riñón dentro de un dispositivo milifluídico, aplicando flujo sobre su superficie para ver cómo respondían dichos organoides al *shear stress* producido por el medio de cultivo. Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la vascularización y una mayor diferenciación tanto de las células provenientes de la parte tubular como de la parte glomerular de la nefrona (Homan *et al.*, 2019).

Si bien es cierto que los modelos más complejos se acercan más a lo que ocurre en el tejido renal *in vivo*, tienen también sus limitaciones. Son modelos difíciles de implementar en el laboratorio, se requiere de gran experiencia en su manejo y económicamente son costosos, razones por las cuales no se usa este tipo de metodología de forma sistemática a gran escala en ensayos de citotoxicidad a fármacos.

En este capítulo se describen los modelos de *kidney-on-a-chip* basados en el uso de tecnología microfluídica desarrollados en esta Tesis. El modelo consta de un dispositivo microfluídico y se utiliza para cultivar una línea celular continua de origen renal de humano, la línea RPTEC/TERT1, para exponerla a un *shear stress* fisiológico y así reproducir lo que ocurre en el riñón humano. Para el desarrollo de este modelo se utilizaron dos aproximaciones diferentes, utilizando una bomba peristáltica (flujo pulsátil) y un sistema de control de presión (flujo lineal) con el fin de elegir la que mejor resultados diera en términos de reproducibilidad de los experimentos a flujo, así como la facilidad en el manejo de los equipos, para poder

5. Desarrollo del modelo *kidney-on-a-chip*

implementar un protocolo en el laboratorio. La utilidad del modelo se valida posteriormente usándolo para ensayos de toxicidad frente a diferentes fármacos (siguiente capítulo).

5.1.4. Hipótesis

El *shear stress* es un estímulo fisiológico que se produce en la zona apical de las células que forman el túbulo proximal. La aplicación de este estímulo mimetiza el microambiente físico-químico del tejido nativo, lo que representa de forma más fisiológica lo que ocurre en el riñón, mejorando el fenotipo de la línea RPTEC/TERT1 en comparación con el cultivo celular tradicional.

5.1.5. Objetivos específicos

- Desarrollo de un modelo de *kidney-on-a-chip* con tecnología microfluídica para mejorar el fenotipo de la línea RPTEC/TERT1 y compararlo con el cultivo celular tradicional.
- Aplicación de *shear stress* fisiológico con diferentes sistemas fluidicos y analizar las ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos.
- Caracterización del modelo *kidney-on-a-chip* mediante el estudio de la presencia de marcadores específicos y cambios en la expresión génica para compararlo con el modelo de cultivo celular tradicional.

5.2. Resultados

5.2.1. Aplicación de *shear stress* fisiológico en dispositivos microfluídicos

5.2.1.1. Dispositivo COP-3

Antes de utilizar el dispositivo COP-3 con células sembradas en sus canales, se quiso observar el tipo de patrón de flujo al utilizar una bomba peristáltica, haciendo uso de un sensor de flujo con un dispositivo COP-3 conectado al sistema. Se observó que al utilizar dicha bomba a un flujo teórico de $13.33 \mu\text{l}/\text{min}$, que es el que posteriormente se iba a utilizar una vez sembradas las RPTEC/TERT1 en el dispositivo COP-3, se producían unos pulsos muy pronunciados (Figura 5.3). Además de los pulsos, y tal como se observa en la Figura 5.3, también hay flujo retrógrado dados los valores negativos de la gráfica. Este efecto se produce por la presión que hacen los rodillos de la bomba peristáltica sobre el tubo Tygon con el que están en contacto.

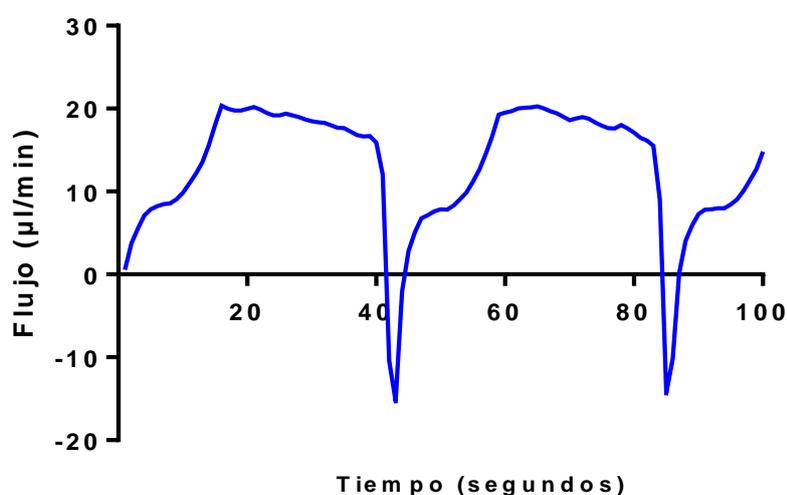


Figura 5.3. Pulsos de la bomba peristáltica. La bomba peristáltica se conectó con un sensor para analizar el patrón de flujo que se aplica con este tipo de sistema. Se hizo a una velocidad de 4 rpm con un flujo teórico medio de $13.33 \mu\text{l}/\text{min}$ y se registraron los datos con el software del sensor para el análisis posterior. Se observa que el flujo es pulsátil, debido a que la forma en la que se propulsa el medio de cultivo es mediante la presión que ejercen los rodillos del cabezal de la bomba peristáltica sobre el tubo Tygon.

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

Para poner a punto el protocolo de siembra en dispositivos microfluídicos se utilizó la misma línea celular descrita anteriormente para el modelo de tubulogénesis, RPTEC/TERT1. Con el fin de favorecer la adhesión celular, los dispositivos fueron tratados previamente a la siembra con plasma de oxígeno, puesto que la lámina de COP utilizada como base del chip era hidrofóbica, y se observó que con el tratamiento de plasma las células se repartían más homogéneamente en el canal, además de facilitar el paso de la suspensión celular por el canal, ya que el plasma hace que la superficie sea hidrofílica.

Se probaron diferentes concentraciones celulares y finalmente se observó que la concentración óptima era de 12.5×10^6 células/ml, que corresponde a 423.500 células/cm² por canal del dispositivo. A menores concentraciones las células no llegaban a confluencia ya que éstas requieren de contacto entre ellas para su proliferación. El volumen final de cada canal junto con los reservorios era muy pequeño, de 70 μ l en total, siendo el volumen efectivo del canal de 10 μ l, por lo que requería de un cambio de medio de cultivo cada 24h, ya que las RPTEC/TERT1 consumían los nutrientes al no haber un recambio de medio constante en el canal.

Tras haber alcanzado alrededor del 100% de confluencia en los canales, el COP-3 se conectó al sistema fluídico y se aplicó un caudal de medio de cultivo de 13.33 μ l/min, correspondiente a un *shear stress* de 0.2 dyn/cm² durante 72h (Figura 5.4).

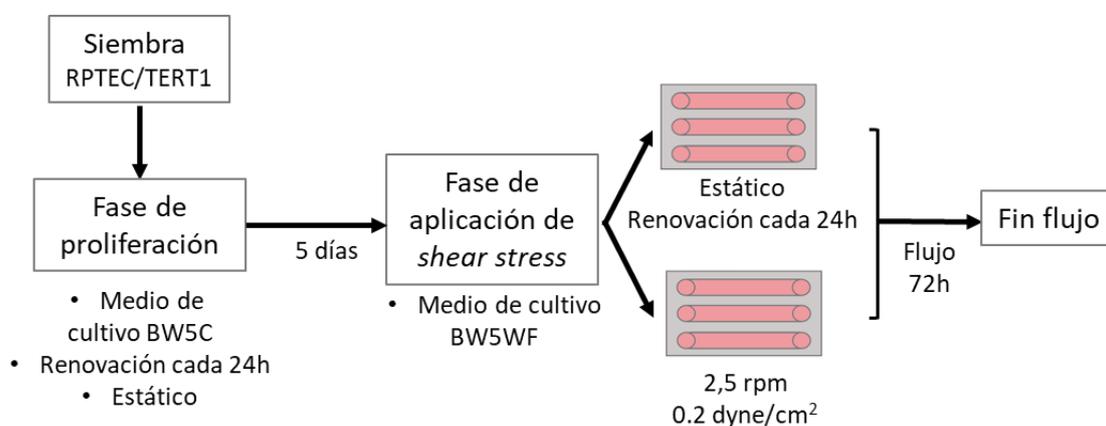


Figura 5.4. Sistema a flujo con dispositivo COP-3. Esquema donde se detallan los diferentes pasos de los ensayos con los dispositivos COP-3 conectados al sistema fluídico. Tras la siembra y proliferación celular, se conectó uno de los dispositivos a flujo con la bomba peristáltica, aplicando un *shear stress* fisiológico de 0.2 dyn/cm² durante 72h.

Los pulsos que se habían observado previamente mediante las medidas del sensor de flujo no afectaron al cultivo celular en los dispositivos, ya que se vio que tras tres días a flujo las

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

RPTEC/TERT1 mantenían la monocapa en los canales (Figura 5.5). Al comparar los dos modelos utilizados, es decir, el dispositivo en estático con renovación de medio cada 24h, y el dispositivo a flujo, se observó que tras este periodo de 72h, las células proliferaban más cuando estaban sometidas al flujo que cuando estaban en estático. Esto puede deberse a que la renovación de nutrientes y de factores de crecimiento necesarios para la proliferación de las células estaban en constante circulación, y su disponibilidad era mayor que en el dispositivo en estático, donde el medio disponible del canal solo son 10 μl .

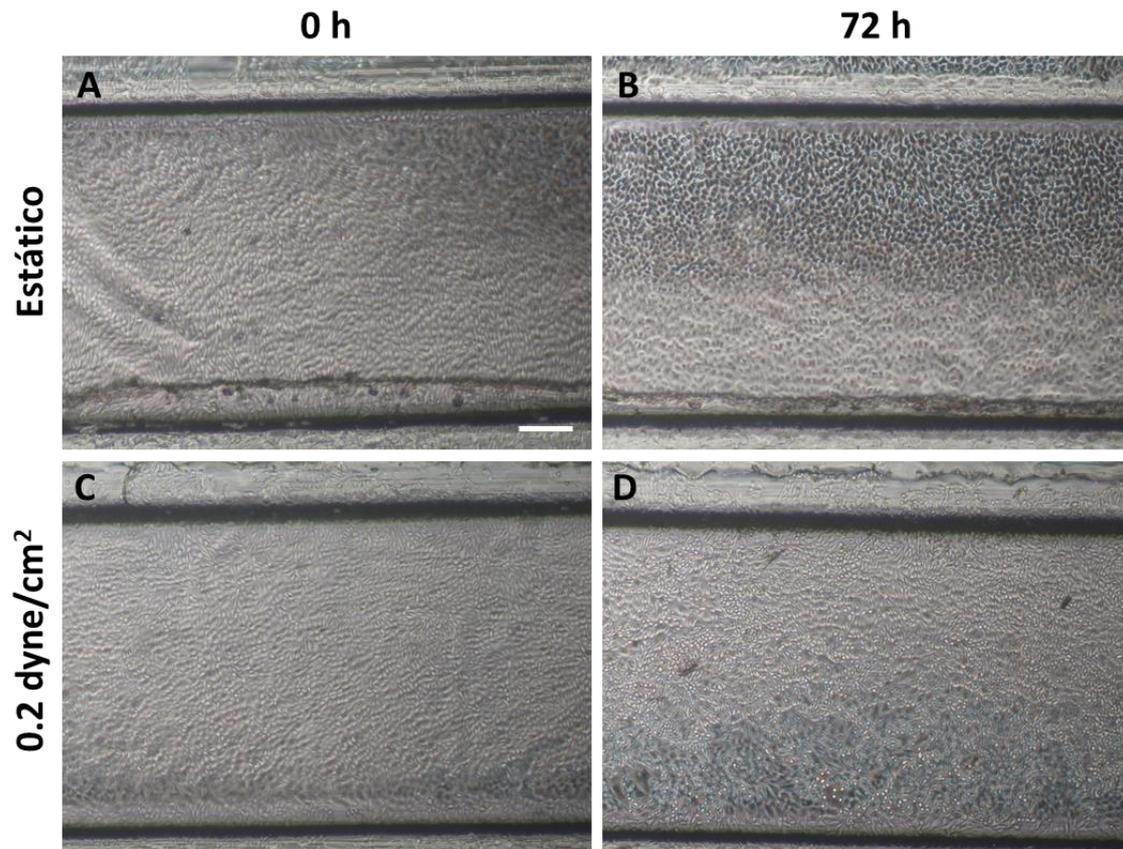


Figura 5.5. RPTEC/TERT1 expuestas a un shear stress fisiológico en dispositivo COP-3. Las células se sembraron en los canales del COP-3 y una vez confluentes, se dejaron en estático (A) con renovación de medio cada 24h o se les aplicó un shear stress de 0.2 dyn/cm² (C). Después de 72h se observó que la monocapa celular se mantenía en ambos modelos (B, D). Barra de escala 100 μm .

Con el fin de que no hubiese diferencia en la disponibilidad del medio de cultivo, y, por tanto, una proliferación igual tanto en el modelo en estático como en el modelo a flujo, se probó a conectar el dispositivo COP-3 estático a la bomba peristáltica de la misma manera que el dispositivo COP-3 sometido a *shear stress*. En el caso del dispositivo COP-3 en estático, se programó la bomba peristáltica para que hubiese circulación de medio de cultivo a 2.5 rpm durante 30 minutos cada 12h. Este experimento se mantuvo durante 5 días en ambas

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

condiciones y, transcurrido este tiempo, se hizo una tinción de núcleos con DAPI para poder cuantificar las células y así observar posibles diferencias en la proliferación celular. También se marcaron con faloidina, para observar el citoesqueleto de actina de las células, confirmando así que las RPTEC/TERT1 formaban una monocapa totalmente confluyente en los canales del dispositivo. Para ello se tomaron tres imágenes con el microscopio de fluorescencia en cada canal, en zonas aleatorias, y se contabilizó el número de núcleos por campo (Figura 5.6).

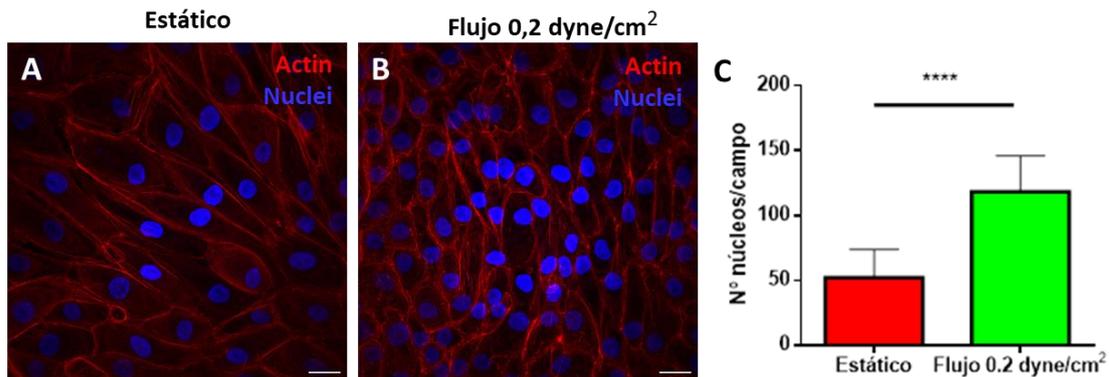


Figura 5.6. Cuantificación de núcleos de RPTEC/TERT1 en dispositivo COP-3. Diferencias en el número de células en la condición estático (A) y a flujo (B) en dispositivos COP-3. Se tomaron nueve imágenes por condición y se cuantificó el número de núcleos en cada imagen (C). La barra de error muestra la desviación estándar entre las diferentes imágenes. $n=9$. t-test con corrección de Welch, **** $p<0.001$.

Se observó una diferencia significativa en el número de células entre ambas condiciones (Figura 5.6C), ya que se contabilizaron un mayor número de núcleos en el modelo que había estado a un flujo constante de $13.33 \mu\text{l}/\text{min}$ que en la condición en la que se había renovado el medio durante 30 minutos cada 12h con ese mismo flujo. Con este sistema de circulación de medio cada 12h en el modelo en estático no se consiguió corregir la diferencia en el crecimiento celular entre ambos modelos.

Si bien es cierto que se consiguió aplicar flujo en estos dispositivos, éstos presentaron ciertos problemas en su uso. Uno de los principales problemas es que las piezas que conforman el chip tenían que ser ensambladas de forma manual, utilizando un adhesivo biocompatible para poder unir la lámina del suelo de COP con el bloque inyectado del mismo material. Esto daba lugar a que los canales podían no estar debidamente alineados y las células estaban en contacto directo con el adhesivo en los bordes de los canales. No hubo problemas de citotoxicidad con el adhesivo, ya que las células proliferaban igualmente, pero la geometría del canal podía verse comprometida por este hecho. Además, a la hora de sembrar las células

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

aparecían burbujas en los laterales del canal, impidiendo la proliferación celular allí donde se generaban dichas burbujas. Éstas desaparecían con los cambios de medio, proliferando así las células por toda la superficie del canal.

El diseño del dispositivo hacía complejo su manejo a la hora de aplicar flujo, ya que no disponía de conectores específicos para conectar con el tubo Tygon, el cual había que introducir por presión en los reservorios de cada canal. La manipulación en exceso del chip para poder conectar todos los canales en serie aumentaba el riesgo de contaminación o que se levantaran las células al hacer presión con los tubos. Si bien es posible aplicar flujo en este dispositivo, su diseño hace que sea el menos manejable y útil a la hora de hacer ensayos posteriores con el mismo.

5.2.1.2. Dispositivo de COP-2

En el caso del dispositivo de BeOnChip, se realizaron modificaciones en el protocolo de siembra y en la fase de proliferación celular en comparación con el protocolo seguido con el dispositivo COP-3. En este dispositivo, además de estar ya tratado con plasma de oxígeno, se le aplicó un recubrimiento de superficie con colágeno I para favorecer la adhesión celular. Una vez adheridas las células a la superficie de los canales, se mantuvieron en cultivo en un balancín hasta llegar a formar una monocapa. El balancín se utilizó para que hubiese un recambio constante del medio de cultivo desde los reservorios, donde se añadía 200 μl por reservorio, hasta el interior del canal, ya que el volumen disponible del canal donde se encuentra el cultivo celular es de solo 30 μl . Por esta razón, si se dejaban en estático, como se había hecho previamente con el dispositivo COP-3, los nutrientes disponibles del medio de cultivo localizado en el canal se consumían rápidamente y las células no proliferaban de igual manera que cuando se ponían los dispositivos en dicho balancín. La longitud del canal era mucho mayor en este dispositivo que en el COP-3, por lo que era fundamental mantener el medio de cultivo en constante movimiento, ya que había un mayor número de células. Además, el material con el que están fabricados, el COP, es impermeable a gases, por lo que el balanceo también favorecía el intercambio de oxígeno.

Para aplicar un *shear stress* fisiológico con este tipo de dispositivo se emplearon dos sistemas diferentes, la bomba peristáltica y un sistema de control de la presión para impulsar el medio de cultivo. Se probaron ambos sistemas para comprobar si el patrón de flujo podía influir en el comportamiento de las células sometidas a flujo bajo sin aplicar un *shear stress* fisiológico o a un flujo más alto, éste último con un *shear stress* fisiológico de 0.24 dyn/cm^2 (Figura 5.7).

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

Flujo lineal con sistema de control de presión

El sistema de control de presión de Fluigent utilizado en estos experimentos permitía el control tanto del caudal aplicado como de la presión utilizada para alcanzar dicho caudal, gracias a un sensor situado antes de la entrada del dispositivo microfluídico. Se aplicaron dos regímenes de flujo diferente, uno de ellos con un caudal de $20\mu\text{l}/\text{min}$, que sometía a las células a un *shear stress* de $0.07\text{ dyn}/\text{cm}^2$, debajo del rango fisiológico en el túbulo proximal ($0.2\text{-}2\text{ dyn}/\text{cm}^2$), y el segundo caudal utilizado, $70\mu\text{l}/\text{min}$, sí generaba un *shear stress* fisiológico de $0.24\text{ dyn}/\text{cm}^2$.

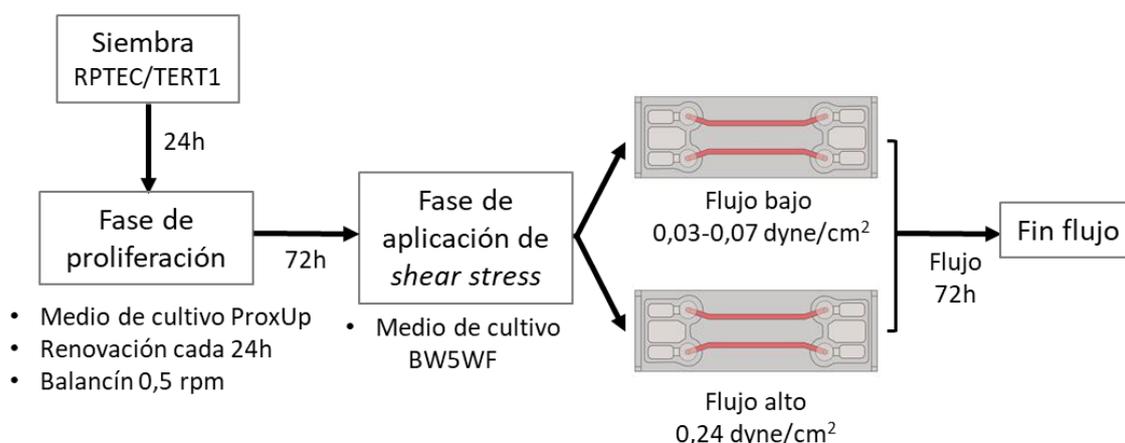


Figura 5.7. RPTEC/TERT1 expuestas a un flujo fisiológico en dispositivo COP-2. Tras la fase de proliferación en balancín durante 72h, se conectaron los dispositivos a flujo tanto con bomba peristáltica (flujo pulsátil) como con el sistema de control de presión (flujo lineal) durante 72h con dos rangos de flujo diferentes, aplicando un *shear stress* fisiológico de $0.24\text{ dyn}/\text{cm}^2$ en el flujo alto.

Se consiguió mantener a flujo los dispositivos con este sistema durante 72h tanto con un caudal bajo, $20\mu\text{l}/\text{min}$, como a caudal alto, $70\mu\text{l}/\text{min}$. El sistema a presión era un circuito abierto, es decir, había una botella con medio de cultivo que entraba al dispositivo y otra botella donde se acumulaba dicho medio tras pasar por el dispositivo. Por este motivo, había que utilizar un volumen muy alto de medio de cultivo, 100 ml, con el objetivo de manipular lo menos posible el sistema y así hacer un intercambio de medio de cultivo cada 24h, reutilizando el medio de cultivo dos veces durante las 72h que se mantuvieron a flujo los sistemas. El patrón teórico de flujo con este tipo de sistema es lineal, en comparación con la bomba peristáltica, que es un patrón pulsátil, pero debido a cambios de presión en el sistema, dicho patrón no era totalmente lineal, si no que había ciertas fluctuaciones tanto en el caudal como en la presión (Figura 5.8). El principal problema que surgió con este sistema fue la aparición de burbujas. Por un lado, estos ensayos se tuvieron que llevar a cabo en una estufa a 37°C , sin humedad ni CO_2 y esto generaba que los gases disueltos en el medio de cultivo y

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

el aire presente dentro de la estufa no se equilibraran, por lo que se generaban burbujas en el medio de cultivo. Dichas burbujas podían llegar a introducirse en el tubo PTFE y llegar al sensor, dando picos de flujo y desestabilizando el sistema. Otro problema fue que debido a las conexiones microfluídicas entre los diferentes segmentos de los tubos utilizados, aparecían burbujas que, al introducirse en el sensor, éste registraba cambios en la presión y como consecuencia cambios en el caudal, por lo que el flujo variaba, aunque se mantenía en un rango estable como se puede observar en las gráficas correspondientes a los dos regímenes de flujo que se aplicó con este sistema (Figura 5.8 A, C). Con este sistema no se observó flujo en sentido retrógrado como sí se vio con la bomba peristáltica al aplicar un flujo pulsátil (Figura 5.3).

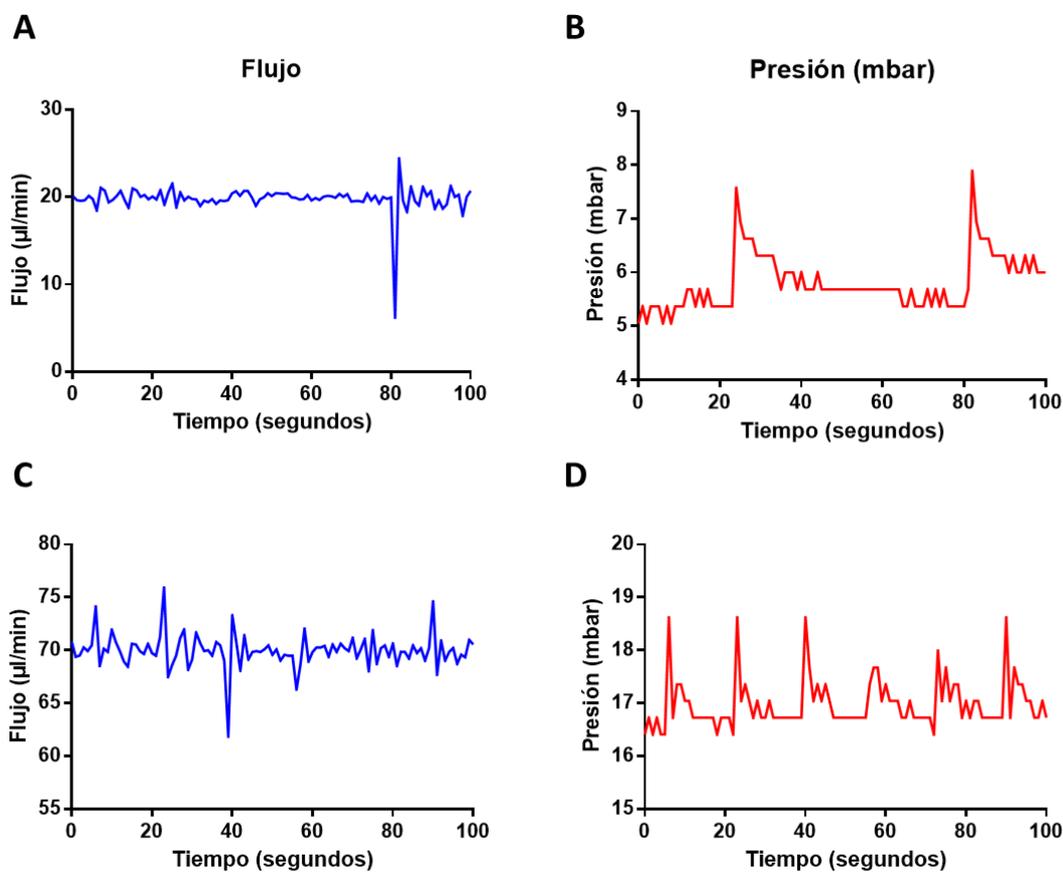


Figura 5.8. Patrón de flujos y presión aplicada con sistema de control de presión. Tanto el flujo (A, C) como la presión (B, D) aplicada queda registrada gracias al sensor que lleva incorporado este sistema. Se vieron oscilaciones tanto en el flujo como en la presión, haciendo que el flujo no fuese totalmente lineal.

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

Bomba peristáltica

De forma paralela a los experimentos con el sistema de control de la presión, se hizo lo mismo, pero utilizando la bomba peristáltica. En este caso el sistema era similar al descrito previamente con el dispositivo COP-3, pero en este caso las conexiones del dispositivo con el tubo Tygon de la bomba peristáltica se hicieron con tubo PTFE, ya que las conexiones del dispositivo están diseñadas para el uso de este tipo de tubo. Tras llegar a confluencia, se conectaron al sistema microfluídico y se les aplicó dos tipos de caudal, en este caso $9 \mu\text{l}/\text{min}$ con un *shear stress* por debajo del rango fisiológico de $0.03 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ y $70 \mu\text{l}/\text{min}$, éste último correspondiente a un *shear stress* fisiológico de $0.24 \text{ dyn}/\text{cm}^2$, al igual que con el sistema de control de presión.

El uso de la bomba peristáltica hizo que fuese posible la circularización constante del medio de cultivo ya que permite hacer un circuito cerrado, con la ventaja de poder utilizar un volumen mucho menor que con el sistema de control de presión. En el caso de los experimentos con la bomba peristáltica, se utilizaron 3 ml de medio de cultivo en el reservoriourante 72h, y al ser un circuito cerrado, no había que manipular el sistema hasta finalizar el flujo transcurridas esas 72h. Una vez finalizado el flujo, se corroboró que la monocapa se había mantenido intacta en los canales de los dispositivos tanto a flujo bajo como a flujo alto (Figura 5.9).

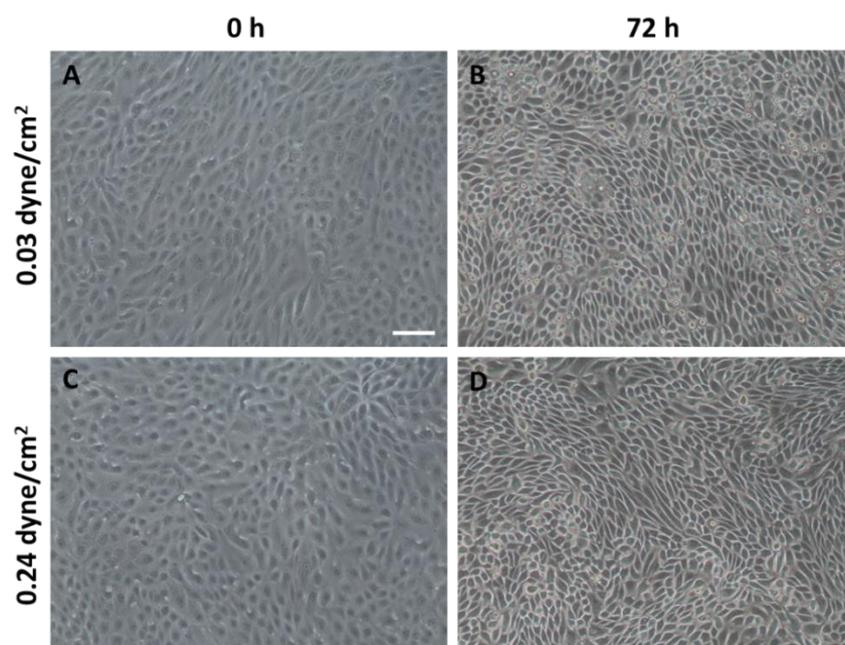


Figura 5.9. RPTEC/TERT1 antes y después de aplicar shear stress. Antes de conectar los dispositivos COP-2 a flujo se confirmó que habían formado una monocapa a lo largo de los canales del dispositivo (A, C). Tras 72h a flujo, la monocapa seguía intacta en ambos modelos (B, C). Barra de escala $50 \mu\text{m}$.

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

Además, la aparición de burbujas, que es un problema recurrente en los sistemas de microfluídica, no se producía de forma tan recurrente como con el sistema a presión. Esto se debió a que el sistema de cebado del circuito durante una hora a 37°C hizo que se equilibraran los gases del medio de cultivo con el incubador, que en este caso sí tenía un 5% CO₂ aunque sin humedad. El hecho de que tanto el material de los tubos como del dispositivo fueran impermeables a los gases hizo que se redujese el riesgo de generación de burbujas en los diferentes segmentos del circuito.

5.2.1.3. Dispositivo PS-6

Por último, se puso a punto otro sistema a flujo, pero esta vez con el dispositivo μ Slide VI_0.4 (IBIDI) de seis canales, los cuales se conectaron también en serie para aplicar el mismo *shear stress* en todos ellos. En este caso, se pusieron a punto dos protocolos diferentes que se detallan a continuación.

Protocolo 1

En el denominado Protocolo 1 se aplicaron tres regímenes de flujo, el primero, de mantenimiento, se aplicó en la fase proliferativa de las células, para que llegasen a confluencia con un recambio continuo de medio sin aplicar *un shear stress* fisiológico. Tras esta fase de proliferación celular, se aplicaron en paralelo dos caudales diferentes en dos dispositivos de forma paralela, uno sin aplicar *shear stress* fisiológico (0.03 dyn/cm²) y otro aplicando un *shear stress* fisiológico como en los dispositivos anteriores, de 0.2 dyn/cm² (Figura 5.10). En este modelo se utilizó tubo de silicona para las conexiones entre los canales del dispositivo.

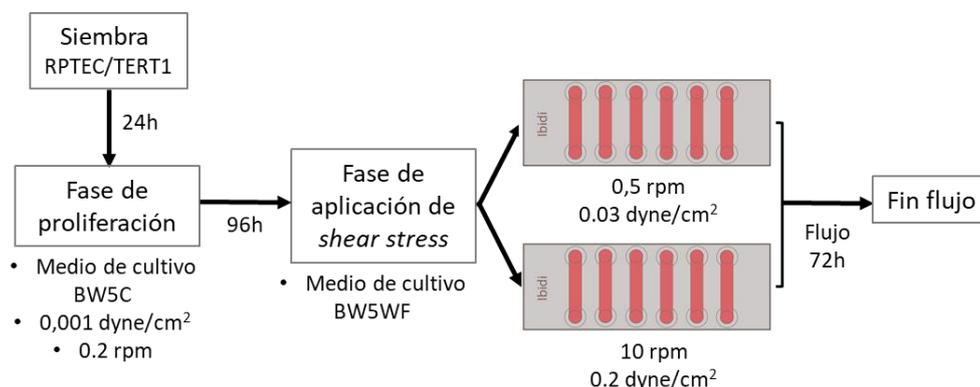


Figura 5.10. RPTEC/TERT1 en dispositivos PS-6 a flujo con Protocolo 1. Una vez sembradas las células y adheridas a los canales del dispositivo, se conectaron los canales del dispositivo en serie con tubo de silicona y se mantuvo a un flujo bajo hasta que las células llegaran a confluencia pasadas 96h. En este punto, se cambió a medio de cultivo sin suplementos (BW5WF) y se mantuvo el flujo durante 72h.

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

Protocolo 2

En el Protocolo 2, las RPTEC/TERT1 se sembraron a una concentración menor que en Protocolo 1 y el cultivo celular se mantuvo en un balancín hasta llegar a la confluencia. En este caso, los tubos que conectaban en serie el dispositivo eran de Tygon, un material menos poroso que la silicona previamente mencionada. Cuando las células habían llegado a la confluencia, se conectaron a los dos regímenes de flujo iguales al caso anterior, donde se aplicaba un *shear stress* de 0.03 dyn/cm^2 y 0.2 dyn/cm^2 respectivamente (Figura 5.11).

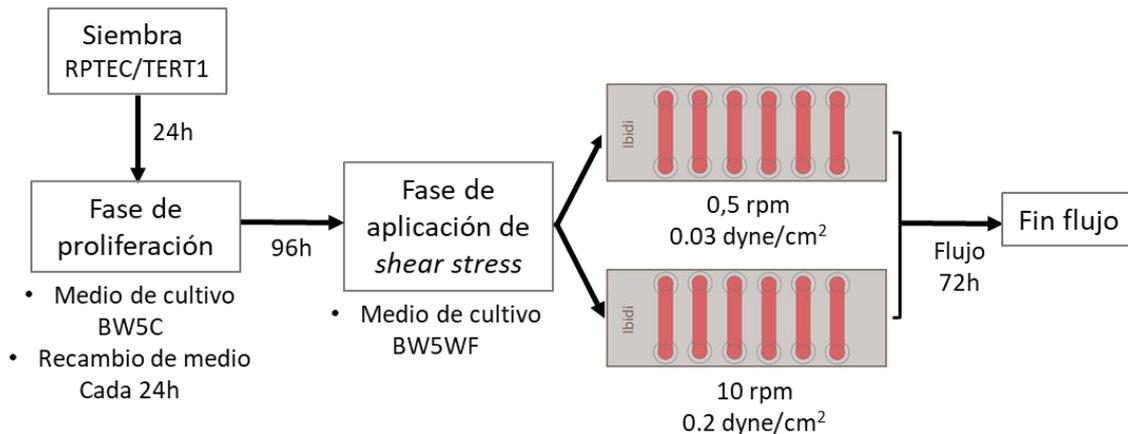


Figura 5.11. RPTEC/TERT1 en dispositivos PS-6 a flujo con Protocolo 2. Después de sembrar las células en el dispositivo, se mantuvieron en un balancín durante 96h con un recambio de medio cada 24h, hasta llegar a conformar una monocapa de células confluyente en los canales. Posteriormente, se aplicó flujo durante 72h.

Este sistema se implementó, como en los casos anteriores, con la bomba peristáltica, generando un flujo constante con un sistema cerrado, permitiendo así el uso de un bajo volumen de medio de cultivo. En este caso se probaron dos protocolos diferentes, cuyas diferencias se basaban en la fase de proliferación y en el tipo de tubo utilizado para las conexiones entre los canales. En el Protocolo 1 las conexiones entre los diferentes canales del dispositivo se hicieron mediante tubo de silicona. Al haber un mayor número de conexiones en el dispositivo PS-6, ya que éste consta de seis canales, y también debido al tubo de silicona, que tiene una alta porosidad, se generaban burbujas dentro del sistema, lo que puede hacer que se levanten las células que están en monocapa en el suelo del dispositivo. Para solucionar en parte este problema, se insertó un atrapaburbujas en la entrada microfluidica del dispositivo, en el primer canal del dispositivo que estaba conectado en el circuito de tubos, para que las burbujas generadas en los tubos antes de llegar al dispositivo saliesen al exterior y no se introdujeran en los canales.

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

Tras la exposición de las células a los dos regímenes de flujo durante 72h, se observó que la monocapa celular permanecía en los canales en ambas condiciones. El atrapaburbujas mejoró el problema de las burbujas que llegaban al dispositivo, pero no las que se generaban en los tubos de silicona que interconectaban los canales. Por esta razón, estos tubos se cubrieron con gasas humedecidas con agua para tratar de disminuir la formación de burbujas, y se comprobó que la generación de éstas disminuía cuando se realizaba este procedimiento.

Para intentar resolver el problema de las burbujas que se generaban en los tubos de las conexiones entre canales, se probó a utilizar tubo Tygon en vez de tubo de silicona. El primero, al ser impermeable a gases, podría reducir la aparición de burbujas y así evitar el problema de que el monocapa celular de los canales se despegara de la superficie. Se observó que al utilizar este tipo de tubo no había aparición de burbujas en las conexiones entre los canales, por lo que se resolvió ese problema que puede afectar a la integridad de la monocapa celular en los canales del dispositivo.

5.2.2. Caracterización de la línea celular RPTEC/TERT1 en dispositivos microfluídicos por inmunofluorescencia

5.2.2.1. Dispositivo COP-3

Con el fin de observar cambios morfológicos en las células sometidas a *shear stress*, se llevó a cabo el marcaje de diferentes estructuras celulares con inmunofluorescencia tras aplicar flujo durante 72h. Al igual que con el modelo de tubulogénesis propuesto, se analizaron dos marcadores presentes en las células del túbulo proximal, la ZO-1, localizada en la membrana celular, y la tubulina acetilada, que se localiza mayoritariamente en el cilio primario, pero también puede observarse en el citoesqueleto.

En el dispositivo COP-3 se compararon dos modelos. Por un lado, un dispositivo que se mantuvo en estático durante 72h y por otro, un dispositivo en el que se sometieron a las células a un *shear stress* fisiológico durante el mismo tiempo. Las RPTEC/TERT1 en estático mostraron una morfología poliédrica regular en toda la monocapa. Se observó que la ZO-1 mostraba un borde serrado en todo el contorno celular, y se confirmó también así la unión entre las células que conformaban la monocapa en el dispositivo. Se observó también la presencia del cilio primario en las células que se mantuvieron en estático (Figura 5.12).

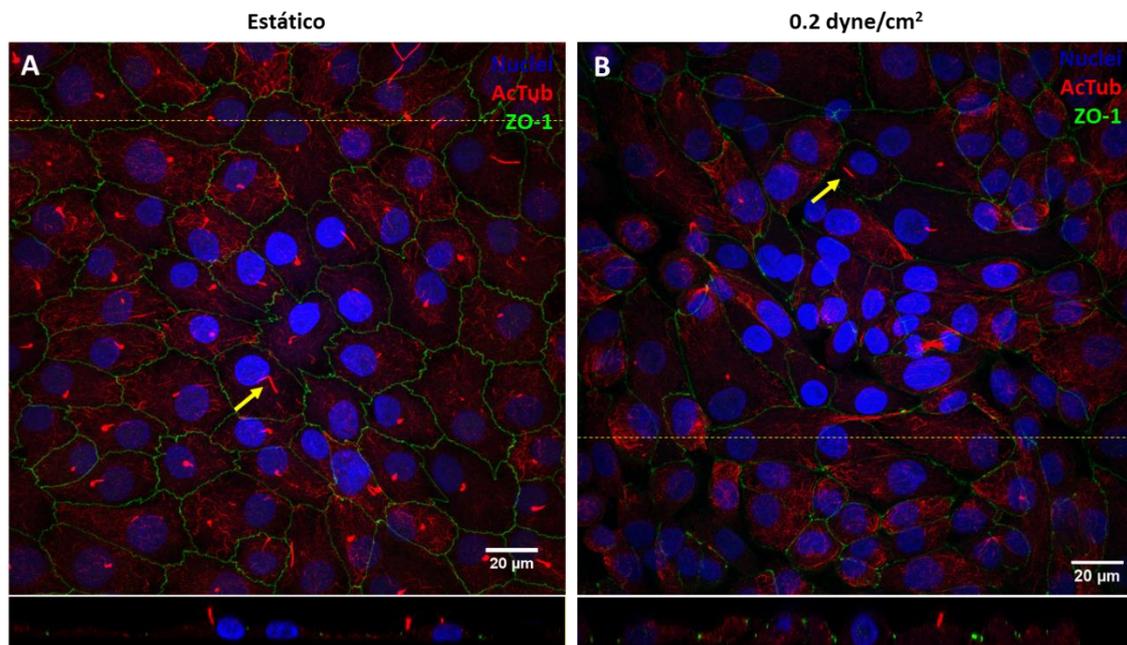


Figura 5.12. Inmunofluorescencia de RPTEC/TERT1 en dispositivo COP-3. Después de 72h en estático y flujo, se analizó la presencia de ZO-1 (verde) y tubulina acetilada (rojo) en las RPTEC/TERT1 en dispositivo COP-3. Tanto en el modelo estático (A) como en el modelo a flujo (B) se confirmó la presencia tanto de la ZO-1 como de la tubulina acetilada, que se acumula de forma predominante en el cilio primario. Las flechas amarillas indican la presencia del cilio primario en ambos modelos. La línea amarilla indica la altura a la que está hecho el corte en Z. Barra de escala 20 µm.

En la condición en la que se aplicó flujo durante 72h se observaron diferencias morfológicas respecto al dispositivo que se mantuvo en estático. En este caso, la morfología de las células era más alargada, siendo además más irregular que en el dispositivo en estático. Se observó que la ZO-1 no mostraba un borde serrado tan marcado como en la condición en estático, teniendo así una apariencia más tensa respecto a dicha condición. Al igual que en estático, se vio que las células mantenían la expresión del cilio primario. Finalmente, se observó que las células a las que se les había aplicado flujo eran más altas que aquellas que habían estado en estático.

5.2.2.2. Dispositivo COP-2

En el caso del dispositivo COP-2, se marcaron las mismas estructuras por inmunofluorescencia que en el dispositivo COP-3, tanto la tubulina acetilada como la ZO-1 (Figura 5.13). Se observó de igual forma el cilio primario, marcado por la tubulina acetilada, y la polarización celular debido a la presencia de la ZO-1, en ambos modelos. No se

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

observaron diferencias en la disposición de la ZO-1, ya que en ambos modelos aparecía con un borde serrado, sin zonas de tensión. Se observó a su vez que la altura de las células era similar también en los dos modelos, sin evidencias notables como las que sí se observaron en el dispositivo COP-3.

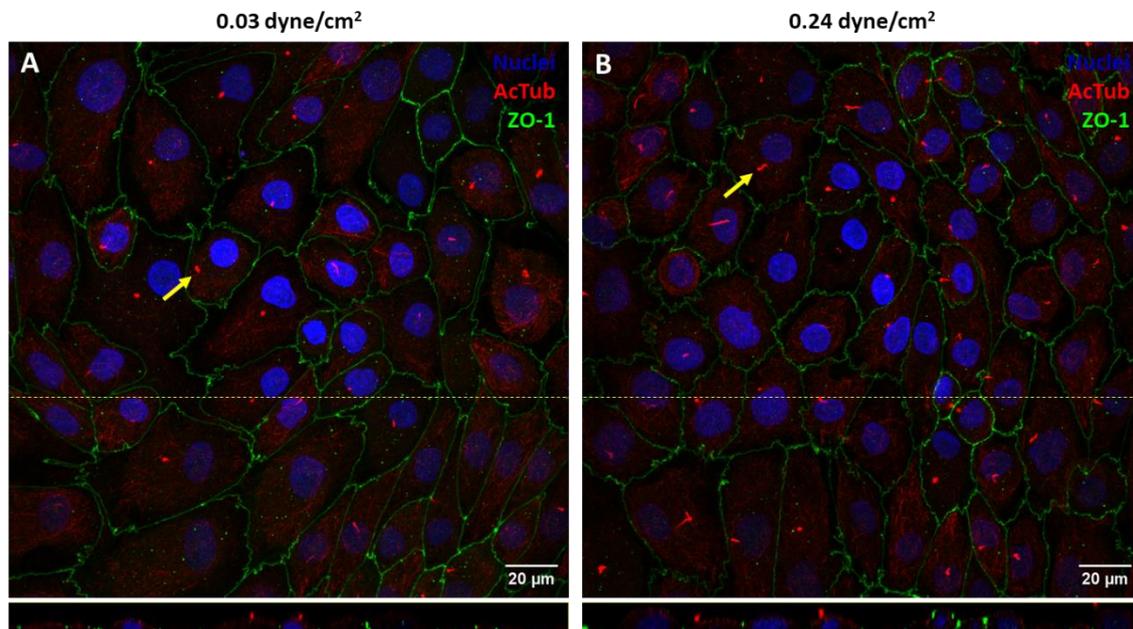


Figura 5.13. Inmunofluorescencia de RPTEC/TERT1 en dispositivo COP-2. Después de 72h a flujo bajo (0.03 dyn/cm^2) y a flujo alto (0.24 dyn/cm^2), se analizó la presencia de ZO-1 (verde) y tubulina acetilada (rojo) en las RPTEC/TERT1 en dispositivo COP-2. Tanto en el modelo de flujo bajo (A) como en el modelo a flujo alto (B) se confirmó la presencia tanto de la ZO-1 como de la tubulina acetilada. Las flechas amarillas indican la presencia del cilio primario, marcado con tubulina acetilada, en ambos modelos. La línea amarilla indica la altura a la que está hecho el corte en Z. Barra de escala $20 \mu\text{m}$.

Además de estos dos marcadores, se quiso analizar la disposición del citoesqueleto en las RPTEC/TERT1 tras haber estado sometidas a flujo (Figura 5.14). Los filamentos de actina se marcaron con faloidina, que es un polipéptido tóxico presente en las setas y que se une a la actina de los microfilamentos del citoesqueleto. Se observaron fibras de estrés de actina en ambos modelos, tanto a flujo bajo como a flujo alto (Figura 5.14 B, E). Con el fin de observar una posible desdiferenciación celular debido al tipo de cultivo celular sometido a un factor estresante como puede ser el *shear stress*, se marcaron las células con vimentina, una proteína de filamentos intermedios que forma parte del citoesqueleto de células embrionarias, endoteliales y algunas células sanguíneas. Las RPTEC/TERT1, al ser una línea de células epiteliales no debería tener presencia de vimentina, pero se observó que en ambas

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

condiciones a flujo este marcaje dio positivo, observándose la vimentina en el citoesqueleto de las células (Figura 5.14 C, F).

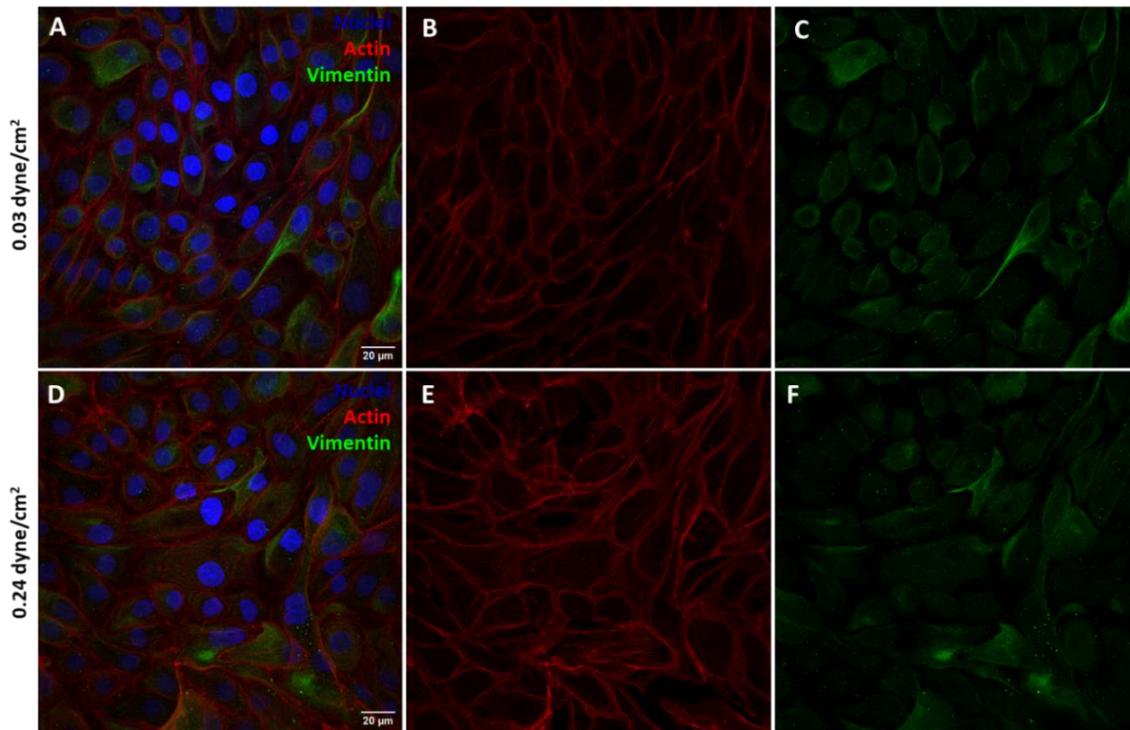


Figura 5.14. RPTEC/TERT1 en dispositivo COP-2 para la visualización del citoesqueleto. En los dos modelos se confirmó la presencia de fibras de estrés de actina (B, E), marcada en rojo. Igualmente se vio que las células tenían vimentina formando parte también del citoesqueleto (C, F). Barra de escala 20 µm.

5.2.2.3. Dispositivo PS-6

En el dispositivo PS-6 se compararon dos condiciones, ambas aplicando flujo, con la diferencia de que en una de las condiciones el *shear stress* estaba por debajo del fisiológico en el túbulo proximal, y la otra condición, donde sí se aplicaba un *shear stress* fisiológico. Las diferencias en cuanto a la disposición de la ZO-1 son las mismas que con los dispositivos COP-2 y COP-3. Las células con *shear stress* fisiológico no mostraron una disposición tan alargada como en el dispositivo COP-3, pero sí se observó que las células en ambas condiciones a flujo en los PS-6 tenían una geometría similar a las células en estático del dispositivo de COP-3 y a las RPTEC/TERT1 en los dispositivos COP-2 en los dos regímenes de flujo. La presencia del cilio primario se observó en ambas condiciones como en los casos anteriores, y no se vieron cambios evidentes entre ellas (Figura 5.15). En este caso, no se observó una variación en la altura de las células cuando se aplicó un *shear stress*

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

fisiológico, al igual que en los dispositivos COP-2, algo que sí ocurrió sin embargo con el dispositivo COP-3.

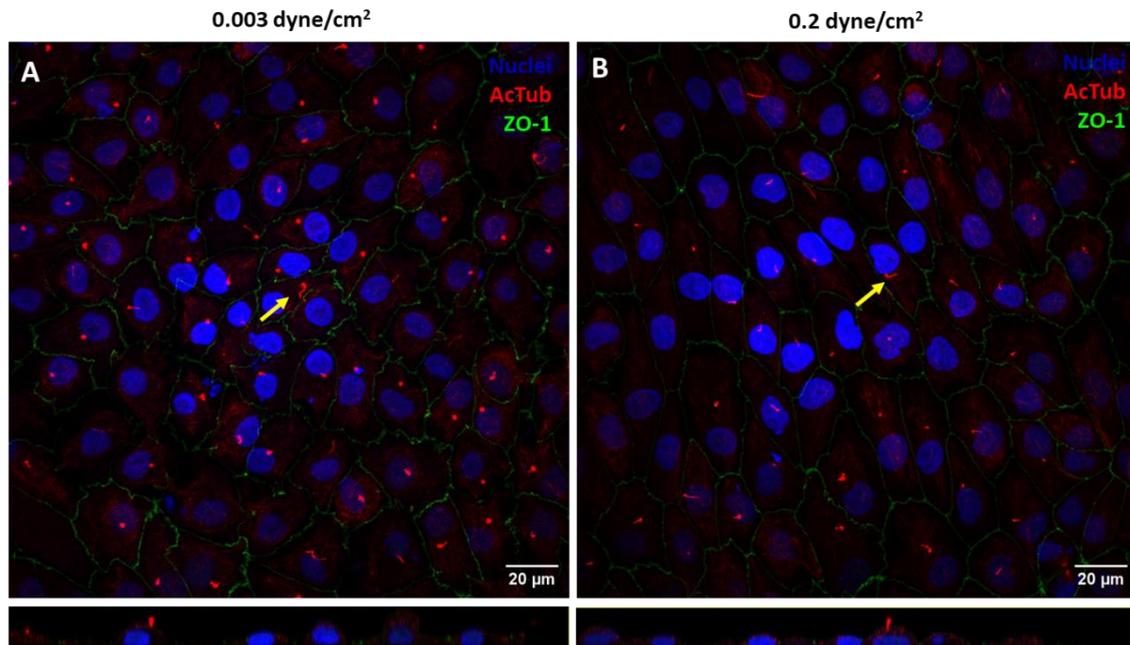


Figura 5.15. Inmunofluorescencia de RPTEC/TERT1 en dispositivo PS-6. Después de 72h a flujo bajo (0.003 dyn/cm²) y a flujo alto (0.2 dyn/cm²), se analizó la presencia de ZO-1 (verde) y tubulina acetilada (rojo) en las RPTEC/TERT1 en dispositivo PS-6. Tanto en el modelo de flujo bajo (A) como en el modelo a flujo alto (B) se confirmó la presencia tanto de la ZO-1 como de la tubulina acetilada, como en los dispositivos COP-2 y COP-3. Las flechas amarillas indican la presencia del cilio primario, marcado con tubulina acetilada, en ambos modelos. La línea amarilla indica la altura a la que está hecho el corte en Z. Barra de escala 20μm.

Como en el caso anterior, en los dispositivos COP-2 se quiso observar la disposición del citoesqueleto en los dispositivos PS-6. Se obtuvieron los mismos resultados para los dos modelos, ya que se observaron fibras de estrés de actina tanto en la condición *con shear stress* de 0.003 dyn/cm² como con un *shear stress* de 0.2 dyn/cm² (Figura 5.16B, E). Al igual que en el anterior dispositivo, en los PS-6 se vio que la vimentina estaba presente en ambas condiciones (Figura 5.16 C, F).

La visualización mediante la técnica de inmunofluorescencia de estructuras presentes en las RPTEC/TERT1 permitió observar posibles diferencias dependiendo del dispositivo microfluídico que se estaba utilizando. Estas diferencias solo se observaron en el dispositivo COP-3 en referencia a la altura de las células dentro del dispositivo. Cuando estuvieron en estático se observó un epitelio más aplanado, mientras que las células que fueron sometidas a *shear stress* sí mostraron mayor altura y con una forma más cuboidal, lo cual podría ser una

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

señal de que el estímulo del flujo podría favorecer una morfología más cercana a las células del túbulo proximal *in vivo*, ya que éstas son cuboidales y no aplanadas. Como se ha comentado previamente, las células a flujo en este dispositivo proliferaban más en comparación con el estático, y esto puede que influya en la altura de las células, ya que al disponer del mismo espacio y seguir proliferando tuviesen que adquirir dicha morfología cuboidal.

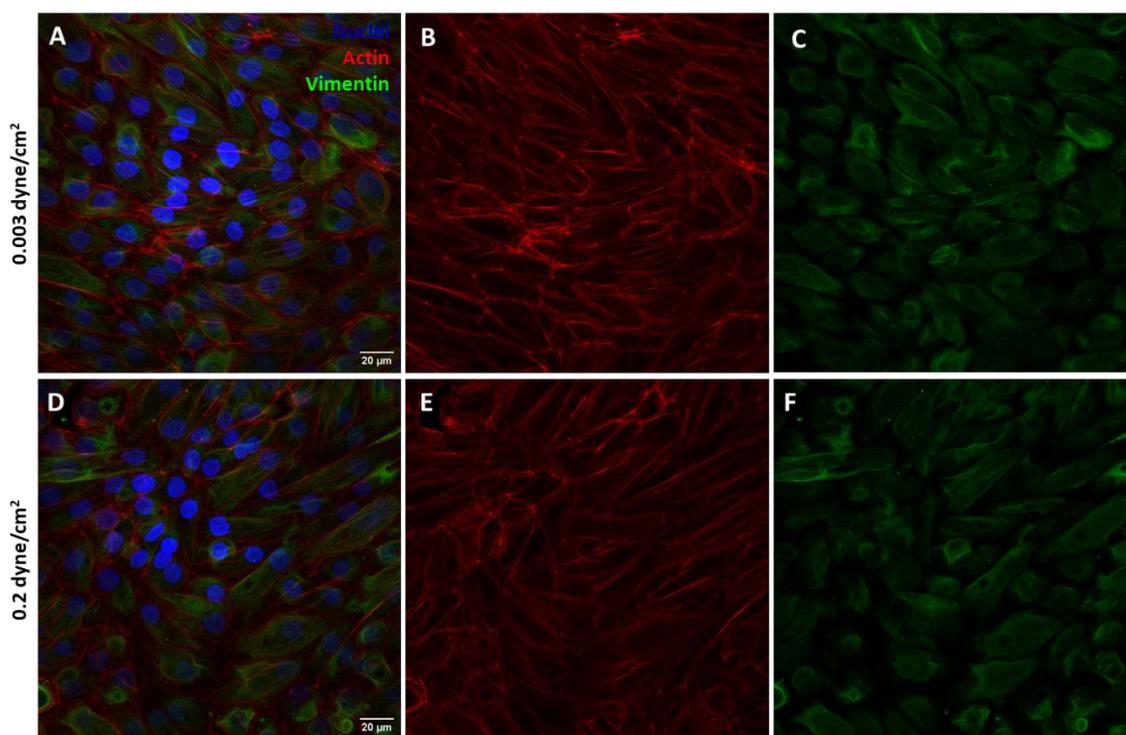


Figura 5.16. RPTEC/TERT1 en dispositivo PS-6 para la visualización del citoesqueleto. En los dos modelos se confirmó la presencia de fibras de estrés de actina (B, E), marcada en rojo. Igualmente se vio que las células tenían vimentina formando parte también del citoesqueleto (C, F). Barra de escala 20 μm .

En los dispositivos COP-2 y COP-3 no se observaron diferencias entre el modelo a flujo bajo y flujo alto, y tampoco se vio que hubiese diferencias en la morfología y disposición celular entre ambos dispositivos, por lo que el régimen de flujo, bajo o alto, no produjo cambios en el epitelio formado en los canales.

5.2.3. Expresión génica de marcadores renales en RPTEC/TERT1 mediante RT-PCR y qPCR

5.2.3.1. Dispositivo COP-3

Con el fin de valorar si la expresión tanto de marcadores específicos del túbulo proximal como no específicos de esta parte de la nefrona se veía afectada por la exposición a flujo, o simplemente por el cultivo en dispositivos microfluídicos, se hizo RT-PCR con las muestras obtenidas. En este caso, se compararon dos modelos; tras exponer a las células a un flujo de 13.33 μl durante 30 minutos cada 12h, o al mismo flujo de forma continua, aplicando un *shear stress* fisiológico de 0.2 dyn/cm^2 cinco días en el dispositivo COP-3. Los resultados obtenidos mostraron que se expresaban los mismos marcadores en ambos modelos, que fueron KSP, DPP4, α -SMA, SGLT2, APN, GAPDH, GGT1 y NKCC2 (Figura 5.17). De todos ellos, DPP4, SGLT2 y GGT1 son específicos de este segmento de la nefrona. La megalina, que sí está presente en el túbulo proximal, no se observó en ninguno de los dos modelos. Si se comparan estos resultados con los controles de las RPTEC/TERT1 en placa multipocillo de 96 de los experimentos de tubulogénesis (Figura 4.9), no se observan tampoco diferencias entre los dos modelos en los dispositivos COP-3 y el cultivo celular en placa de 96 pocillos.

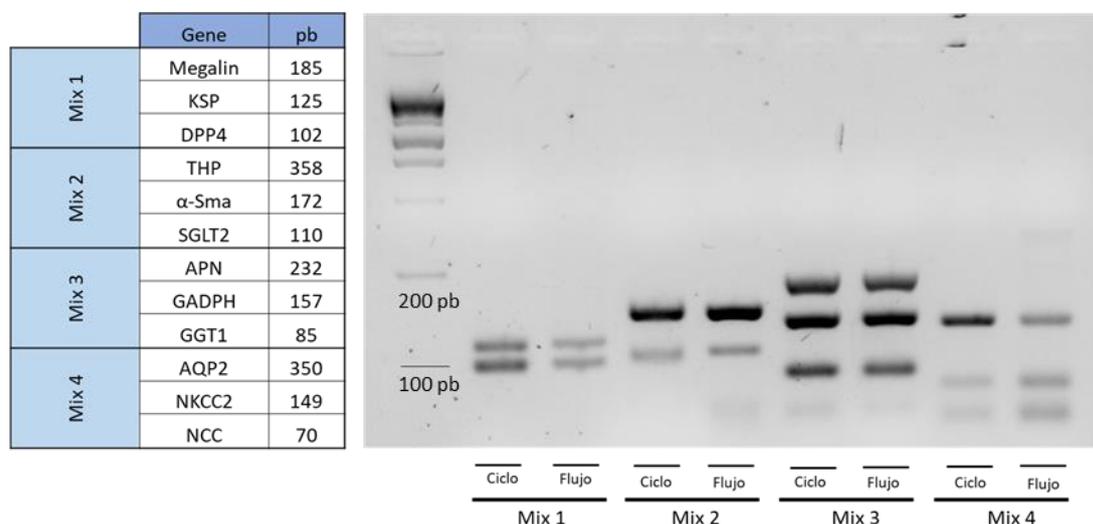


Figura 5.17. RT-PCR de RPTEC/TERT1 tras aplicar shear stress en dispositivos COP-3. Se analizaron mediante RT-PCR diferentes marcadores en los dos modelos, el de flujo intermitente durante 30 minutos cada 12h (Ciclo) y el flujo con un shear stress fisiológico de 0.2 dyn/cm^2 (Flujo). De forma cualitativa no se vieron diferencias en la expresión entre los dos modelos en ninguno de los marcadores analizados.

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

Tras confirmar que la exposición a flujo no modifica el fenotipo base de la línea celular, se realizó un análisis cuantitativo mediante qPCR de marcadores celulares relacionados con las respuestas al estrés celular, la transición epitelio-mesénquima, la diferenciación celular, el transporte renal y el daño renal en los dispositivos COP-3, aplicando un flujo 13.33 $\mu\text{l}/\text{min}$ con un shear stress de 0.2 dyn/cm^2 , durante 24h, 48h y 72h y en células control en un dispositivo en estático, para verificar si el flujo o el *shear stress* tienen efectos más sutiles en estos procesos celulares (Figura 5.18).

En los marcadores relacionados con el estrés celular, se observó que AMPKa1, AMPKa2 y mTOR disminuyeron su expresión en las condiciones en las que las RPTEC/TERT1 estuvieron sometidas a un *shear stress* fisiológico tanto a las 24h como a las 48h y 72h cuando se comparó con el cultivo celular en el dispositivo COP-3 en estático. mTOR, que está relacionado con la proliferación y el metabolismo celular, disminuyó su expresión en los tres modelos a flujo respecto al control en estático. Esta disminución en la expresión de los marcadores de estrés celular respecto al control no fue significativa estadísticamente en ninguno de los tres modelos.

En el caso de los dos marcadores cuantificados relacionados con hipoxia, se observó que HIF1A disminuía su expresión en las células sometidas a *shear stress*, sin embargo, HIF2A aumentó su expresión. Los tres marcadores estudiados relacionados con la transición epitelio-parénquima, la fibronectina, la vimentina y α -SMA, disminuyeron también su expresión cuando se sometió a las células a *shear stress* en los tres modelos a flujo. Igual que sucedió con los marcadores de estrés celular, esta disminución no fue significativa cuando fue analizada estadísticamente.

Al comparar los tres modelos a flujo a diferentes tiempos, se observó que las células respondían de una forma similar, independientemente del tiempo que habían estado sometidas a un *shear stress* fisiológico., respecto a la condición del dispositivo en estático.

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

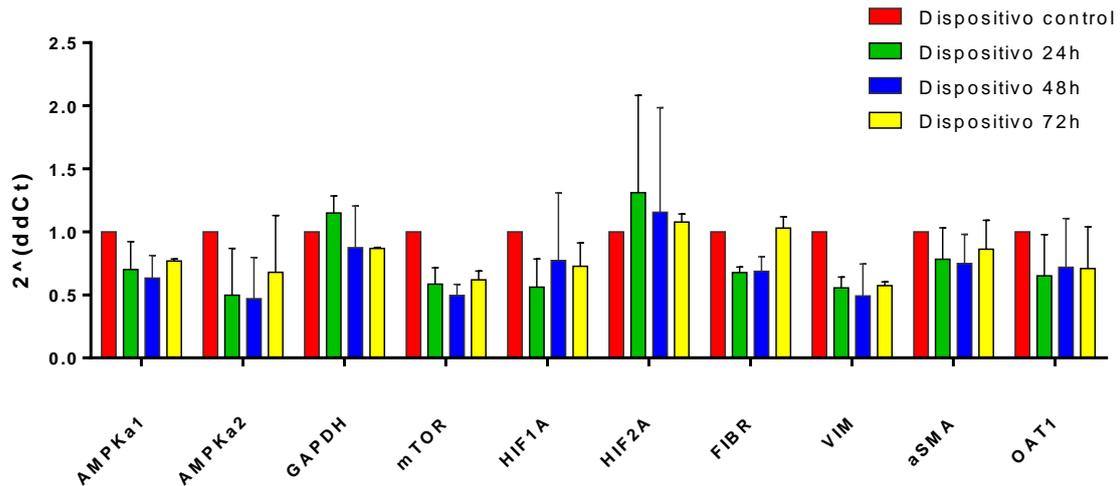


Figura 5.18. Expresión de diferentes genes mediante qPCR en el dispositivo COP-3. Se analizaron diferentes marcadores relacionados con estrés celular, transición epitelio-parénquima, diferenciación y transporte renal en el dispositivo COP-3 tras aplicar *shear stress* a durante 24, 48 y 72h. Two-way ANOVA. n=2

En referencia al transporte de citotóxicos en el túbulo proximal, se analizó la expresión de cuatro transportadores implicados en el mismo, OAT1, OAT3, OCT1 y OCT2. Se vio que OAT3, OCT1 y OCT2 no se expresaron en ningún modelo, pero OAT1 sí está presente en las RPTEC/TERT1, aunque su expresión parece disminuir en los dispositivos expuestos a *shear stress* durante 24h, 48h y 72h respecto al dispositivo control en estático, pero sin resultados significativos.

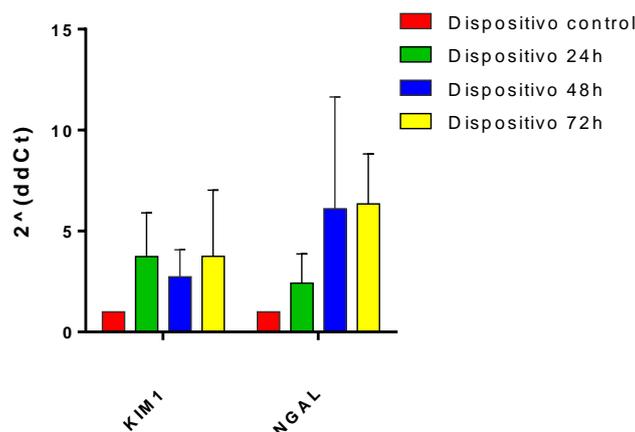


Figura 5.19. Expresión de marcadores de daño renal en dispositivo COP-3. La expresión de KIM1 y NGAL, marcadores relacionados con daño renal, aumentó en los modelos a flujo respecto al dispositivo en estático, pero no se hallaron diferencias significativas en la expresión de estos marcadores. Two-way ANOVA. n=2

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

Finalmente, se analizó la expresión de dos marcadores de daño renal, KIM1 y NGAL. Se observó que había sobreexpresión de ambos genes en los modelos en los que las células estuvieron sometidas a *shear stress* respecto al control en el dispositivo en estático, pero no se observaron diferencias significativas entre los diferentes modelos. (Figura 5.19).

5.2.3.2. Dispositivo COP-2

En este dispositivo se analizaron marcadores de estrés celular y de daño renal, así como la expresión de diferentes transportadores presentes en el túbulo proximal renal (Figura 5.20). Se pudo observar que había una disminución en la expresión de AMPKa y AMPka2 en los dos modelos a flujo respecto al control, al igual que en los marcadores de hipoxia HIF1A y HIF2A. Dentro de los marcadores de daño renal, se vio que había una disminución en la expresión de KIM1 en los dos modelos a flujo respecto al control en estático, sin embargo, hubo un aumento de NGAL, respecto al control en estático.

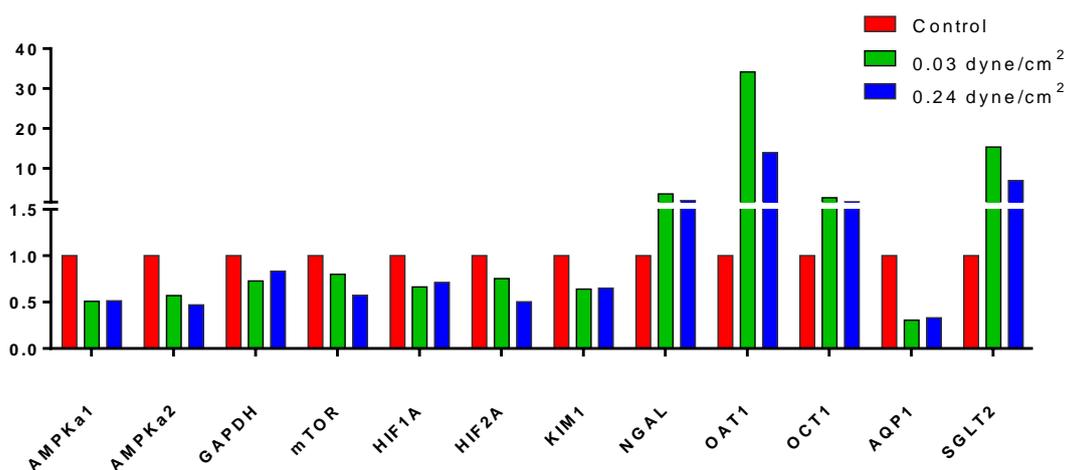


Figura 5.20. Expresión de marcadores de estrés celular, hipoxia, daño renal y transportadores en las RPTEC/TERT1 en dispositivo COP-2. La expresión de marcadores de estrés celular como AMPKa1, AMPKa2 y mTOR disminuyó en los modelos a flujo respecto al control. Dentro de los marcadores de daño renal, KIM1 disminuyó su expresión en los modelos a flujo, mientras que NGAL aumentó su expresión. La expresión de OAT1, OCT1 y SGLT2, transportadores presentes en el túbulo proximal, aumentó en los modelos a flujo respecto del modelo control en estático. n=1

La expresión de los transportadores OAT1, OCT1 y SGLT2 aumentaron su expresión cuando las RPTEC/TERT1 estuvieron expuestas a flujo, sin embargo, el transportador AQP1 disminuyó en ambos modelos, tanto a flujo bajo como a flujo alto respecto al control.

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

Solo se pudieron observar tendencias ya que la muestra fue de $n=1$, por lo que no se pudo realizar un análisis estadístico de los resultados.

5.2.3.3. Dispositivo PS-6

En la misma línea que con el dispositivo COP-2, se analizaron los marcadores descritos previamente (Figura 5.21). En este caso, se identificaron diferencias significativas en los dos marcadores de daño renal, KIM1 y NGAL. Estas diferencias se vieron en KIM1 al comparar el control con el modelo a flujo bajo 0.003 dyn/cm^2 y entre este modelo y el de flujo alto 0.2 dyn/cm^2 . En ambos casos la expresión de dicho marcador aumentó respecto al control en estático. En relación a NGAL, solo se vieron diferencias significativas entre el control y el flujo bajo, aumentando su expresión en el caso del flujo bajo respecto al control en estático.

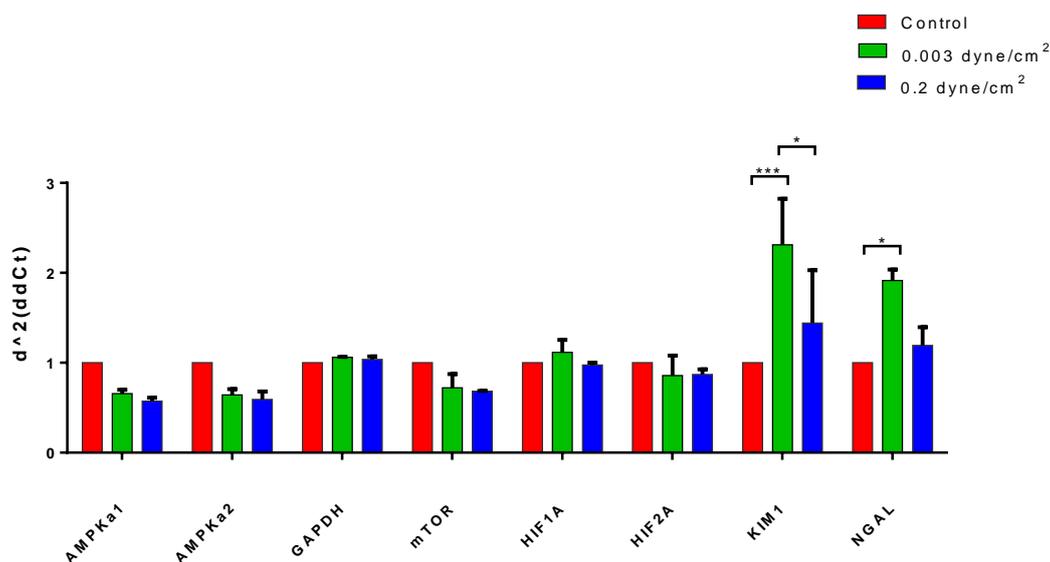


Figura 5.21. Expresión de marcadores de estrés celular, hipoxia y daño renal presentes en RPTEC/TERT1 en dispositivos PS-6. Los marcadores de daño renal KIM1 y NGAL aumentaron de forma significativa su expresión en los modelos sometidos a flujo bajo (0.003 dyn/cm^2) y a flujo alto (0.2 dyn/cm^2) respecto al control en estático. Two-way ANOVA, $n=2$

Con la finalidad de analizar la actividad de transporte entre los diferentes modelos, se analizaron algunos de los transportadores presentes en el túbulo proximal, OAT1, OCT1, AQP1 y SGLT2 (Figura 5.22). En el caso OAT1, se hallaron diferencias significativas en su expresión entre el control y el flujo bajo, el control y el flujo alto y entre los dos regímenes de flujo, en los que aumentó su expresión respecto del control en estático. La expresión de

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

AQP1 aumentó igualmente en los dos modelos a flujo respecto al control de forma significativa. Por último, el transportador SGLT2 también aumentó su expresión en los dos modelos a flujo respecto al control, observándose diferencias significativas entre el control y el flujo alto y entre los dos regímenes de flujo.

Al comparar los dispositivos COP-2 con el dispositivo PS-6, se observaron dos diferencias a resaltar en la expresión del marcador de daño renal KIM1 y en la expresión del transportador AQP1. En el caso de KIM1, se vio que su expresión disminuía en el caso del dispositivo COP-2, sin embargo, ocurrió lo contrario en el caso del dispositivo PS-6 ya que su expresión aumentó respecto al control en estático. Esto puede deberse a que en el dispositivo PS-6 hay un mayor número de células, ya que se conectaban seis canales del dispositivo en serie y en el dispositivo COP-2 eran dos canales. En ambos casos el medio en el reservorio era de 3 ml. El área de cada canal en ambos dispositivos era similar, pero el hecho de que hubiese más células en el PS-6 puede que influya en la producción de metabolitos y que estos al acumularse tuviesen un efecto tóxico en el cultivo celular.

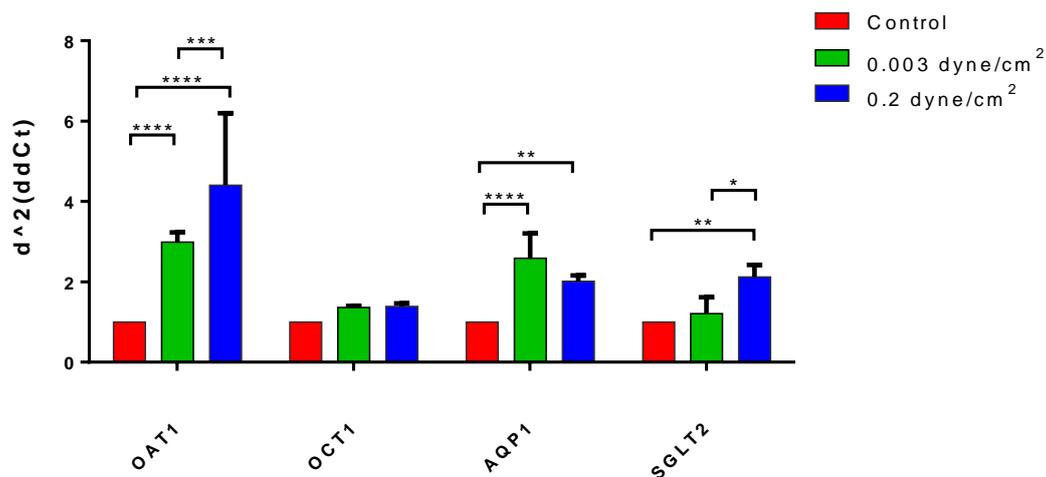


Figura 5.22. Expresión de transportadores en las RPTEC/TERT1 en dispositivo PS-6. Se hallaron diferencias significativas en la expresión de OAT1, AQP1 y SGLT2, aumentando su expresión en los modelos a flujo respecto al control en estático. Two-way ANOVA, n=2, ***p<0.0001

En referencia a la expresión del transportador AQP1, se vio que en el dispositivo COP-2 disminuía y en el PS-6 aumentaba en los dos modelos a flujo respecto al control en estático. Esta disminución en el dispositivo COP-2 puede deberse a una adaptación de las RPTEC/TERT1 que están sufriendo un daño, aunque no pueden sacarse conclusiones ya

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

que solo se hizo una vez y no pudo hacerse un análisis estadístico. Este transportador sin embargo aumentó su expresión de forma significativa en el dispositivo PS-6, al igual que el resto de los transportadores analizados excepto OCT1. El aumento de los transportadores señala que podría haber una diferenciación a un fenotipo más especializado del túbulo proximal renal, y esto podría influir en los ensayos de nefrotoxicidad a fármacos.

5.3. Discusión

Los modelos renales *in vitro* basados en tecnología microfluídica, que tratan de mimetizar lo que ocurre *in vivo*, se han ido desarrollando a lo largo de los años con el fin de desarrollar un modelo que sea útil para ensayos de nuevos fármacos, como modelos de enfermedades renales y también para medicina personalizada (Paoli and Samitier, 2016).

Con el fin de desarrollar un modelo renal *in vitro* que permita aplicar un *shear stress* fisiológico al cultivo celular en dispositivos microfluídicos, en el marco de esta tesis se testaron diferentes modelos de dispositivo, así como diferentes formas de aplicar un flujo determinado para observar posibles cambios en el fenotipo de la línea celular RPTEC/TERT1.

Dentro de los métodos empleados para aplicar *shear stress* al cultivo dentro de los dispositivos, el uso de la bomba peristáltica fue el que mejor resultados dio por diferentes razones. Es un sistema sencillo de utilizar cuando se adquiere experiencia y es un método reproducible y que no requiere de equipamiento específico, aparte de la bomba peristáltica. Es versátil ya que con ella se pudieron poner a flujo los tres tipos de dispositivos. Cada dispositivo requería de un sistema de tubos diferentes debido a sus diferencias en las conexiones, pero el tubo de la bomba peristáltica que es necesario para impulsar el medio de cultivo fue el mismo en todos los casos, tubo Tygon. Se eligió este material entre las diferentes opciones disponibles porque es el que mejor soporta el trabajo mecánico. Esto es importante puesto que la presión que ejercen los rodillos del eje de la bomba peristáltica puede llegar a desgastar los tubos. Para conectar los canales en serie en los diferentes dispositivos, en el COP-3 se utilizó tubo Tygon, para el COP-2 tubo PTFE y para el PS-6 se utilizó tanto tubo Tygon como tubo de silicona. A pesar de estas diferencias en el montaje de los tres sistemas, fue el que pudo implementarse en todos los casos con la bomba peristáltica.

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

En el caso del sistema de control de presión, a pesar de tener la ventaja de que quedase registrado el flujo durante todo el experimento, no es un método sencillo de utilizar y necesita más equipamiento y experiencia para su uso. Además, este sistema daba errores constantes por lo que la reproducibilidad de los experimentos era muy baja. El difícil manejo de este tipo de sistema, añadido al alto volumen de medio de cultivo necesario para su funcionamiento, ya que era un circuito abierto en vez de cerrado como la bomba peristáltica, hizo que se descartara para el desarrollo posterior del modelo de nefrotoxicidad.

El uso de un circuito cerrado tiene varias ventajas respecto al circuito abierto. Con este método es posible la recircularización del medio, por lo que con un volumen bajo de medio de cultivo se puede mantener el cultivo celular durante todo el experimento a flujo, que en este caso fueron 72h. Con el circuito abierto del sistema microfluídico por control de presión hubo que emplear 100 ml, en comparación de los 3 ml que se utilizaron con la bomba peristáltica, lo que supone una reducción considerable en el uso de medio de cultivo. El circuito abierto, si quiere mantenerse durante varios días en rangos de flujo altos, tiene que manipularse para rellenar el reservorio de medio, lo que conlleva el riesgo de posibles contaminaciones del sistema. Por otro lado, si se quieren llevar análisis posteriores de metabolitos presentes en el medio de cultivo producidos por las células, el circuito cerrado hace que estén a una mayor concentración debido al poco volumen utilizado.

Hay estudios en los que el uso de un balancín o una plataforma con movimientos orbitales han sido usados para aplicar un *shear stress* determinado. En el caso del agitador orbital, se observó una mayor densidad celular, se incrementó la resistencia transepitelial (TEER) y aumentó también la expresión de diferentes marcadores de túbulo proximal. Sin embargo, concluyen que estos resultados pudieron obtenerse debido a que la agitación del medio de cultivo aumentó la disponibilidad de nutrientes y el acceso al oxígeno disuelto en el medio, y no simplemente por el *shear stress* (Ferrell *et al.*, 2018). El uso de un balancín (OrganoPlate, MIMETAS) para aplicar *shear stress* en dispositivos microfluídicos, incrementó la absorción de albúmina-FITC en la línea celular de túbulo proximal ciPTEC en aquellos dispositivos que habían sometidos a un *shear stress* de 2.0 dyn/cm² respecto a los que habían estado sometidos a 0.5 dyn/cm², observando también mayor actividad de transportadores como P-gp y MRP2/4 en el modelo a 2 dyn/cm². Sin embargo, este estímulo se debía a picos de *shear stress* dependiendo del ángulo del balancín, por lo que no era un estímulo constante, además de que la bidireccionalidad del flujo hace que tampoco represente lo que ocurre en el tejido nativo (Vriend *et al.*, 2020). En nuestro caso, el uso del balancín fue exclusivamente para la renovación del medio de cultivo y para el mantenimiento del cultivo celular antes de conectar

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

los dispositivos a flujo. Es una herramienta útil, ya que se confirmó que las células proliferaban más rápidamente que cuando se dejaban los dispositivos en estático. No se optó por este sistema para la aplicación de *shear stress* por diferentes razones. Según los cálculos matemáticos obtenidos con MatLab, en los que había que tener en cuenta el ángulo del balancín, la frecuencia en la oscilación de la plataforma y la geometría de los canales de los dispositivos se vio que el balancín tenía varias limitaciones a la hora de alcanzar un *shear stress* fisiológico. Por otro lado, el flujo bidireccional, como se ha dicho anteriormente, no representa lo que ocurre en el túbulo proximal. Otro factor a tener en cuenta para descartar este sistema fue que el consumo de nutrientes y oxígeno del medio de cultivo por parte de las células hace que sea necesario el cambio de medio de cultivo, lo que conlleva la manipulación de los dispositivos en el curso de los experimentos.

La elección del tipo de materiales con el que están hechos los tubos influye a la hora de la aparición de burbujas en el circuito. En este sentido, los tubos de silicona, material poroso y por lo tanto permeable a gases, generaron más burbujas que cuando se utilizó con tubo Tygon en los dispositivos PS-6. Si bien es cierto que la generación de burbujas no se produjo con el tubo Tygon, que no es poroso y es impermeable a gases, sí podían haberse visto aumentados los marcadores de estrés celular por el hecho de utilizar todo el sistema de tubos de un material impermeables a gases. Sin embargo, los datos obtenidos por qPCR en dispositivos PS-6 con este tipo de tubo Tygon (Figura 5.21) no hicieron aumentar la expresión de HIF1A y HIF2A, ambos genes implicados en estrés celular por hipoxia. Estos dos marcadores tampoco se vieron afectados en los dispositivos COP-2, en los que se utilizó tubo PTFE, también impermeable a gases, al igual que el COP, el material con el que están fabricados estos dispositivos.

En referencia a los dispositivos, los tres tipos que se probaron tenían características diferentes, tanto en el material empleado en su fabricación, como en el área cultivable de cada canal y el número de canales que se conectaban en serie. El dispositivo de tres canales (COP-3) está fabricado con COP, estando el suelo del dispositivo adherido a la pieza superior con adhesivo biocompatible. Debido a esto, se generaban burbujas en los laterales de los canales al no estar completamente sellados, dando lugar a que el crecimiento de la monocapa no fuese uniforme ya que donde había burbujas no crecían las células. Con los diferentes cambios de medio antes de aplicar flujo dichas burbujas desaparecían, pero esto hacía que la

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

siembra no fuese homogénea en los canales, además de que el manejo del chip era costoso debido a la geometría de los canales.

Los dispositivos de dos canales de BeOnChip (COP-2) facilitaron el protocolo de siembra y proliferación de las células respecto al dispositivo anterior, debido a su método de fabricación y también a la geometría de los canales y al diámetro de los reservorios laterales. El volumen de medio que era posible añadir en los reservorios favoreció la fase de proliferación en los canales, ya que no se consumía tan rápidamente como en el dispositivo COP-3. Además, para favorecer el intercambio de oxígeno y la disponibilidad de nutrientes del medio de cultivo, se utilizó un balancín que permitía el movimiento del medio a lo largo del canal. A su vez, para favorecer la adhesión celular se aplicó un *coating* de colágeno I, con el fin de que las células soportasen la aplicación del *shear stress* sin que se produjese un levantamiento del cultivo celular en los canales.

Por último, el dispositivo de seis canales de IBIDI (PS-6) difiere en varios aspectos de los dos anteriores. El material empleado para su fabricación, PS, es permeable a gases, a diferencia de los dispositivos de COP, lo que puede modificar el comportamiento de las células dentro del dispositivo. A su vez, los canales son más anchos, por lo que hay mayor número de células por canal, lo que facilita análisis posteriores, como por ejemplo el análisis en cambios de expresión de marcadores celulares por qPCR, ya que se obtiene una mayor concentración de RNA en este dispositivo que en los dos anteriores. Además, al tener seis canales a los que se les puede aplicar el mismo *shear stress* conectándolos en serie, sometiendo así a las células al mismo estímulo, se pueden hacer ensayos de toxicidad con ellos ya que pueden analizarse seis concentraciones de un tóxico determinado para obtener una curva de toxicidad con seis puntos diferentes.

Cuando se analizaron mediante inmunofluorescencia dos marcadores presentes en este tipo celular, tanto la ZO-1 como la presencia del cilio primario, se observó que en los tres dispositivos se observaban los mismos cambios respecto a la ZO-1 cuando se comparaba el estático con el dispositivo a flujo. Así mismo, la presencia del cilio primario no se vio comprometida por la aplicación de *shear stress* en el cultivo celular, pero no se observaron diferencias cualitativas en el número ni en la longitud del mismo cuando se compararon las condiciones en estático y a flujo.

5. Desarrollo del modelo kidney-on-a-chip

Finalmente, para llevar a cabo los ensayos de nefrotoxicidad se eligió el dispositivo PS-6 por diferentes razones. Este dispositivo era compatible con el uso de bomba peristáltica, lo que permitía un circuito cerrado con recircularización del medio de cultivo durante 72h sin manipular los dispositivos. Por otra parte, los resultados obtenidos por qPCR mostraron un incremento en la expresión de los transportadores OAT1, AQP1 y SGLT2 (Figura 5.22). El transportador OAT1, situado en la parte basolateral de las células del túbulo proximal, está implicado en el transporte de xenobióticos (Ivanyuk *et al.*, 2017). Al verse aumentada su expresión, podrían verse diferencias en la respuesta a nefrotóxicos cuando se compara con un cultivo celular tradicional.

Además, este dispositivo, al tener seis canales conectados en serie, permitía analizar seis concentraciones de nefrotóxicos diferentes en un solo dispositivo, a diferencia de los otros dos, el COP-2 y COP-3, facilitando los ensayos y disminuyendo el número de dispositivos necesarios para cada ensayo. Por todo ello, se procedió a utilizar el PS-6 para los ensayos de toxicidad a fármacos con potencial nefrotóxico.

**6. ENSAYOS DE NEFROTOXICIDAD EN
EL MODELO DE TUBULOGÉNESIS Y
EN EL MODELO *KIDNEY-ON-A-CHIP***

6.1. Introducción

El daño renal se define como un grupo heterogéneo de factores que acaban afectando tanto a la estructura como a la función del riñón. La presentación clínica del daño renal y el curso del mismo es variable, pudiéndose definir como daño renal agudo o crónico dependiendo de su duración (Eckardt *et al.*, 2013). Tanto el daño renal agudo como el crónico son definidos por medidas objetivas como la albuminuria, alteraciones en el sedimento urinario, por imagen para detectar posibles lesiones y mediante biopsias. También se mide la función renal, observándose en ambos casos una disminución de la tasa de filtración glomerular, un aumento de la creatinina sérica y aumento en el volumen de orina (Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group, 2012, 2014). La aparición de daño renal agudo, que puede producir cambios en la función renal en tan solo una semana, en muchos casos acaba por generar daño renal crónico. Uno de los problemas a la hora de detectar a tiempo el daño renal es que el concepto clínico del mismo se basa en cambios en la filtración glomerular, que se traduce en un aumento de la creatinina sérica; la hipótesis que se emplea es que una vez hay cambios en la creatinina, ya se ha producido daño tanto en la estructura como en la función del riñón.

El daño renal aparece independientemente de la edad, sexo, grupo étnico y país donde reside la población. El daño renal crónico se ha considerado como un problema de salud global ya que afecta a un 10-16% de la población adulta de Asia, Australia, Europa y los Estados Unidos. Su prevalencia, además, aumenta el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, de la progresión de la enfermedad renal, y también está relacionado con problemas de obesidad, diabetes e hipertensión (Matsushita *et al.*, 2010). El daño renal crónico, como otros tipos de enfermedades crónicas, sí se ha visto que aumenta con la edad, puesto que el 20% de la población que lo padece son mayores de 60 años, cifra que aumenta en un 35% en personas mayores de 70 años (Eckardt *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta que la población cada vez está envejeciendo más a nivel global, cabe esperar que la morbilidad del daño renal crónico se vaya acrecentando en los próximos años.

Una de las causas principales de la aparición del daño renal agudo es el uso de fármacos, que por su uso prolongado en el tiempo, pueden dar lugar a la aparición de lesiones tanto en la parte glomerular como en la parte tubular de la nefrona (Wu and Huang, 2018). La poca representatividad de los modelos preclínicos actuales de lo que ocurre realmente en el riñón

6. Ensayos de nefrotoxicidad en el modelo de tubulogenesis y en el modelo kidney-on-a-chip

hace necesario que se desarrollen nuevos modelos que se acerque más a la fisiología renal, para así buscar estrategias más efectivas para la prevención de la aparición del daño renal.

En el caso del daño renal producido por fármacos que producen nefrotoxicidad, el túbulo proximal es la parte de la nefrona que más comprometida ve su función. Debido a la gran cantidad de transportadores que presenta, el túbulo proximal es la principal elección a la hora de testar la toxicidad frente a fármacos. La línea celular RPTEC/TERT1, que proviene de túbulo proximal humano, ha sido utilizada para analizar la nefrotoxicidad de fármacos utilizados en la clínica y los resultados fueron analizados mediante transcriptómica en cultivo celular en monocapa en membranas Transwell (Aschauer *et al.*, 2015). En un estudio llevado a cabo con la misma línea celular y también en membranas Transwell, se analizó el efecto de diferentes fármacos a las 24h y a los 14 días de exposición a los mismos a diferentes concentraciones. El cisplatino, la gentamicina y el zoledronato presentaron mayor nefrotoxicidad cuando el tratamiento se prolongó durante 14 días en comparación a cuando se trataron las células durante 24h. La ciclosporina A y el tacrolimus mostraron un efecto citotóxico muy bajo tanto a las 24h como a los 14 días de tratamiento. Se observó que la ciclosporina A no afectaba a la viabilidad celular en ninguna de las concentraciones, sin embargo el tacrolimus no mostraba ningún efecto a 63 μM pero se observó una total pérdida de la viabilidad celular a 100 μM (Secker *et al.*, 2019).

Con el fin de desarrollar modelos tridimensionales donde haya interacciones entre las células, pero también con la matriz extracelular y su microentorno, se han utilizado diferentes estrategias para generar estructuras lo más parecidas a las que se encuentran en el riñón. Un estudio en el que se utilizó un hidrogel basado en ácido hialurónico donde se embebieron organoides de túbulo proximal de ratón, demostró que este tipo de cultivo podía mantenerse hasta dos meses sin desdiferenciación celular y que era útil para el estudio de la generación de los metabolitos procedentes del metabolismo de fármacos como el cisplatino, además de expresar marcadores de daño renal como KIM-1 tras la exposición a dicho fármaco (Astashkina *et al.*, 2012). Otro modelo en 3D donde se realizaba co-cultivo de células endoteliales con células de túbulo proximal humano fue utilizado como modelo de nefrotoxicidad a cisplatino, y observaron que este co-cultivo celular era sensible a este fármaco ya que a dosis muy bajas, de 5 μM , la tasa mortalidad celular era del 50 % (King *et al.*, 2017). Este tipo de modelos, así como el avance en el uso de organoides para estudios de nefrotoxicidad, son relevantes para conocer el efecto de diferentes fármacos en modelos complejos, pero una de las características relevantes presentes en el riñón y de la que estos modelos carecen, es la aplicación de *shear stress*, el cual es un estímulo presente en el túbulo

6. Ensayos de nefrotoxicidad en el modelo de tubulogenesis y en el modelo kidney-on-a-chip

proximal y en otras partes de la nefrona, y que se ha visto que produce cambios tanto morfológicos como fisiológicos en el cultivo celular (Jang *et al.*, 2013). A lo largo de los años se han desarrollado modelos *in vitro* de túbulo proximal a los que se les ha aplicado flujo y han sido testados frente a fármacos que producen nefrotoxicidad. El uso de diferentes herramientas, como balancines, agitadores orbitales o bombas peristálticas ha demostrado que este estímulo puede generar cambios en la expresión de transportadores y otros marcadores que se encuentran en las células del túbulo proximal, aumentando su expresión o actividad al aplicar *shear* (Jang *et al.*, 2013; Ferrell *et al.*, 2018).

Con el avance del uso de la tecnología microfluídica, se han desarrollado también modelos en chips con diferentes tipos celulares presentes en el riñón, recreando estructuras similares a las encontradas en la nefrona. En un modelo de nefrona *in vitro* se co-cultivaron células epiteliales de túbulo proximal, células endoteliales y podocitos y se aplicó flujo para comprobar su eficacia para el análisis de la nefrotoxicidad producida por el cisplatino y la doxorubicina. Observaron que había cambios significativos en la sensibilidad a dichos fármacos en este modelo frente al cultivo tradicional (Qu *et al.*, 2018). En la línea de generar cada vez modelos más complejos, en un estudio se utilizaron células obtenidas de organoides de riñón para la generación de una estructura en 3D del túbulo proximal, embebida en un hidrogel de gelatina y fibrina. Estas células sometidas a *shear stress* aumentaron la expresión de transportadores del túbulo proximal, OCT2 y OAT1/3, ambos relacionados con la absorción de fármacos, y se vio que estas células liberaban más lactato deshidrogenasa (LDH) cuando estuvieron expuestas a cisplatino que las células que se mantuvieron sin aplicar *shear stress*. El desarrollo de este tipo de modelos entraña una gran dificultad técnica y, aunque aparentemente funcionan, finalmente no llegan a utilizarse de forma rutinaria en laboratorios de fisiología renal. Hay también opciones comerciales, como el modelo de túbulo proximal desarrollado con OrganoPlate, pero éste sus ventajas, así como varias limitaciones. Tiene la ventaja de que en una sola plataforma pueden sembrarse 40 chips independientes para después aplicar *shear stress* mediante un balancín, aplicando un tipo de flujo bidireccional que no se asemeja a lo que ocurre en el riñón. Además, requiere una renovación de medio constante debido al bajo volumen que puede añadirse a los canales del chip (Vormann *et al.*, 2018). Esta herramienta, además de la dificultad técnica en su uso, tiene un alto coste, por lo que es de difícil aplicación de forma rutinaria en el laboratorio.

La tendencia hacia modelos cada vez más complejos ha hecho que éstos difieran en cuanto a los tipos celulares utilizados, al tipo de herramientas aplicadas para aplicar flujo, y también al rango de *shear stress* generado en los cultivos celulares, haciendo que sea complejo llegar a

6. Ensayos de nefrotoxicidad en el modelo de tubulogénesis y en el modelo kidney-on-a-chip

un consenso y a un protocolo estandarizado (Birdsall and Hammond, 2021). Con el fin de generar un modelo *in vitro* de riñón robusto, reproducible y que sea fácilmente implantable en la práctica del laboratorio, es necesario implementar un modelo sencillo y que esté al alcance de cualquier laboratorio, con un equipamiento y las herramientas necesarias para llevarlo a cabo que sean asequibles tanto económicamente como técnicamente. Por este motivo, los dos modelos desarrollados en el marco de esta tesis, tanto el modelo basado en tubulogénesis como el basado en la aplicación de *shear stress* en dispositivos microfluídicos, han sido testados frente a fármacos que producen nefrotoxicidad, con el fin de validar dichos modelos para poder llevarlos a la práctica y que puedan ser utilizados como herramienta de *screening* frente a fármacos en desarrollo. Los fármacos utilizados fueron la daunorrubicina, el cisplatino y el tacrolimus. La daunorrubicina es un potente agente anticancerígeno que inhibe la síntesis de DNA y RNA. Ésta causa síndrome nefrótico, produciendo además lesiones renales y esclerosis focal glomerular (Santos *et al.*, 2020). Por otro lado, el cisplatino es un potente y ampliamente utilizado fármaco en el tratamiento de tumores sólidos y produce lesiones a nivel del túbulo proximal. Es uno de los fármacos más utilizados para analizar el efecto nefrotóxico en modelos *in vitro*. Es comúnmente utilizado para el tratamiento de diferentes tumores sólidos y tiene un efecto nefrotóxico a altas concentraciones. Actúa sobre diferentes mecanismos pero de forma general, actúa sobre el ADN, generando daño por interacción con las bases de purina del ADN y también por activación de diferentes señales que finalmente producen la apoptosis de las células dañadas (Ghosh, 2019). Finalmente, se utilizó también tacrolimus, el cual es un fármaco inmunosupresor que puede producir nefrotoxicidad aguda y crónica que puede derivar en un daño renal permanente (Gijssen *et al.*, 2012).

6.1.1 Hipótesis

Los nuevos modelos de riñón *in vitro*, que se caracterizan por representar de forma más aproximada lo que ocurre en el tejido nativo, responden de forma diferente a la exposición a fármacos con potencial nefrotóxico cuando se comparan estos modelos más complejos con el cultivo celular tradicional.

6.1.2. Objetivos específicos

- Desarrollo de protocolos de toxicidad de fármacos con la línea celular RPTEC/TERT1
- Comparación del efecto nefrotóxico de la daunorrubicina y el cisplatino en el modelo de tubulogenesis respecto al modelo de cultivo celular tradicional mediante estudios cinéticos.
- Comparación del efecto nefrotóxico de la daunorrubicina, el tacrolimus y el cisplatino en el modelo de *kidney-on-a-chip* respecto al modelo de cultivo celular tradicional mediante estudios cinéticos.

6.2. Resultados

6.2.1. Nefrotoxicidad en el modelo de tubulogénesis

En el modelo de tubulogénesis se testaron dos nefrotóxicos, la daunorrubicina y el cisplatino. Ambos se aplicaron en los tres modelos descritos previamente, es decir, el control en monocapa en una placa multipocillo, los túbulos formados al añadir un 5% de Matrigel a la suspensión celular antes de sembrar las RPTEC/TERT1, y este mismo modelo, añadiendo un hidrogel en la base, sembrando las células en su superficie.

Después del tratamiento con daunorrubicina a diferentes concentraciones (0, 15, 30, 50, 100 y 300 μM) durante 24h, se cambió el medio de cultivo y se mantuvieron durante 24h antes de realizar el ensayo de viabilidad celular (Figura 6.1). De esta forma se intentó reproducir el proceso que ocurre *in vivo*, ya que los fármacos están presentes en la circulación unas horas hasta llegar a las células, por lo que el efecto citotóxico tarda en aparecer. Este ensayo se hizo 48h después del tratamiento, con un cambio de medio a las 24h para poder observar mejor el efecto del fármaco en el cultivo celular en los diferentes modelos y ver si las células conservaban la capacidad de proliferar después del tratamiento.

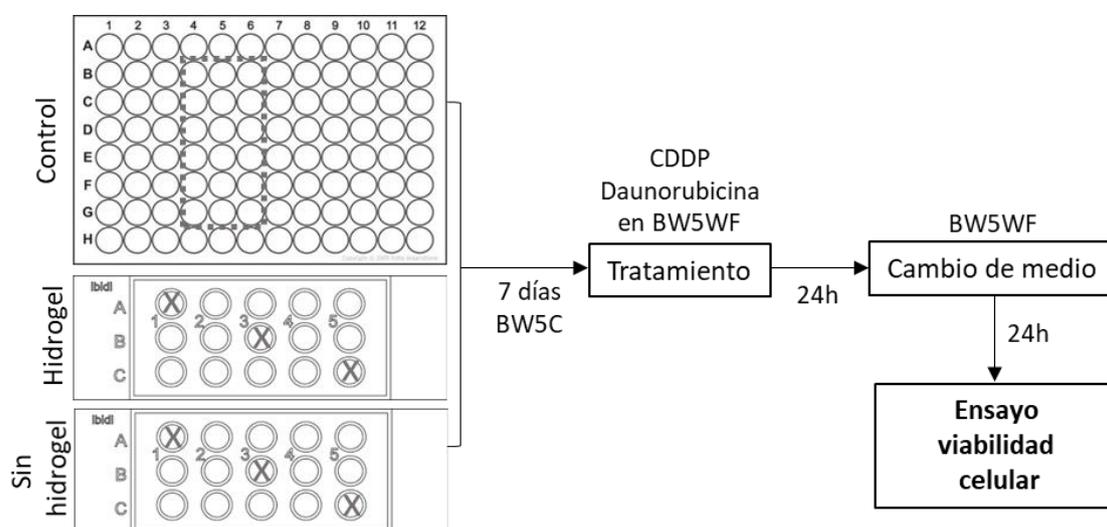


Figura 6.1. Esquema del protocolo de toxicidad en RPTEC/TERT1 en el modelo de tubulogénesis. Las RPTEC/TERT1 se sembraron en los tres modelos, el control, sobre un hidrogel formando estructuras tubulares al añadir a la suspensión celular 5% MG y esta misma condición sin hidrogel. Se mantuvieron en cultivo 7 días hasta que fueron tratadas con los diferentes fármacos durante 24h. Pasado este tiempo se renovó el medio y se mantuvieron otras 24h en cultivo celular hasta el ensayo de viabilidad celular final.

6. Ensayos de nefrotoxicidad en el modelo de tubulogenesis y en el modelo kidney-on-a-chip

Se observó una disminución en la viabilidad celular dosis-dependiente, conforme mayor era la concentración del fármaco mayor fue la mortalidad celular, siendo la concentración más alta, 300 μM letal para las RPTEC/TERT1, ya que en ninguno de los tres modelos se cuantificaron células vivas (Figura 6.2).

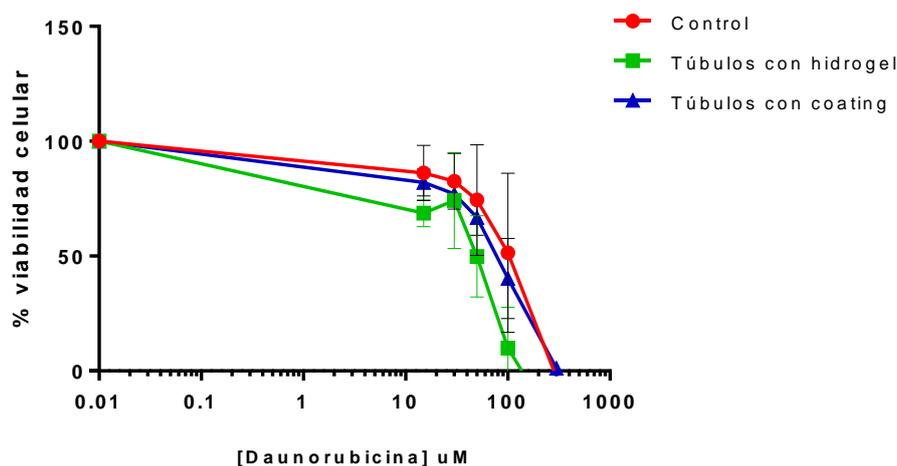


Figura 6.2. Respuesta dosis-dependiente de las RPTEC/TERT1 en control y formando túbulos tras tratamiento con daunorrubicina. Las células sobre hidrogel mostraron una resistencia menor al fármaco, observándose la curva de esta modelo desplazada a la izquierda. Media con desviación estándar. $n=5$

De forma paralela, se calculó el EC50, que en farmacología es la concentración que es necesaria de un fármaco para causar la mitad del efecto máximo posible, en este caso, la muerte celular de las RPTEC/TERT1 cuando fueron expuestas a los diferentes fármacos. En el caso de la daunorrubicina, los valores de EC50 del control, de los túbulos sobre hidrogel y de los túbulos sobre *coating* fueron de 217.732 (SD 104.042), 87.282 (SD 26.777) y 161.200 (SD 25.441) μM , respectivamente (Figura 6.3).

Se vieron diferencias significativas en el EC50 cuando se comparó el control en monocapa con los túbulos con hidrogel. Este resultado sugiere que los túbulos sobre hidrogel serían más sensibles al tratamiento con daunorrubicina, puesto que el EC50 es menor respecto al del control en la placa multipocillo.

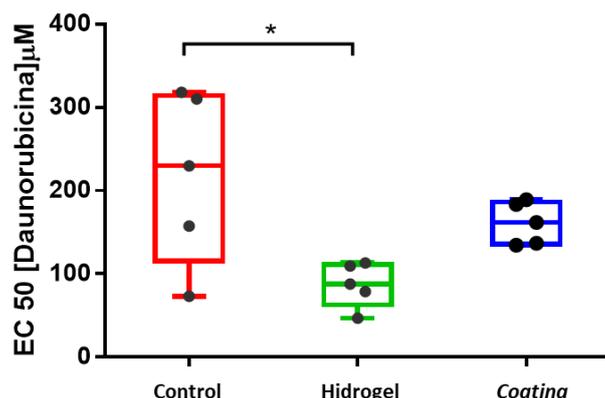


Figura 6.3. EC50 de la daunorrubicina en el modelo de tubulogénesis. En la gráfica se muestra el EC50 de los diferentes modelos: control 217.732 (SD 104.042), túbulos sobre hidrogel 87.282 (SD 26.777) y túbulos sobre coating 161.200 (SD 25.441). n=5, ANOVA, * p<0.05.

Este modelo de tubulogénesis también se utilizó para el tratamiento con cisplatino, siguiendo el mismo esquema de exposición al fármaco y analizando la viabilidad de igual forma que en el caso de la daunorrubicina. Se trataron las RPTEC/TERT1 en los tres modelos ya descritos con diferentes concentraciones de cisplatino: 0, 15, 30, 50, 100 y 300 μM. Se mantuvieron con el tratamiento durante 24h y tras ese tiempo se renovó el medio, para finalmente analizar la viabilidad celular pasadas otras 24h. Los resultados confirmaron una respuesta dosis-dependiente, al igual que con la daunorrubicina, ya que se vio más mortalidad celular al aumentar la concentración de cisplatino (Figura 6.4).

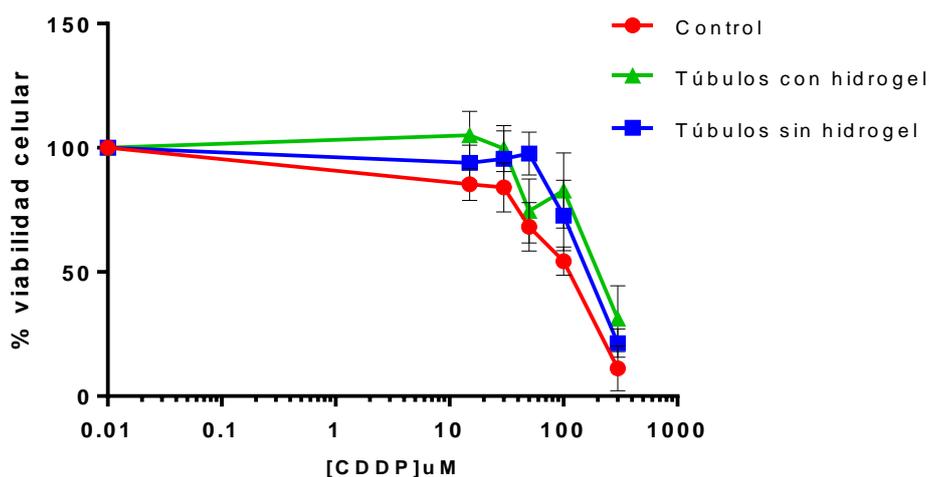


Figura 6.4. Viabilidad celular de RPTEC/TERT1 en control y formando túbulos tras tratamiento con cisplatino. Los dos modelos de tubulogénesis parecen tener más resistencia al cisplatino que el control, observándose la curva de estos dos modelos desplazada a la derecha. Media con desviación estándar. n=5

6. Ensayos de nefrotoxicidad en el modelo de tubulogénesis y en el modelo *kidney-on-a-chip*

En el caso del cisplatino no se observaron diferencias significativas entre los EC50 de los tres modelos, el control, las células sobre el hidrogel y sin el hidrogel, cuyos valores fueron 86.31 (SD 40.785), 160.788 (SD 59.002) y 141.310 (SD 85.023) μM , respectivamente (Figura 6.5).

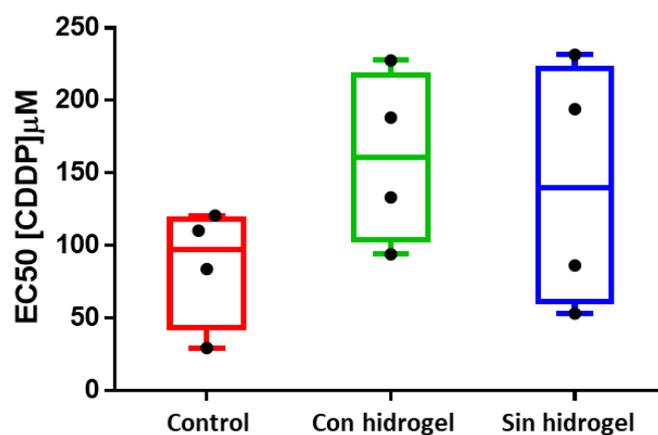


Figura 6.5. EC50 del cisplatino en el modelo de tubulogénesis. En la gráfica se muestra el EC50 del modelo control 86.31 (SD 40.785), túbulos sobre hidrogel 160.788 (SD 59.002) y túbulos sin hidrogel 141.310 (SD 85.023). ANOVA, $n=5$

La dispersión de los puntos no permite sacar conclusiones puesto que no hay significación estadística debido a esta dispersión en los datos, pero los resultados muestran una tendencia a aumentar la resistencia al cisplatino cuando las RPTEC/TERT1 se encuentran formando estructuras tubulares.

Estos resultados sugieren que el efecto de crecer las RPTEC/TERT1 como túbulos es dependiente del fármaco elegido, ya que este modelo en unas ocasiones sensibiliza, y en otras tiene un efecto protector frente al nefrotóxico utilizado.

6.2.2. Nefrotoxicidad en modelo de *kidney-on-a-chip*

Para el modelo basado en la aplicación de shear stress en el cultivo celular, utilizando dispositivos microfluídicos, se analizó la respuesta de las RPTEC/TERT1 tras el tratamiento con daunorrubicina, tacrolimus y cisplatino. En este caso, se comparó la sensibilidad a los citotóxicos en células RPTEC mantenidas previamente durante 72h en el modelo de cultivo perfundido frente al modelo convencional estático. En el modelo de cultivo perfundido se investigó además el efecto de exponer las células a un *shear stress* fisiológico.

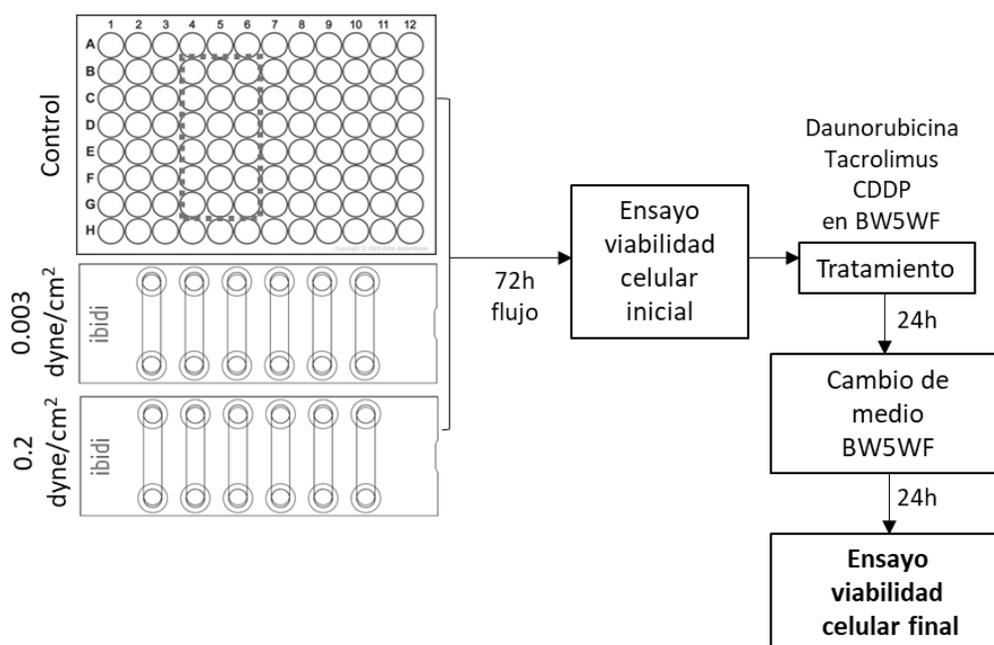


Figura 6.6. Esquema del protocolo de toxicidad en RPTEC/TERT1 en el modelo kidney-on-a-chip. Tras haber estado sometidas a flujo, se analizó la viabilidad celular inicial en los PS-6 tras haber sido sometidas a *shear stress* durante 72h. Después, se trató a las células con los diferentes fármacos durante 24h y se renovó el medio de cultivo. Transcurridas 24h desde el cambio de medio, se procedió al ensayo de viabilidad celular final.

Antes de exponer a las RPTEC/TERT1 a daunorrubicina, y tras el flujo de 72h, se analizó la viabilidad en aquellas células que habían estado sometidas a flujo con el fin de saber si habían soportado de igual forma el *shear stress* en los seis canales que conforman el dispositivo (Figura 6.7). Se vio que todos los canales presentaban una monocapa totalmente confluyente y que no había diferencias en la viabilidad celular de los diferentes canales, ni aplicando un *shear stress* de 0.003 dyn/cm² ni aplicando un *shear stress* fisiológico de 0.2 dyn/cm².

Estos dispositivos que habían estado a flujo, junto con las células control en placa multipocillo, fueron tratados con daunorrubicina a unas concentraciones de 0, 50, 100, 150, 200 y 300 μM durante 24h. Los PS-6 se mantuvieron en un balancín con el objeto de que las células estuvieran expuestas al fármaco de forma continua, durante las 24h del tratamiento. Tras ese tiempo se renovó el medio de cultivo y los PS-6 se mantuvieron igualmente en el balancín, para que hubiese un movimiento constante del medio de cultivo.

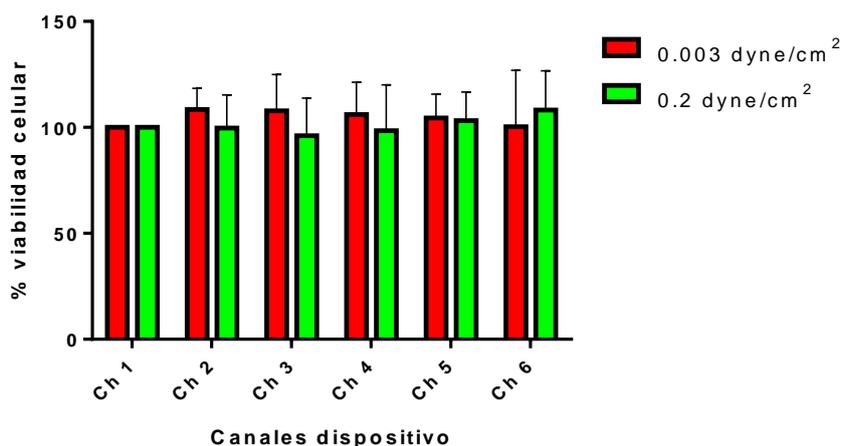


Figura 6.7. Análisis de la viabilidad celular tras exponer a las RPTEC/TERT1 a flujo en el dispositivo PS-6. Se analizó la viabilidad celular de los canales de los dispositivos por separado tanto a flujo bajo (0.003 dyn/cm^2) como a flujo alto (0.2 dyn/cm^2) tras 72h. El canal 1 (Ch1) corresponde a la entrada del medio de cultivo y el canal 6 (Ch6) a la salida. Este análisis se llevó a cabo midiendo la fluorescencia emitida por el Prestoblue en los diferentes canales. La gráfica muestra la viabilidad en términos relativos. $n=7$. Two-way ANOVA

En el caso de los experimentos donde se aplicó a flujo, se midió la viabilidad celular de dos formas diferentes, con PrestoBlue y con cristal violeta a los tres modelos, el control, el flujo bajo (0.003 dyn/cm^2) y el flujo alto (0.2 dyn/cm^2). El PrestoBlue da datos correspondientes al metabolismo de las células, mientras que el cristal violeta es una medida del número de células que hay en cada condición.

Los resultados tanto del PrestoBlue (Figura 6.8A) como del cristal violeta (Figura 6.8B) mostraron que la viabilidad celular era dosis-dependiente, y que las células que habían estado sometidas a flujo parece que son más resistentes a la daunorrubicina ya que la curva está desplazada a la derecha respecto a la curva del control en estático.

El EC50 se calculó a partir de los datos obtenidos de la viabilidad celular cuantificada con PrestoBlue y con cristal violeta. Los resultados con PrestoBlue para el control en placa multipocillo, para el modelo a flujo con un shear stress de 0.003 dyn/cm^2 y 0.20 dyn/cm^2 fueron 128.537 (SD 63.852), 897.492 (SD 1102.871) y 315.216 (SD 247.653) μM , respectivamente (Figura 6.9A). En el caso del cristal violeta, se obtuvieron datos similares, que fueron 136.946 (SD 56.810), 897.492 (SD 1085.125) y 315.216 (SD 247.653) μM .

6. Ensayos de nefrotoxicidad en el modelo de tubulogenesis y en el modelo kidney-on-a-chip

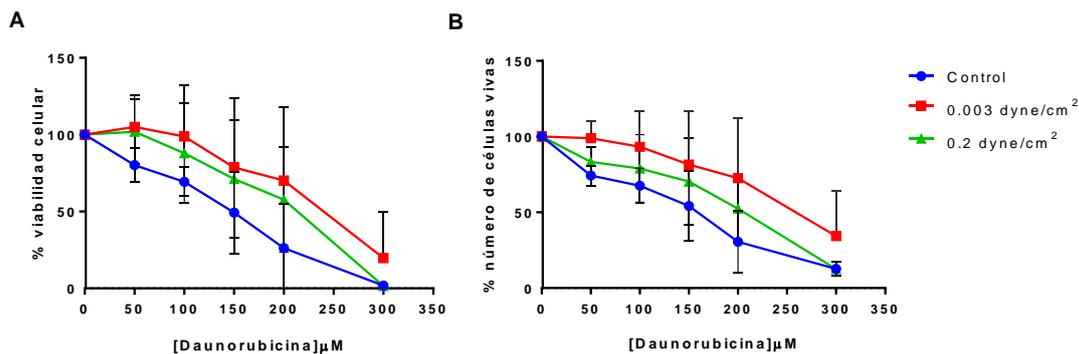


Figura 6.8. Viabilidad celular de RPTEC/TERT1 en control y después de haber sido sometidas a shear stress, aplicando el tratamiento con daunorrubicina. La viabilidad celular fue medida mediante PrestoBlue (A) y después con cristal violeta (B) en los tres modelos descritos: control en estático, flujo bajo (0.003 dyn/cm²) y flujo alto con *shear stress* fisiológico (0.2 dyn/cm²). Media con desviación estándar n=7.

Los datos sugieren que en los modelos donde se había aplicado flujo, las células fueron resistentes al citotóxico puesto que el EC50 es más alto en ambos casos respecto al control en estático. En el modelo de flujo bajo (0.003 dyn/cm²) se ve una gran dispersión en los resultados (Figura 6.9A, B), tanto en la viabilidad celular cuantificada mediante PrestoBlue (Figura 6.9A) como con cristal violeta (Figura 6.9B).

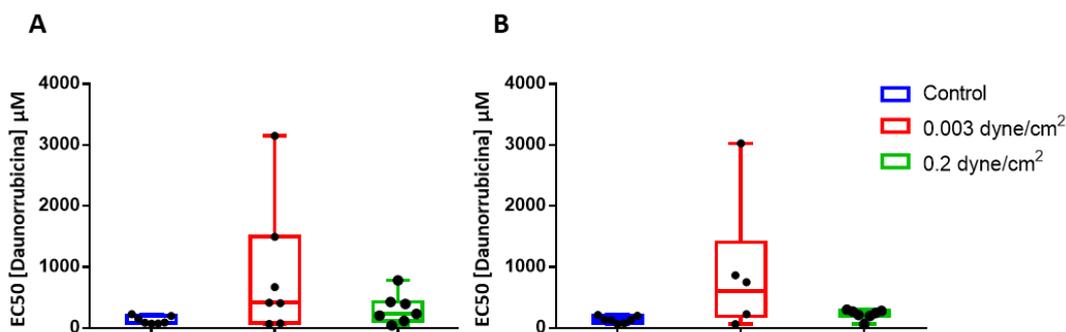


Figura 6.9. EC50 de la daunorrubicina en el modelo de kidney on a chip. La viabilidad celular analizada con PrestoBlue dio unos valores para el control, el flujo bajo (0.003 dyn/cm²) y flujo alto (0.2 dyn/cm²) de 128.537 (SD 63.852), 897.492 (SD 1102.871) y 315.216 (SD 247.653), respectivamente (A). Para el cristal violeta, los valores fueron 136.946 (SD 56.810), 897.492 (SD 1085.125) y 225.467 (SD 80.135), respectivamente. ANOVA, n=7.

Las RPTEC/TERT1 fueron tratadas también con tacrolimus en los tres modelos previamente mencionados. Después de haber sido expuestas a flujo, se analizó la viabilidad

6. Ensayos de nefrotoxicidad en el modelo de tubulogenesis y en el modelo kidney-on-a-chip

celular antes de tratar las células con el citotóxico y se obtuvieron los datos relativos a la viabilidad celular mediante PrestoBlue de cada canal del PS-6 por separado (Figura 6.10).

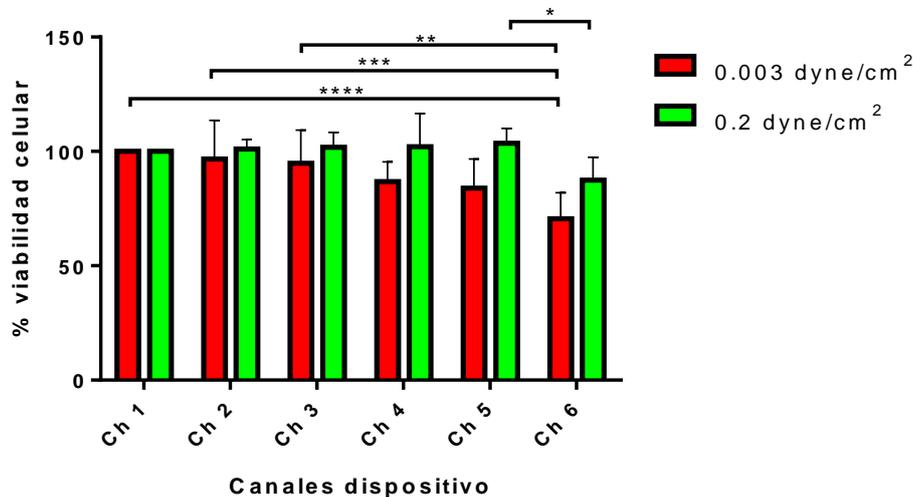


Figura 6.10. Análisis de la viabilidad celular tras exponer a las RPTEC/TERT1 a flujo en el dispositivo PS-6 durante 72h y antes del tratamiento con tacrolimus. Se analizó la viabilidad celular de los canales de los dispositivos como se ha descrito previamente para la daunorrubicina. n=7. Two-way ANOVA

En el caso de las células que habían estado sometidas a un *shear stress* de 0.003 dyn/cm², que se corresponde con un flujo bajo, se observó que la viabilidad celular disminuyó de forma significativa en el canal en el canal 6 respecto de los canales 1, 2 y 3 (Figura 6.10). Este efecto puede deberse a la falta de nutrientes y oxígeno que llega al canal 6 respecto a los primeros canales del dispositivo, ya que el flujo entra por el canal 1 y el canal 6 es el último por donde pasa el medio de cultivo. Al estar en un régimen de flujo bajo la disponibilidad de nutrientes puede que sea menor que en los canales más cercanos al reservorio de medio.

Tras realizar el ensayo de viabilidad celular iniciar, se trataron con 0, 15, 30, 50, 75 y 100 μ M de tacrolimus y se mantuvieron con dicho tratamiento durante 24h. Pasado este tiempo, se renovó el medio y se analizó la viabilidad celular y el número de células pasadas otras 24h, habiendo pasado un total de 48h desde el tratamiento (Figura 6.11).

Se observó que la viabilidad celular se mantenía en torno al 100% en las concentraciones que van de 0 a 50 μ M, para luego caer cerca del 0% en las concentraciones de 75 y 100 μ M.

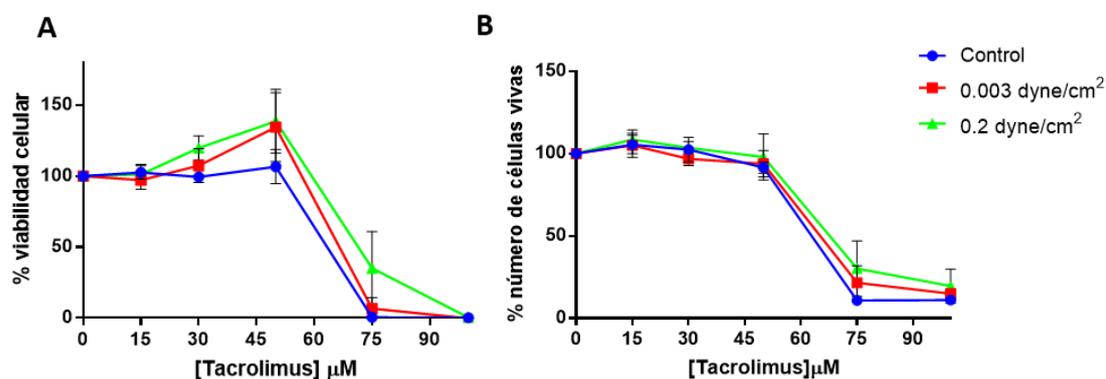


Figura 6.11. Viabilidad celular de RPTEC/TERT1 en modelo *kidney-on-a-chip* después del tratamiento con tacrolimus. En la figura se muestra la viabilidad celular en los tres modelos, en control y después de haber sido expuestas tanto a flujo bajo como a flujo alto y tras el tratamiento al tacrolimus. En la gráfica de la izquierda se muestran los resultados de la viabilidad celular con PrestoBlue (A) y a la izquierda con cristal violeta (B). Media con la desviación estándar n=7.

Como se observa en la gráfica con los datos relativos a la viabilidad celular medida con PrestoBlue (Figura 6.11A), en los dos modelos a flujo la viabilidad celular aumentó por encima del 100% del control que no estuvo expuesto a tacrolimus. En concreto, esto se observó cuando se expusieron a las RPTEC/TERT1 a 30 y 50 µM de tacrolimus. Sin embargo, al analizar el número de células vivas con cristal violeta (Figura 6.11B) en los mismos experimentos, este efecto en el aumento de la viabilidad celular en los modelos a flujo no estuvo presente (Figura 6.11B).

El EC50 del tacrolimus en los tres modelos fue calculado a partir de los datos de viabilidad celular analizados tanto con PrestoBlue como los datos obtenidos con el cristal violeta. Con el PrestoBlue para los tres modelos, es decir, control, flujo bajo y flujo alto, los valores EC50 fueron 67.966 (SD 5.675), 91.775 (SD 25.447) y 131.729 (SD 23.95) µM, respectivamente. Los valores EC50 obtenidos con cristal violeta fueron similares: en el control 67.966 (SD 5.675), a flujo bajo 82.575 (SD 17.775) y a flujo alto 103.339 (SD 26.090) µM (Figura 6.12).

Los datos obtenidos de la viabilidad celular mediante PrestoBlue evidenciaron diferencias significativas tanto entre el control en estático y el modelo a flujo alto como entre los dos modelos que habían estado a dos regímenes de flujo diferentes (Figura 6.12A).

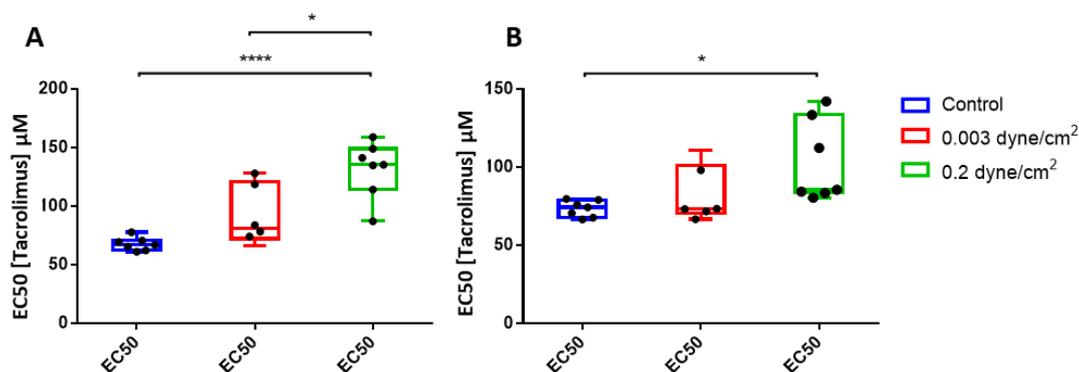


Figura 6.12. EC50 del tacrolimus en el modelo de kidney on a chip. La viabilidad celular analizada con PrestoBlue dio unos valores para el control, el flujo bajo (0.003 dyn/cm²) y flujo alto (0.2 dyn/cm²) de 67.966 (SD 5.675), 91.775 (SD 25.447) y 131.729 (SD 23.95), respectivamente (A). Para el cristal violeta, los valores fueron 73.660 (SD 5.266), 82.575 (SD 17.775) y alto 103.339 (SD 26.090), respectivamente. ANOVA, p<0.05. n=7.

En este caso, la aplicación de un *shear stress* fisiológico hace que aumente la resistencia a la exposición del fármaco cuando se compara con la condición control. Por otro lado, parece que el tipo de flujo también influye puesto que hay diferencias significativas entre el EC50 del flujo bajo y el flujo alto, este último correspondiente al modelo donde se aplica un *shear stress* fisiológico. Sin embargo, los datos relativos a la viabilidad analizada con cristal violeta solo muestran diferencias significativas entre el control y el flujo con un *shear stress* fisiológico (Figura 6.12B).

Finalmente, se trataron las RPTEC/TERT1 en el modelo *kidney-on-a-chip* con cisplatino, siguiendo el mismo procedimiento que con los dos fármacos anteriores. En el ensayo de viabilidad celular inicial, antes del tratamiento con el fármaco se vio que las células en el PS-6 a flujo alto con *shear stress* fisiológico (0.2 dyn/cm²) habían respondido de igual forma en todos los canales. Sin embargo, en el PS-6 a flujo bajo (0.003 dyn/cm²) la viabilidad celular disminuyó de forma significativa cuando se comparó el canal de entrada (Ch1) del flujo con el último canal por donde pasa el medio de cultivo (Ch6) (Figura 6.13). Esta diferencia en la viabilidad, como en el caso anterior observado antes del tratamiento con el tacrolimus, puede deberse al consumo de nutrientes y oxígeno por parte de las células situadas en los primeros canales, y que este consumo haga que ya no lleguen al último canal, haciendo que las células estén metabólicamente menos activas y por tanto la señal del PrestoBlue sea menor.

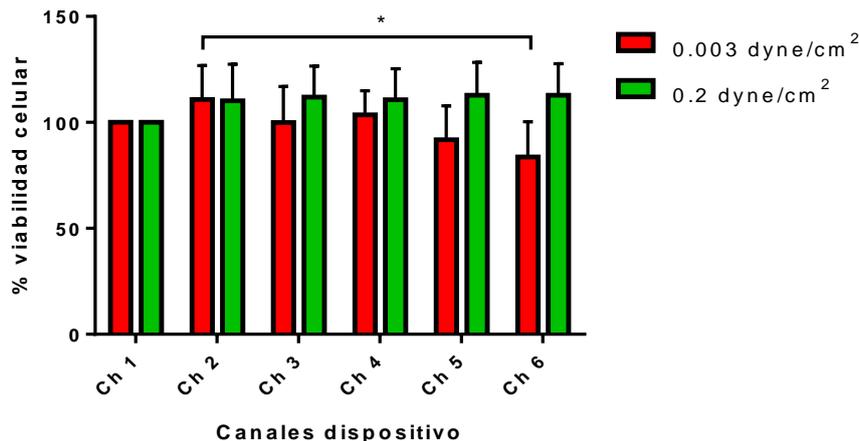


Figura 6.13. Análisis de la viabilidad celular tras exponer a las RPTEC/ antes de tratamiento con cisplatino. Se analizó la viabilidad celular de los canales de los dispositivos como se ha descrito previamente para la daunorrubicina y el tacrolimus. n=7. Two-way ANOVA

Posteriormente al ensayo de viabilidad celular inicial, se trataron las RPTEC/TERT1 en los tres modelos con cisplatino a unas concentraciones de 0, 15, 30, 50, 100 y 300 μM . Cuando se analizó la viabilidad con PrestoBlue y cristal violeta, se vio una gran variabilidad en los resultados entre los diferentes experimentos, además de que no se observó una curva dosis-dependiente clara como en los casos anteriores con daunorrubicina y tacrolimus dado que a la máxima concentración las células mostraron entorno a un 50% de viabilidad celular. En el análisis de la viabilidad celular con PrestoBlue (Figura 6.14A) se vio que las células expuestas a flujo eran metabólicamente más activas, sin embargo, al analizar el número de células vivas con cristal violeta (Figura 6.14B) este efecto no se observó.

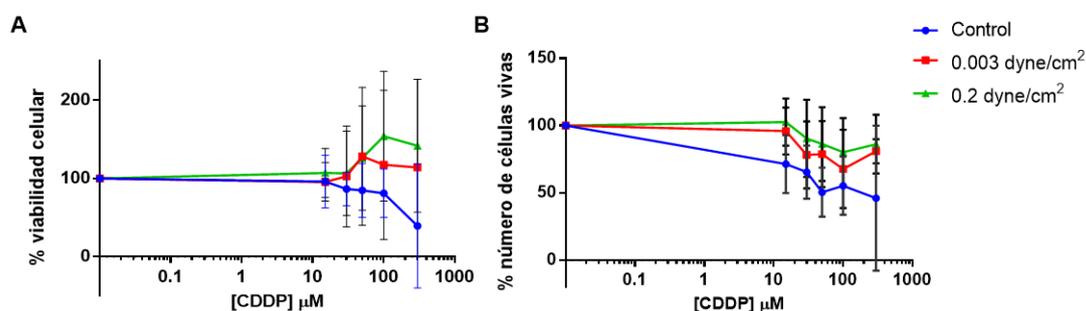


Figura 6.14. Viabilidad celular de RPTEC/TERT1 en control y después de haber sido sometidas a shear stress, aplicando el tratamiento con tacrolimus. La viabilidad celular fue medida mediante PrestoBlue (A) y después con cristal violeta (B) en los tres modelos descritos: control en estático, flujo bajo (0.003 dyn/cm²) y flujo alto con *shear stress* fisiológico (0.2 dyn/cm²) n=7

6. Ensayos de nefrotoxicidad en el modelo de tubulogenesis y en el modelo kidney-on-a-chip

Al obtener los datos de EC50 de los tres modelos, y dada la variabilidad de los datos obtenidos mediante PrestoBlue y el cristal violeta, no se pueden sacar conclusiones claras sobre el efecto del *shear stress* en las RPTEC/TERT1 respecto al cultivo celular control en estático. La dispersión en los datos del modelo a flujo hace que la desviación estándar sea muy grande (Figura 6.15A), por lo que en este caso el cálculo del EC50 a partir de los datos del ensayo de viabilidad celular con PrestoBlue no podrían utilizarse como medida para conocer si las células a flujo tienen más resistencia o no al cisplatino comparado con el control, o comparando los dos regímenes de flujo.

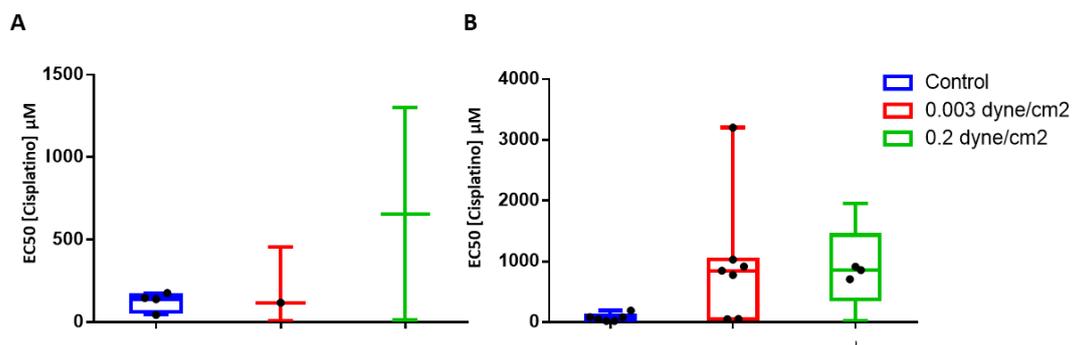


Figura 6.15. EC50 del cisplatino en el modelo de kidney on a chip. La viabilidad celular analizada con PrestoBlue dio unos valores para el control, el flujo bajo (0.003 dyn/cm²) y flujo alto (0.2 dyn/cm²) de 118.240 (SD 53.092), 193.243 (SD 232.864) y 656.045 (SD 912.104), respectivamente (A). Para el cristal violeta, los valores fueron 75.502 (SD 63.286), 984.429 (SD 1059.280) y alto 891.948 (SD 691.948), respectivamente. ANOVA, $p < 0.05$. $n = 7$.

En este caso el análisis de la viabilidad celular con cristal violeta refleja mejor los datos de la respuesta al cisplatino ya que no se observa tanta variabilidad en los resultados obtenidos mediante esta técnica. El análisis estadístico no halló diferencias significativas entre los tres modelos, aunque sí se observó que el EC50 era mayor en ambas modelos a flujo respecto al control en estático (Figura 15B).

6.3. Discusión

La aplicación de nuevos modelos de riñón *in vitro* que intentan mimetizar lo que ocurre en el tejido nativo en el organismo humano han demostrado tener utilidad para ensayos de nefrotoxicidad frente a fármacos. Estos modelos se han ido desarrollando a lo largo de los años con el objetivo de representar la fisiología renal en el cuerpo humano, a diferencia de los modelos de cultivo celular tradicional o los modelos en los que se utilizan animales de experimentación. Sin embargo, estos nuevos modelos, al estar en constante desarrollo todavía no se han implementado como una de las fases en los ensayos clínicos en los que se estudian nuevos fármacos. Por esto, es necesario estandarizar y definir los parámetros de los modelos emergentes para obtener datos que puedan ser útiles en las fases de desarrollo de nuevas drogas (Faria *et al.*, 2019). En este sentido, en el marco de esta tesis se han desarrollado dos modelos que intentan reproducir el fenotipo celular de las células del túbulo proximal renal, para así observar la respuesta de estos modelos a diferentes fármacos como el cisplatino, la daunorrubicina y el tacrolimus, fármacos conocidos por su potencial nefrotóxico (Alhassani *et al.*, 2021).

En el modelo de tubulogénesis, se vio una diferencia significativa en el EC50 de la daunorrubicina entre las células que formaban estructuras tubulares sobre un hidrogel y el control en monocapa. Las RPTEC/TERT1 mostraron ser más sensibles al fármaco cuando conformaron dichas estructuras sobre el hidrogel. Sin embargo, en el modelo *kidney-on-a-chip* las células que fueron sometidas a un *shear stress* fisiológico mostraron una tendencia a ser más resistentes al fármaco, aunque no se obtuvieron diferencias significativas. La daunorrubicina es una antraciclina como la doxorrubicina, y comparten mecanismo de acción. Ésta última sí ha sido utilizada en modelos *in vitro* de riñón. En uno de ellos donde se formaron estructuras tubulares embebidas en una matriz biológica, se observó que las células en 3D eran más sensibles a la doxorrubicina en comparación con el cultivo en 2D (DesRochers *et al.*, 2013). Este resultado podría ser un indicador de lo que se podría observar con la daunorrubicina, ya que en nuestro modelo de tubulogénesis las células de túbulo proximal también son más sensibles al fármaco. Se optó por la daunorrubicina debido a que no hay estudios *in vitro* con este nefrotóxico y al compartir mecanismo de acción con la doxorrubicina, podríamos extrapolar los datos obtenidos en estudios de otros laboratorios. En el caso del modelo *kidney-on-a-chip*, las células expuestas a un *shear stress* fisiológico fueron más resistentes al fármaco que las células en estático, con una diferencia significativa en el EC50. Tanto en el modelo de tubulogénesis como en el modelo *de kidney-on-a-chip* se ha visto

6. Ensayos de nefrotoxicidad en el modelo de tubulogénesis y en el modelo *kidney-on-a-chip*

que hay una respuesta distinta al control respecto a los modelos que se han desarrollado en esta tesis, pero son necesarios más estudios *in vitro* con la daunorrubicina para poder comparar los datos con otros modelos de riñón.

El CDDP, un fármaco utilizado en ensayos de nefrotoxicidad (Townsend *et al.*, 2003), también se utilizó tanto en el modelo de tubulogénesis como en el modelo *kidney-on-a-chip*. Aunque no se observaron diferencias significativas entre los tres modelos, el EC50 de las células que formaban estructuras tubulares era mayor que el del control, sugiriendo una tendencia a la resistencia de las células en el modelo de tubulogénesis respecto al control. En el caso del modelo *kidney-on-a-chip* no pueden sacarse conclusiones debido a la gran heterogeneidad en los resultados entre los diferentes experimentos. El cisplatino es un fármaco con baja solubilidad que tiende a precipitar, lo que hace que su preparación sea complicada y altamente variable entre experimentos. Este fármaco se ha utilizado también en un modelo de túbulo proximal en 3D en el que se analiza la liberación de LDH a la luz de la estructura tubular, viendo que es sensible al fármaco a unas concentraciones por encima de 30 μM (Vormann *et al.*, 2018), pero no lo comparan con un control de cultivo celular convencional, con lo que sus resultados son difícilmente comparables a nuestro modelo.

Aunque se desarrolló el modelo de tubulogénesis con el fin de obtener un protocolo aplicable en los laboratorios de forma sencilla con el fin de obtener datos reproducibles y por tanto ser válido para el análisis de diferentes fármacos, también tuvo sus limitaciones a la hora de analizar la viabilidad celular en respuesta a los diferentes fármacos que se utilizaron. En la condición en la que las células estaban formando túbulos sobre un hidrogel, surgió el problema de que, al llevar a cabo el ensayo de viabilidad celular tras la exposición a los fármacos, los hidrogeles podían despegarse de los pocillos debido a los lavados que había que realizar antes de añadir el reactivo PrestoBlue diluido en medio de cultivo. Esto, unido a que el reactivo pudiera difundir en el hidrogel, podía interferir en la lectura de la fluorescencia, obteniendo así datos no representativos de la respuesta de las células frente a los citotóxicos. Otro de los inconvenientes de este modelo es la alta heterogeneidad en la generación de las estructuras tubulares, algo que no pudo cuantificarse y que pudo haber influido en la variabilidad entre los diferentes experimentos cuando se expuso a las células al CDDP y la daunorrubicina.

En cuanto al efecto del tacrolimus en células de túbulo proximal, en un estudio en el que se utilizó también tacrolimus con la misma línea celular, RPTEC/TERT1, se observó que hasta una concentración de 63 μM las células no mostraban mortalidad, pero había una pérdida

6. Ensayos de nefrotoxicidad en el modelo de tubulogenesis y en el modelo kidney-on-a-chip

total de la viabilidad celular a una concentración de 100 μM (Secker *et al.*, 2019). Esto concuerda con los resultados obtenidos en el control en estático en la placa multipocillo, ya que el IC50 en el caso del control fue de 65.75 μM . Los datos obtenidos del EC50 las dos condiciones a flujo reflejan que las RPTEC/TERT1 expuestas a *shear stress* son más resistentes al fármaco que las células control en estático, siendo este efecto estadísticamente significativo entre el control y las células expuestas a un *shear stress* fisiológico de 0.2 dyn/cm^2 . Entre las dos condiciones a flujo también se encontraron diferencias significativas, siendo el EC50 mayor en el modelo con un *shear stress* fisiológico, lo que sugiere que el efecto protector podría estar relacionado con la exposición a este estímulo.

Los modelos desarrollados en esta tesis han demostrado tener una respuesta diferente al cultivo tradicional en placas de cultivo cuando las células fueron tratadas con diferentes fármacos, lo que hace pensar que quizá el cultivo celular tradicional no siempre sea el modelo óptimo para testar fármacos, ya que modelos más complejos de riñón muestran una respuesta diferente. Sería conveniente estudiar la respuesta a más fármacos que producen nefrotoxicidad con estos modelos, para obtener información y poder compararla con estudios de nefrotoxicidad en modelos *in vivo*, con el fin de correlacionar los datos obtenidos y saber con certeza si estos nuevos modelos de riñón *in vitro* consiguen mimetizar la fisiología del tejido nativo y que finalmente puedan utilizarse en estudios de nuevos fármacos.

7. CONCLUSIONES

7.1. Conclusions

During the course of this work, several *in vitro* kidney models have been developed using new cell culture strategies in order to apply them to drug toxicity assays. This section summarizes the main conclusions obtained in this doctoral thesis.

1. It is possible to induce the formation of tubules composed of polarised RPTEC/TERT1 cells directly on plastic, avoiding interferences in subsequent analysis of the hydrogels. The presence of Matrigel in the medium is the determining factor.
2. The formation of renal tubules in a microwell device is a simple and inexpensive protocol that allows quantification of cell sensitivity to nephrotoxins.
3. The adoption of a tubular structure associated with the physico-chemical microenvironment of the model results in changes in responses to cytotoxins that can be explained by a more differentiated phenotype.
4. The application of shear stress in RPTEC/TERT1 cells by generating flow with a peristaltic pump is a simple method to implement and allows recreating physiological stimulus present in the native tissue.
5. The pressure system for the application of shear stress is not the option of choice because it is a difficult tool to handle, as it is an open circuit with uncontrollable variables that generate fluctuations in the flow rate.
6. The PS-6 device proved to be the most versatile both in the seeding of RPTEC/TERT1 and in the characterisation of the model by immunofluorescence and qPCR techniques compared to the COP-2 and COP-3 devices.
7. The kidney-on-a-chip model in the PS-6 device allows easy and economical quantification of the sensitivity of cells when exposed to nephrotoxic drugs using two different cell viability techniques.
8. Drug resistance of cells exposed to shear stress can be explained by changes in phenotype that result in a more mimetic model of the proximal tubule.

7.2. Conclusiones

A lo largo de este trabajo, se han desarrollado varios modelos de túbulo proximal *in vitro* mediante nuevas estrategias de cultivo celular con el fin de aplicarlos a ensayos de toxicidad a fármacos. En este apartado se resumen las principales conclusiones obtenidas en esta tesis doctoral.

1. Es posible inducir la formación de túbulos compuestos de células RPTEC/TERT1 polarizadas directamente sobre plástico, evitando las interferencias en análisis subsecuentes de los hidrogeles. La presencia de Matrigel en el medio es el factor determinante.
2. La formación de túbulos renales en un dispositivo de micropocillos es un protocolo sencillo y económico que permite cuantificar la sensibilidad celular a nefrotóxicos.
3. La adopción de una estructura tubular asociada al microambiente físico-químico del modelo se traduce en cambios en las respuestas a los citotóxicos que pueden explicarse por un fenotipo más diferenciado.
4. La aplicación de *shear stress* en las células RPTEC/TERT1 mediante la generación de flujo con una bomba peristáltica es un método sencillo de implementar y que permite recrear dicho estímulo fisiológico presente en el tejido nativo.
5. El sistema a presión para la aplicación de *shear stress* no es la opción de elección por ser una herramienta de difícil manejo, por ser un circuito abierto y con variables no controlables que generan fluctuaciones en el caudal.
6. El dispositivo PS-6 resultó ser el más versátil tanto en la siembra de las RPTEC/TERT1 como en la caracterización del modelo mediante técnicas de inmunofluorescencia y qPCR respecto a los dispositivos COP-2 y COP-3.
7. El modelo *kidney-on-a-chip* en el dispositivo PS-6 permite cuantificar de forma fácil y económica mediante dos técnicas diferentes de viabilidad celular la sensibilidad de las células cuando son expuestas a fármacos nefrotóxicos.
8. La resistencia a fármacos de las células expuestas a *shear stress* puede explicarse por cambios en el fenotipo que se traducen en un modelo más mimético del túbulo proximal.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. Bibliografija

- Adelfio, M., Szymkowiak, S. and Kaplan, D. L. (2020) 'Matrigel-Free Laminin-Entactin Matrix to Induce Human Renal Proximal Tubule Structure Formation in Vitro', *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 6(12), pp. 6618–6625. doi: 10.1021/acsbomaterials.0c01385.
- Alhassani, R. Y. *et al.* (2021) 'Drug Therapies Affecting Renal Function: An Overview.', *Cureus*. Cureus, Inc., 13(11), p. e19924. doi: 10.7759/cureus.19924.
- Ali, M. *et al.* (2019) 'A Photo-Crosslinkable Kidney ECM-Derived Bioink Accelerates Renal Tissue Formation', *Advanced healthcare materials*. Wiley-VCH Verlag, 8(7), p. e1800992. doi: 10.1002/adhm.201800992.
- Aschauer, L. *et al.* (2015) 'Application of RPTEC/TERT1 cells for investigation of repeat dose nephrotoxicity: A transcriptomic study', *Toxicology in Vitro*. Elsevier Ltd, 30(1), pp. 106–116. doi: 10.1016/j.tiv.2014.10.005.
- Astashkina, A. I. *et al.* (2012) 'A 3-D organoid kidney culture model engineered for high-throughput nephrotoxicity assays', *Biomaterials*, 33(18), pp. 4700–4711. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.063.
- Baudoin, R. *et al.* (2007) 'Development of a renal microchip for in vitro distal tubule models', *Biotechnology progress*. Biotechnol Prog, 23(5), pp. 1245–1253. doi: 10.1021/BP0603513.
- Beamish, J. A., Chen, E. and Putnam, A. J. (2017) 'Engineered extracellular matrices with controlled mechanics modulate renal proximal tubular cell epithelialization', *PLoS ONE*, 12(7), pp. 1–24. doi: 10.1371/journal.pone.0181085.
- Bernard, M. *et al.* (2019) 'Impact of simulated biological aging on physicochemical and biocompatibility properties of cyclic olefin copolymers', *Materials Science and Engineering C*. Elsevier, 97(December 2018), pp. 377–387. doi: 10.1016/j.msec.2018.12.032.
- Birdsall, H. H. and Hammond, T. G. (2021) 'Role of Shear Stress on Renal Proximal Tubular Cells for Nephrotoxicity Assays', *Journal of toxicology*. J Toxicol, 2021. doi: 10.1155/2021/6643324.
- Bonventre, J. V. (2018) 'Kidney organoids—a new tool for kidney therapeutic development', *Kidney International*. Elsevier Inc, 94(6), pp. 1040–1042. doi: 10.1016/j.kint.2018.07.029.
- Booth, R. E., Johnson, J. P. and Stockand, J. D. (2002) 'Aldosterone', *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*. American Physiological Society, 26(1–4), pp. 8–20. doi: 10.1152/ADVAN.00051.2001/ASSET/IMAGES/LARGE/U10120082105.JPEG.
- Bosch-fortea, M. *et al.* (2019) 'Micropattern-based platform as a physiologically relevant model to study epithelial morphogenesis and nephrotoxicity', *Biomaterials*. Elsevier, 218(November 2018), p. 119339. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119339.
- Chen, D. *et al.* (2004) 'Differential expression of collagen- and laminin-binding integrins mediates ureteric bud and inner medullary collecting duct cell tubulogenesis', *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 287(4 56-4), pp. 602–611. doi: 10.1152/ajprenal.00015.2004.

8. Bibliografija

- Chen, W. C., Lin, H. H. and Tang, M. J. (2014) 'Regulation of proximal tubular cell differentiation and proliferation in primary culture by matrix stiffness and ECM components', *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. American Physiological Society, 307(6), pp. F695–F707. doi: 10.1152/AJPRENAL.00684.2013/SUPPL_FILE/VIDEOS2.MPG.
- Chen, Z. and Lee, J. B. (2021) 'Biocompatibility of SU-8 and Its Biomedical Device Applications', *Micromachines*. Micromachines (Basel), 12(7). doi: 10.3390/M12070794.
- Chung, I. M. *et al.* (2008) 'Bioadhesive hydrogel microenvironments to modulate epithelial morphogenesis', *Biomaterials*, 29(17), pp. 2637–2645. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.03.008.
- Cruz-Acuña, R. *et al.* (2019) 'Identification of matrix physicochemical properties required for renal epithelial cell tubulogenesis by using synthetic hydrogels', *Journal of cell science*, 132(20). doi: 10.1242/jcs.226639.
- DesRochers, T. M. *et al.* (2013) 'Bioengineered 3D Human Kidney Tissue, a Platform for the Determination of Nephrotoxicity', *PLoS ONE*, 8(3). doi: 10.1371/journal.pone.0059219.
- DesRochers, T. M., Palma, E. and Kaplan, D. L. (2014) 'Tissue-engineered kidney disease models', *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier, pp. 67–80. doi: 10.1016/j.addr.2013.12.002.
- Eckardt, K. U. *et al.* (2013) 'Evolving importance of kidney disease: From subspecialty to global health burden', *The Lancet*. Elsevier Ltd, 382(9887), pp. 158–169. doi: 10.1016/S0140-6736(13)60439-0.
- Essig, M. *et al.* (2001) 'Mechanical strains induced by tubular flow affect the phenotype of proximal tubular cells', *Am J Physiol Renal Physiol*, 281(4), pp. F751–762. Available at: <http://ajprenal.physiology.org/content/281/4/F751>.
- Essig, M. and Friedlander, G. (2003) 'Tubular Shear Stress and Phenotype of Renal Proximal Tubular Cells', *Journal of the American Society of Nephrology*. American Society of Nephrology, 14(90001), pp. 33S – 35. doi: 10.1097/01.ASN.0000067650.43083.DF.
- Faria, J. *et al.* (2019) 'Kidney-based in vitro models for drug-induced toxicity testing', *Archives of Toxicology*. Springer Berlin Heidelberg, 93(12), pp. 3397–3418. doi: 10.1007/s00204-019-02598-0.
- Fedecostante, M. *et al.* (2018) 'Recellularized native kidney scaffolds as a novel tool in nephrotoxicity screening s', *Drug Metabolism and Disposition*, 46(9), pp. 1338–1350. doi: 10.1124/dmd.118.080721.
- Ferrell, N. *et al.* (2018) 'Orbital Shear Stress Regulates Differentiation and Barrier Function of Primary Renal Tubular Epithelial Cells', pp. 12–14. doi: 10.1097/MAT.0000000000000723.
- Figliuzzi, M., Bonandrini, B. and Remuzzi, A. (2017) 'Decellularized kidney matrix as functional material for whole organ tissue engineering', *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials*. Wichtig Publishing Srl, pp. e326–e333. doi: 10.5301/jabfm.5000393.
- Fomby, P. *et al.* (2010) 'Self-assembly of renal cells into engineered renal tissues in

8. Bibliografija

collagen/matrigel scaffold in vitro', *Annals of the American Thoracic Society*, 12(3), pp. 181–204. doi: 10.1002/term.

Forino, M. *et al.* (2006) 'TGF β 1 induces epithelial-mesenchymal transition, but not myofibroblast transdifferentiation of human kidney tubular epithelial cells in primary culture', *International Journal of Experimental Pathology*. Wiley-Blackwell, 87(3), pp. 197–208. doi: 10.1111/j.1365-2613.2006.00479.x.

Fuchs, T. C. and Hewitt, P. (2011) 'Biomarkers for drug-induced renal damage and nephrotoxicity-an overview for applied toxicology', *The AAPS journal*. AAPS J, 13(4), pp. 615–631. doi: 10.1208/S12248-011-9301-X.

Gao, X. *et al.* (2011) 'Basic structure and cell culture condition of a bioartificial renal tubule on chip towards a cell-based separation microdevice', *Analytical Sciences*. Japan Society for Analytical Chemistry, 27(9), pp. 907–912. doi: 10.2116/analsci.27.907.

Garreta, E. *et al.* (2019) 'Fine tuning the extracellular environment accelerates the derivation of kidney organoids from human pluripotent stem cells', *Nature Materials*, 18(4), pp. 397–405. doi: 10.1038/s41563-019-0287-6.

Gencturk, E., Mutlu, S. and Ulgen, K. O. (2017) 'Advances in microfluidic devices made from thermoplastics used in cell biology and analyses', *Biomicrofluidics*. American Institute of Physics, 11(5). doi: 10.1063/1.4998604.

Ghosh, S. (2019) 'Cisplatin: The first metal based anticancer drug', *Bioorganic chemistry*. Bioorg Chem, 88. doi: 10.1016/J.BIOORG.2019.102925.

Gijzen, V. M. G. J. *et al.* (2012) 'Tacrolimus-induced nephrotoxicity and genetic variability: A review', *Annals of Transplantation*, 17(2), pp. 111–121. doi: 10.12659/aot.883229.

Hall, A. M., Polesel, M. and Berquez, M. (2021) 'The proximal tubule, protein uptake, and the riddle of the segments', *Hall, Andrew M; Polesel, Marcello; Berquez, Marine (2021). The proximal tubule, protein uptake, and the riddle of the segments. Kidney International, 99(4):803-805. Elsevier, 99(4), pp. 803–805. doi: 10.1016/J.KINT.2020.12.031.*

Handorf, A. M. *et al.* (2015) 'Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression', *Organogenesis*. Taylor and Francis Inc., pp. 1–15. doi: 10.1080/15476278.2015.1019687.

Hiraki, H. L. *et al.* (2018) 'Fabricating a Kidney Cortex Extracellular Matrix-Derived Hydrogel', *Journal of visualized experiments : JoVE*. NLM (Medline), (140), p. e58314. doi: 10.3791/58314.

Hirashima, T., Hoshuyama, M. and Adachi, T. (2017) 'In vitro tubulogenesis of Madin–Darby canine kidney (MDCK) spheroids occurs depending on constituent cell number and scaffold gel concentration', *Journal of Theoretical Biology*. Academic Press, 435, pp. 110–115. doi: 10.1016/j.jtbi.2017.09.009.

Holechek, M. J. (2003) 'Glomerular filtration: an overview', *Nephrology nursing journal : journal of the American Nephrology Nurses' Association*. Nephrol Nurs J, 30(3). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12861896/> (Accessed: 7 September 2022).

Homan, K. A. *et al.* (2016) 'Bioprinting of 3D Convolutated Renal Proximal Tubules on

8. Bibliografija

Perfusable Chips', *Scientific Reports*. doi: 10.1038/srep34845.

Homan, K. A. *et al.* (2019) 'Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro', *Nature Methods*. Springer US, 16(3), pp. 255–262. doi: 10.1038/s41592-019-0325-y.

Huh, D. *et al.* (2010) 'Reconstituting organ-level lung functions on a chip', *Science*, 328(5986), pp. 1662–1668. doi: 10.1126/science.1188302.

Hulshof, F. *et al.* (2018) 'New insights into the effects of biomaterial chemistry and topography on the morphology of kidney epithelial cells', *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(2), pp. e817–e827. doi: 10.1002/term.2387.

Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group (2012) 'KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury', *Kidney International Supplements*, 42(1), pp. 1–138. doi: 10.3810/hp.2014.02.1086.

Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group (2014) 'KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease', *Kidney International Supplements*, 19(1), pp. 1–150. doi: 10.3182/20140824-6-za-1003.01333.

Ivanyuk, A. *et al.* (2017) 'Renal Drug Transporters and Drug Interactions', *Clinical Pharmacokinetics*, 56(8), pp. 825–892. doi: 10.1007/s40262-017-0506-8.

Jang, K. J. *et al.* (2013) 'Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment', *Integrative Biology (United Kingdom)*, 5(9), pp. 1119–1129. doi: 10.1039/c3ib40049b.

Jang, K. J. and Suh, K. Y. (2010) 'A multi-layer microfluidic device for efficient culture and analysis of renal tubular cells', *Lab on a chip*. Lab Chip, 10(1), pp. 36–42. doi: 10.1039/B907515A.

Jarad, G. and Miner, J. H. (2009) 'Update on the glomerular filtration barrier', *Current opinion in nephrology and hypertension*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 18(3), pp. 226–232. doi: 10.1097/MNH.0B013E3283296044.

Joraku, A. *et al.* (2009) 'In vitro generation of three-dimensional renal structures', *Methods*, 47(2), pp. 129–133. doi: 10.1016/j.jymeth.2008.09.005.

Jun, D. Y. *et al.* (2018) 'Tubular organotypic culture model of human kidney', *PLoS ONE*, 13(10), pp. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0206447.

Junqueira, L. . and Carneiro, J. (2015) *Histología básica*. 12^o. México, D.F.: Editorial Médica Panamericana.

Kang, H. M. *et al.* (2019) 'Effective reconstruction of functional organotypic kidney spheroid for in vitro nephrotoxicity studies', *Scientific Reports*. Nature Research, 9(1). doi: 10.1038/s41598-019-53855-2.

Karihaloo, A., Nickel, C. and Cantley, L. G. (2005) 'Signals which build a tubule.', *Nephron. Experimental nephrology*, pp. e40-5. doi: 10.1159/000084111.

Kher, R. *et al.* (2011) 'Ectopic expression of cadherin 8 is sufficient to cause cyst formation in a novel 3D collagen matrix renal tubule culture', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 301(1), pp. C99–C105. doi: 10.1152/ajpcell.00151.2010.

8. Bibliografija

- Kim, D. H. *et al.* (2012) 'Matrix nanotopography as a regulator of cell function', *Journal of Cell Biology*, 197(3), pp. 351–360. doi: 10.1083/jcb.201108062.
- Kimura, H., Sakai, Y. and Fujii, T. (2018) 'Organ/body-on-a-chip based on microfluidic technology for drug discovery', *Drug metabolism and pharmacokinetics*. Drug Metab Pharmacokinet, 33(1), pp. 43–48. doi: 10.1016/J.DMPK.2017.11.003.
- King, S. M. *et al.* (2017) '3D Proximal Tubule Tissues Recapitulate Key Aspects of Renal Physiology to Enable Nephrotoxicity Testing', *Frontiers in physiology*. Frontiers Research Foundation, 8(MAR), p. 123. doi: 10.3389/fphys.2017.00123.
- Kleinman, H. K. and Martin, G. R. (2005) *Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity*, *Seminars in Cancer Biology*. Academic Press. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.05.004.
- Latcha, S. *et al.* (2016) 'Long-term renal outcomes after cisplatin treatment', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. American Society of Nephrology, 11(7), pp. 1173–1179. doi: 10.2215/CJN.08070715.
- Lin, N. Y. C. *et al.* (2019) 'Renal reabsorption in 3D vascularized proximal tubule models', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(12), pp. 5399–5404. doi: 10.1073/pnas.1815208116.
- Long, K. R. *et al.* (2017) 'Proximal tubule apical endocytosis is modulated by fluid shear stress via an mTOR-dependent pathway', *Molecular Biology of the Cell*. American Society for Cell Biology, 28(19), p. 2508. doi: 10.1091/MBC.E17-04-0211.
- Maggiorani, D. *et al.* (2015) 'Shear stress-induced alteration of epithelial organization in human renal tubular cells', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 10(7). doi: 10.1371/journal.pone.0131416.
- Małyszko, Jolanta *et al.* (2017) 'Nephrotoxicity of anticancer treatment', *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. Nephrol Dial Transplant, 32(6), pp. 924–936. doi: 10.1093/NDT/GFW338.
- Matsushita, K. *et al.* (2010) 'Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis', *The Lancet*. Elsevier Ltd, 375(9731), pp. 2073–2081. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60674-5.
- Mehling, M. and Tay, S. (2014) 'Microfluidic cell culture', *Current Opinion in Biotechnology*, 25, pp. 95–102. doi: 10.1016/j.copbio.2013.10.005.
- Van Midwoud, P. M. *et al.* (2012) 'Comparison of biocompatibility and adsorption properties of different plastics for advanced microfluidic cell and tissue culture models', *Analytical chemistry*. Anal Chem, 84(9), pp. 3938–3944. doi: 10.1021/AC300771Z.
- Miyoshi, T. *et al.* (2019) 'Kidney organoids in translational medicine: Disease modeling and regenerative medicine', *Developmental Dynamics*, (March), pp. 1–12. doi: 10.1002/dvdy.22.
- Montesano, R. *et al.* (1991) 'Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor', *Cell*, 67(5), pp. 901–908. doi: 10.1016/0092-8674(91)90363-4.

8. Bibliografija

Montesano, R., Schaller, G. and Orci, L. (1991) 'Induction of epithelial tubular morphogenesis in vitro by fibroblast-derived soluble factors.', *Cell*, 66(4), pp. 697–711. doi: 10.1016/0092-8674(91)90115-f.

Musso, C. G. *et al.* (2016) 'Glomerular filtration rate equations: a comprehensive review', *International urology and nephrology*. *Int Urol Nephrol*, 48(7), pp. 1105–1110. doi: 10.1007/S11255-016-1276-1.

Narayanan, K. *et al.* (2013) 'Human embryonic stem cells differentiate into functional renal proximal tubular-like cells', *Kidney International*. Nature Publishing Group, 83(4), pp. 593–603. doi: 10.1038/ki.2012.442.

Nunes, P. S. *et al.* (2010) 'Cyclic olefin polymers: Emerging materials for lab-on-a-chip applications', *Microfluidics and Nanofluidics*. Springer, 9(2–3), pp. 145–161. doi: 10.1007/S10404-010-0605-4/FIGURES/7.

Nur-E-Kamal, A. *et al.* (2006) 'Three-Dimensional Nanofibrillar Surfaces Promote Self-Renewal in Mouse Embryonic Stem Cells', *Stem Cells*. Wiley, 24(2), pp. 426–433. doi: 10.1634/stemcells.2005-0170.

Otero, J., Navajas, D. and Alcaraz, J. (2020) *Characterization of the elastic properties of extracellular matrix models by atomic force microscopy*. 1st edn, *Methods in Cell Biology*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.mcb.2019.11.016.

Paoli, R. and Samitier, J. (2016) 'Mimicking the Kidney: A Key Role in Organ-on-Chip Development', *Micromachines*. *Micromachines* (Basel), 7(7). doi: 10.3390/MI7070126.

Pashley, S. (1999) 'Wallace MA. Anatomy and physiology of the kidney. *AORN journal*. 1998 Nov 1;68(5):799-820.', 68(5).

Pati, F. and Cho, D. W. (2017) 'Bioprinting of 3D tissue models using decellularized extracellular matrix bioink', *Methods in Molecular Biology*, 1612, pp. 381–390. doi: 10.1007/978-1-4939-7021-6_27.

Perazella, M. A. (2018) 'Pharmacology behind common drug nephrotoxicities', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 13(12), pp. 1897–1908. doi: 10.2215/CJN.00150118.

Perazella, M. A. and Moeckel, G. W. (2010) 'Nephrotoxicity from chemotherapeutic agents: Clinical manifestations, pathobiology, and prevention/therapy', *Seminars in Nephrology*. Elsevier Inc., 30(6), pp. 570–581. doi: 10.1016/j.semnephrol.2010.09.005.

Petkau-Milroy, K. and Brunsveld, L. (2013) 'Supramolecular chemical biology; Bioactive synthetic self-assemblies', *Organic and Biomolecular Chemistry*, 11(2), pp. 219–232. doi: 10.1039/c2ob26790j.

Preuss, H. G. (1993) 'Basics of renal anatomy and physiology', *Clinics in Laboratory Medicine*, pp. 1–11. doi: 10.1016/s0272-2712(18)30456-6.

Qu, Y. *et al.* (2018) 'A nephron model for study of drug-induced acute kidney injury and assessment of drug-induced nephrotoxicity', *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 155, pp. 41–53. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.11.010.

Racusen, L. C. and Solez, K. (1986) 'Nephrotoxic tubular and interstitial lesions: Morphology and classification', *Toxicologic Pathology*, 14(1), pp. 45–57. doi:

8. Bibliografija

10.1177/019262338601400106.

Reidy, K. J. and Rosenblum, N. D. (2009) 'Cell and Molecular Biology of Kidney Development', *Seminars in Nephrology*, 29(4), pp. 321–337. doi: 10.1016/j.semnephrol.2009.03.009.

Ren, K., Zhou, J. and Wu, H. (2013) 'Materials for microfluidic chip fabrication', *Accounts of chemical research*. Acc Chem Res, 46(11), pp. 2396–2406. doi: 10.1021/AR300314S.

Rodríguez-Fraticelli, A. E. *et al.* (2015) 'Developmental regulation of apical endocytosis controls epithelial patterning in vertebrate tubular organs', *Nature Cell Biology*, 17(3), pp. 241–250. doi: 10.1038/ncb3106.

Ross, E. J. *et al.* (2021) 'Three dimensional modeling of biologically relevant fluid shear stress in human renal tubule cells mimics in vivo transcriptional profiles', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 11(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-021-93570-5.

Sackmann, E. K., Fulton, A. L. and Beebe, D. J. (2014) 'The present and future role of microfluidics in biomedical research', *Nature*. Nature, 507(7491), pp. 181–189. doi: 10.1038/NATURE13118.

Sakurai, H. *et al.* (1997) 'An in vitro tubulogenesis system using cell lines derived from the embryonic kidney shows dependence on multiple soluble growth factors', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(12), pp. 6279–6284. doi: 10.1073/pnas.94.12.6279.

Santos, M. L. C. *et al.* (2020) 'Nephrotoxicity in cancer treatment: An overview', *World Journal of Clinical Oncology*. Baishideng Publishing Group Inc., 11(4), pp. 190–204. doi: 10.5306/wjco.v11.i4.190.

Schlüter, M. A. and Margolis, B. (2009) 'Apical lumen formation in renal epithelia', *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(7), pp. 1444–1452. doi: 10.1681/ASN.2008090949.

Schmittgen, T. D. and Livak, K. J. (2008) 'Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method', *Nature Protocols*, 3(6), pp. 1101–1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73.

Secker, P. F. *et al.* (2017) 'RPTEC/TERT1 cells form highly differentiated tubules when cultured in a 3D matrix', *Altex*, 35(2), pp. 1–12. doi: 10.14573/altex.1710181.

Secker, P. F. *et al.* (2019) 'Functional transepithelial transport measurements to detect nephrotoxicity in vitro using the RPTEC / TERT1 cell line', *Archives of Toxicology*. Springer Verlag, 93(7), pp. 1965–1978. doi: 10.1007/s00204-019-02469-8.

Shamir, E. R. and Ewald, A. J. (2014) 'Three-dimensional organotypic culture: Experimental models of mammalian biology and disease', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 15(10), pp. 647–664. doi: 10.1038/nrm3873.

Singh, N. K. *et al.* (2020) 'Biomaterials Three-dimensional cell-printing of advanced renal tubular tissue analogue', *Biomaterials*. Elsevier, 232(June 2019), p. 119734. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119734.

Skorecki, Karl; Chertox, Glenn M.; Mardsen, Philip A; Taal, Maarten W; Yu, A. S. (2016) *Brenner and Rector's The Kidney*. 10^o. Elsevier.

8. Bibliografija

Sobreiro-Almeida, R. *et al.* (2020) 'Co-cultures of renal progenitors and endothelial cells on kidney decellularized matrices replicate the renal tubular environment in vitro', *Acta Physiologica*, 230(1), pp. 1–14. doi: 10.1111/apha.13491.

Song, J. J. *et al.* (2013) 'Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney', *Nature Medicine*. NIH Public Access, 19(5), pp. 646–651. doi: 10.1038/nm.3154.

Subramanian, B. *et al.* (2010) 'Tissue-engineered three-dimensional in vitro models for normal and diseased kidney', *Tissue Engineering - Part A*. Mary Ann Liebert Inc., 16(9), pp. 2821–2831. doi: 10.1089/ten.tea.2009.0595.

Subramanian, B. *et al.* (2012) 'The regulation of cystogenesis in a tissue engineered kidney disease system by abnormal matrix interactions', *Biomaterials*, 33(33), pp. 8383–8394. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.08.020.

Takasato, M. *et al.* (2019) 'Generating kidney organoids from human pluripotent stem cells', *Physiology & behavior*, 176(3), pp. 139–148. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.

Taub, M. *et al.* (1990) 'Epidermal growth factor or transforming growth factor α is required for kidney tubulogenesis in matrigel cultures in serum-free medium', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 87(10), pp. 4002–4006. doi: 10.1073/pnas.87.10.4002.

Townsend, D. M. *et al.* (2003) 'Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells', *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(1), pp. 1–10. doi: 10.1097/01.ASN.0000042803.28024.92.

Tröndle, K. *et al.* (2019) 'Bioprinting of high cell-density constructs leads to controlled lumen formation with self-assembly of endothelial cells', *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(10), pp. 1883–1895. doi: 10.1002/term.2939.

Ullah, I. *et al.* (2020) 'Adult Tissue Extracellular Matrix Determines Tissue Specification of Human iPSC-Derived Embryonic Stage Mesodermal Precursor Cells', *Advanced Science*. John Wiley and Sons Inc., 7(5). doi: 10.1002/adv.201901198.

Vedula, E. M. *et al.* (2017) 'A microfluidic renal proximal tubule with active reabsorptive function', *PLoS ONE*, 12(10), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0184330.

Vormann, M. K. *et al.* (2018) 'Nephrotoxicity and Kidney Transport Assessment on 3D Perfused Proximal Tubules', *The AAPS Journal*. Springer International Publishing, 20(5), p. 90. doi: 10.1208/s12248-018-0248-z.

Vriend, J. *et al.* (2020) 'Flow stimulates drug transport in a human kidney proximal tubule-on-a-chip independent of primary cilia', *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. Elsevier B.V., 1864(1), p. 129433. doi: 10.1016/j.bbagen.2019.129433.

Wang, X. *et al.* (2019) 'Developing a self-organized tubulogenesis model of human renal proximal tubular epithelial cells in vitro', *Journal of biomedical materials research*, 108(3), pp. 795–804. doi: 10.1002/jbm.a.36858.

Wargo, K. A. and Edwards, J. D. (2014) 'Aminoglycoside-induced nephrotoxicity', *Journal of pharmacy practice*. J Pharm Pract, 27(6), pp. 573–577. doi: 10.1177/0897190014546836.

8. Bibliografija

- Weber, H. M. M. *et al.* (2017) 'Heparin-based hydrogels induce human renal tubulogenesis in vitro', *Acta Biomaterialia*. *Acta Biomater*, 57, pp. 1–31. doi: 10.1016/j.actbio.2017.05.035.
- Whitesides, G. M. (2006) 'The origins and the future of microfluidics.', *Nature*, 442(7101), pp. 368–73. doi: 10.1038/nature05058.
- Wu, H. and Huang, J. (2018) 'Drug-Induced Nephrotoxicity: Pathogenic Mechanisms, Biomarkers and Prevention Strategies', *Current Drug Metabolism*, 19(7), pp. 559–567. doi: 10.2174/1389200218666171108154419.
- Xia, Y. *et al.* (2013) 'Directed Differentiation of Human Pluripotent Cells to Ureteric Bud Kidney Progenitor-Like Cells', *Nature Cell Biology*. Nature Publishing Group, 15(12), pp. 1507–1515. doi: 10.1038/ncb2872.
- Zegers, M. M. P. *et al.* (2003) 'Epithelial polarity and tubulogenesis in vitro.', *Trends in cell biology*, 13(4), pp. 169–76. doi: 10.1016/s0962-8924(03)00036-9.
- Zhang, B. *et al.* (2018) 'Advances in organ-on-a-chip engineering', *Nature Reviews Materials*. Springer US, 3(8), pp. 257–278. doi: 10.1038/s41578-018-0034-7.
- Zhang, H. *et al.* (2009) 'The impact of extracellular matrix coatings on the performance of human renal cells applied in bioartificial kidneys', *Biomaterials*, 30(15), pp. 2899–2911. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.046.
- Zhang, H. *et al.* (2011) 'Generation of easily accessible human kidney tubules on two-dimensional surfaces in vitro', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(6), pp. 1287–1298. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01113.x.
- Zhuo, J. L. and Li, X. C. (2013) 'Proximal Nephron', *Comprehensive Physiology*. NIH Public Access, 3(3), p. 1079. doi: 10.1002/CPHY.C110061.