



Universidad
Zaragoza

Ensayos de nefrotoxicidad en condiciones de shear stress

Trabajo Fin de Grado

Autor

FERNANDO RUIZ TORRUBIA

Directores

IGNACIO GIMÉNEZ LÓPEZ

PATRICIA MEADE HUERTA

Departamento de Farmacología y
Fisiología

Departamento de Bioquímica y
Biología Celular y Molecular

Grado en Biotecnología

Curso 2016-2017

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Fisiología del túbulo proximal	3
2.2 Necesidad de establecer un modelo <i>in vitro</i> que incluya flujo luminal	3
2.3 Flujo laminar y <i>shear stress</i>	4
2.3.1 El papel del <i>shear stress</i> en la regulación de procesos in vivo	5
2.4 Cisplatino	7
2.5 Nefrotoxicidad	7
2.5.1 Apoptosis	8
2.5.2 Autofagia	8
2.5.3 Otras rutas	8
2.6 Antecedentes	9
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO	10
4. OBJETIVOS	10
5. MATERIALES Y MÉTODOS	11
5.1 Línea celular	11
5.2 Medios de cultivo y reactivos	11
5.3 Características del dispositivo fluídico	11
5.4 Siembra del μ Slide	12
5.5 Sistema de flujo	12
5.6 Tratamiento con cisplatino	13
5.7 Ensayo de nefrotoxicidad	14
5.8 Diseño del experimento	15
6. RESULTADOS	16
6.1 Efectos del cisplatino en las células cultivadas en placas de 96 pocillos.	16
6.2 Efectos del cisplatino en las células cultivadas en μ Slide sin perfusión	18
6.3 Efectos del cisplatino en las células cultivadas en μ Slide con flujo.	19
7. DISCUSIÓN	23
8. CONCLUSIONES	24
9. BIBLIOGRAFÍA	25

1. RESUMEN

La nefrotoxicidad es uno de los efectos adversos que se producen más frecuentemente durante el desarrollo de fármacos. La falta de un modelo eficaz basado en el cultivo celular y la variabilidad de los estudios en animales ha generado la necesidad de desarrollar un modelo para evaluar la nefrotoxicidad *in vitro* de forma efectiva y precisa. En este proyecto se testará un modelo de nefrotoxicidad en el túbulo proximal basado en cisplatino. Se parte de la hipótesis de que la viabilidad de las células epiteliales de túbulo proximal aumentará tras el tratamiento con cisplatino si antes se le expone a flujo laminar que genere *shear stress* sobre la zona apical de dichas células.

Los ensayos de nefrotoxicidad en ausencia de flujo han revelado que se produce una disminución en la viabilidad de las células epiteliales de túbulo proximal tras el tratamiento con cisplatino que parece ser dosis-dependiente. No se ha podido demostrar que el *shear stress* altere la sensibilidad de estas células al cisplatino, ya que las células respondían igual que en ausencia de flujo. Por otra parte se han introducido una mejora en el sistema de flúidica empleado en los ensayos; la utilización de conectores verticales en lugar de los acodados.

ABSTRACT

Nephrotoxicity is one of the most common adverse events reported during drug development. The lack of accurate predictive cell culture models and the unreliability of animal studies have created a need for better approaches to evaluate nephrotoxicity *in vitro*. In this project a nephrotoxicity model of the proximal tubule based on cisplatin will be tested. The initial hypothesis is that epithelial cells from the proximal tubule viability will rise after cisplatin treatment if they are exposed to laminar flow which generates shear stress on the luminal surface previously.

Static nephrotoxicity assays reveal that a drop of the cells viability appears after cisplatin treatment and that it seems to be dose-dependant. However, it couldn't be proved that shear stress affects to the sensibility of those cells towards cisplatin, provided that cells response to cisplatin was the same as in the static assay. Moreover, there has been introduce dan improvement in the fluidic device; the use of vertical connectors instead of elbow connectors.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Fisiología del túbulo proximal

El túbulo renal es una de las dos partes que conforman la nefrona, que es la unidad funcional y estructural del riñón. Además del túbulo se encuentra el corpúsculo renal, que es donde se produce la filtración de la sangre, y que está compuesto por el glomérulo y la cápsula de Bowman. El túbulo renal se divide a su vez en cuatro partes; el túbulo proximal, el asa de Henle, el túbulo distal y el túbulo colector. Su función es la conversión del ultrafiltrado en orina mediante la reabsorción y la secreción de agua, iones y pequeños metabolitos.

La sangre entra en los riñones a través de la arteria renal, y al llegar a los glomérulos el plasma se filtra a través de los podocitos generándose el ultrafiltrado, que entra en el lumen del túbulo proximal. Las células epiteliales del túbulo proximal son responsables de la reabsorción de hasta el 70% del Na^+ , K^+ , H^+ , NH_4^+ , Cl^- , HCO_3^- , P_i , glucosa y agua del ultrafiltrado. Este proceso se puede dar mediante transporte transcelular, para lo que tienen numerosos transportadores, o paracelular. Además tienen receptores multiligando que intervienen en la reabsorción de proteínas de bajo peso molecular que se han filtrado para impedir que se eliminen por la orina. Estas células están muy polarizadas, presentan un borde en cepillo en la parte luminal, recubierto por un glicocáliz y también presentan cilios. En su membrana lateral tienen uniones estrechas, adherentes y GAP, que cohesionan el tejido e impiden el paso de grandes moléculas. Además presentan integrinas que median la adhesión de las células a la lámina basal. Se disponen formando un epitelio simple que tapiza la totalidad del túbulo proximal. [1]–[4]

2.2 Necesidad de establecer un modelo *in vitro* que incluya flujo luminal

La dificultad a la hora de realizar ensayos *in vitro* con células del túbulo proximal radica en recrear el ambiente en el que se encuentran *in vivo*, ya que al situarse orientadas al lumen de un conducto por el que pasa un líquido están continuamente expuestas a flujo. El flujo es un mecanismo regulador *in vivo* y las células responden a variaciones del mismo modulando el transporte iónico y la función endocítica para mantener el balance glomerular. El flujo afecta a estas células de dos maneras. Por una parte existe un componente que es consecuencia del movimiento de avance del líquido y que ejerce una fuerza paralela a la superficie del túbulo. Esta fuerza es detectada por mecanorreceptores, estructuras que se curvan por la fuerza que ejerce el flujo y transforman este curvado en una señal intracelular. Por otra parte el flujo también ejerce presión sobre las paredes del túbulo, que se dilatan. Esta dilatación puede regular otros procesos en las células del túbulo proximal como la transcripción génica, la reorganización del citoesqueleto, el volumen celular y rutas de señalización de calcio. Las estructuras encargadas de transducir esta señal son las integrinas, las uniones GAP y los canales de calcio basolaterales activados por tensión.[1], [5], [6]

Aunque existen sistemas que permiten reproducir estas condiciones aún existen algunas limitaciones, como el hecho de que las células del túbulo proximal que se utilizan para los estudios con flujo normalmente carecen de la alta diferenciación que tienen las células *in vivo*.

Además deben ser cultivadas en un soporte artificial que no puede reproducir con exactitud las condiciones de la membrana basal.[1]

2.3 Flujo laminar y *shear stress*

El *shear stress* o tensión de cizallamiento se define como el componente de la tensión que está en el mismo plano que la superficie de un material. Aparece como consecuencia de la aplicación de una fuerza paralela a la superficie de un material sobre esta superficie. Esto conlleva la aparición de una segunda fuerza con la misma dirección que la primera pero sentido opuesto, lo que origina tensión en la superficie del material, el *shear stress*. [7]

En los sistemas de fluídica se produce el movimiento de un medio líquido sobre un medio sólido. Como estos sistemas no son ideales ambos medios interactúan y el medio sólido ejerce una fuerza de rozamiento sobre el líquido con la misma dirección que el movimiento del fluido pero sentido opuesto. La inercia que tiene el líquido al moverse impide que se detenga completamente y origina una fuerza de sentido contrario a la de rozamiento. Se genera por lo tanto un sistema de fuerzas opuestas y paralelas a la superficie del material, que son los requisitos para producir el *shear stress*.

Sin embargo no en todos los sistemas de fluídica se produce *shear stress*. Como hemos visto una condición indispensable para que aparezca es que el movimiento del fluido sea paralelo a la superficie del material, ya que si no aparecería un componente normal de tensión. Hay dos tipos de flujo, el flujo turbulento y el flujo laminar (*Figura 1*); en el primero el movimiento de las partículas que componen el fluido es caótico, éstas se mueven de forma desordenada y sus trayectorias forman remolinos periódicos no coordinados. Por otra parte, en el flujo laminar las partículas siguen trayectorias rectas llamadas líneas de corriente y el fluido se mueve en láminas paralelas sin entremezclarse y sin producirse transporte lateral excepto a escala molecular. [7], [8]

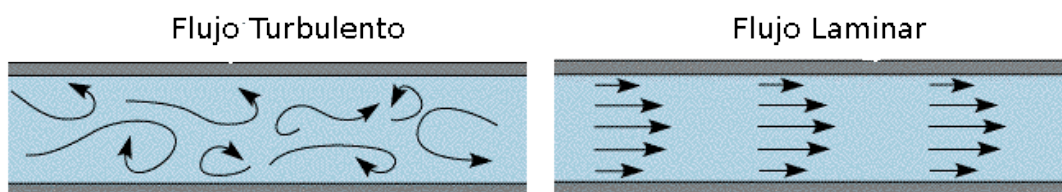


Figura 1. En el flujo turbulento las partículas siguen trayectorias caóticas que forman remolinos, en cambio en el flujo laminar las trayectorias del líquido son rectas y paralelas entre sí.

El *shear stress* sólo puede darse en condiciones de flujo laminar ya que en un flujo turbulento el movimiento del líquido hace que la fuerza que ejerce el líquido sobre el sólido estático no sea paralela a su superficie.

Este tipo de flujo es característico de fluidos a velocidades bajas o viscosidades altas. El régimen de flujo depende de la viscosidad del fluido, su densidad, la velocidad a la que avanza

y el diámetro del conducto por el que pasa. Todos estos factores se engloban en el número adimensional de Reynolds (Re) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Re} = \frac{\rho \cdot D \cdot \bar{u}}{\mu}$$

Siendo ρ la densidad del fluido, \bar{u} la velocidad de movimiento, D el diámetro del tubo y μ la viscosidad del fluido. Si el Re es inferior a 2100 el sistema actúa en régimen de flujo laminar, y si es superior en régimen turbulento.[7], [8]

2.3.1 El papel del *shear stress* en la regulación de procesos in vivo

En un organismo animal existen diferentes estructuras que se comportan como sistemas de fluídica y que permiten el paso de medios líquidos a través de los tejidos. Estas estructuras, a diferencia de los tubos vistos anteriormente, son tejidos vivos y se comportan de forma diferente. Su principal característica es que son conductos dinámicos y no rígidos, ya que pueden ser regulados para el control de la función fisiológica. Existen diferentes mecanismos reguladores, entre los que se incluye la respuesta al *shear stress*.

El *shear stress* que se produce en sistemas vivos no es constante, ya que al ser dependiente del flujo varía en función de los cambios que se producen en este. Las células que están en contacto con el líquido en movimiento detectan estas variaciones y transducen hacia su interior una señal de respuesta, que acaba provocando un cambio en la expresión génica, en el citoesqueleto o en la actividad de algunas proteínas. Mediante este mecanismo los tejidos que conforman los conductos pueden regular su comportamiento para adaptarlo a las condiciones del flujo y garantizar la correcta función del organismo.

Estos conductos aparecen en casi todos los aparatos del organismo, pueden ser vasos sanguíneos, conductos secretores, vasos linfáticos, conductos respiratorios o del aparato digestivo u otros. Este trabajo se centra en los túbulos del aparato excretor, y concretamente en el túbulo proximal.

El ultrafiltrado procedente de la cápsula de Bowman entra en el túbulo proximal. Este flujo de entrada es variable, con oscilaciones debidas a la frecuencia cardíaca y al feedback tubuloglomerular, que regula la tasa de filtración glomerular. El flujo a través del túbulo proximal genera *shear stress* sobre las células epiteliales, y cambios en el flujo conllevan cambios en el *shear stress* que pueden ser detectados por estas células mediante diferentes mecanorreceptores, receptores especializados en la detección de señales mecánicas, que inician una cascada de señalización para producir la respuesta celular. Las células epiteliales del túbulo proximal tienen tres estructuras que pueden actuar como mecanorreceptores; las microvellosidades, el glicocáliz y los cilios (*Figura 2*). [1]

Las microvellosidades tienen 25-35 filamentos de actina dispuestos en forma de haces y entrecruzados con filamentos de fimbrina, vilina y espina. Estos filamentos están integrados en una matriz de actina que traduce y amplifica cambios en el curvado de las microvellosidades

en señales intracelulares que regulan el transporte iónico, la reorganización del citoesqueleto, la expresión génica y la distribución de los endosomas de reciclaje apicales (ARE).[9]

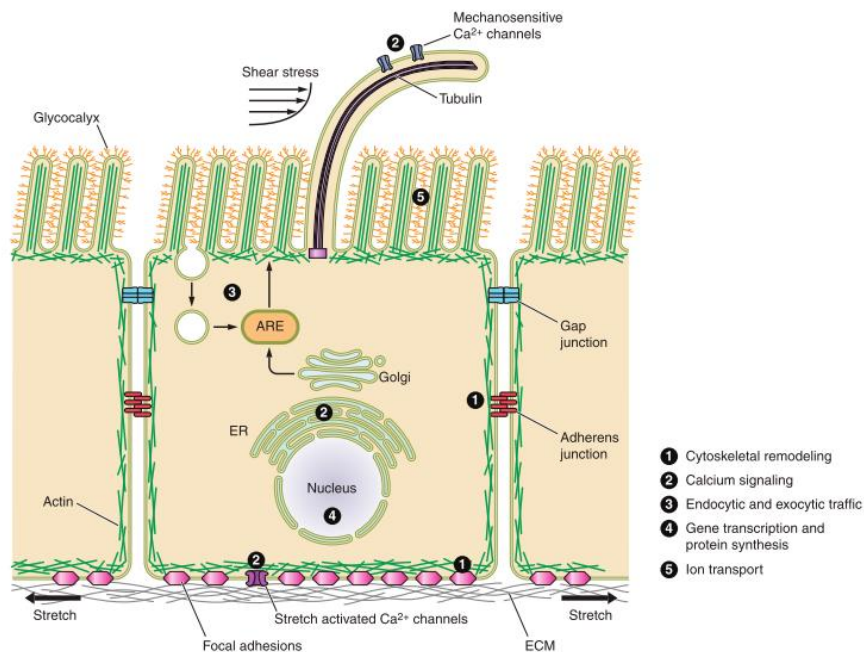


Figura 2. Estructura de los mecanorreceptores de las células epiteliales del túbulo proximal. Estos receptores se sitúan en la zona apical de las células, expuestos al lumen del túbulo por donde circula el fluido, de forma que se vean afectados por el shear stress.

El glicocálix juega un papel fundamental en la percepción del shear stress en el endotelio vascular, ya que está conectado al citoesqueleto y transduce su movimiento de curvado para modular la función de la célula endotelial. Sin embargo su papel en el túbulo proximal aún no ha sido determinado. Al ser una estructura irregular que tapiza la superficie de la célula podría incrementar los efectos fisiológicos del flujo en las células epiteliales al incrementar el coeficiente de fricción.[1]

Además las células del túbulo proximal aumentan su capacidad endocítica como respuesta al shear stress. Para que ésta respuesta se produzca es imprescindible que las células tengan cilios. En otros tejidos los transportadores de cationes situados en los cilios disparan la respuesta al curvado de los cilios, aunque su papel en el túbulo proximal aún no ha sido determinado.[10]

Además de intervenir en la regulación habitual el shear stress tiene un papel importante en el desarrollo de las enfermedades crónicas de riñón. En la mayoría de estas enfermedades el flujo que recorre los túbulos se ve alterado, bien por una obstrucción, por la reducción de la masa renal o porque cambia la viscosidad fluido. En estas condiciones el shear stress cambia y como consecuencia se altera la estructura del citoesqueleto y del borde en cepillo de las células del túbulo proximal. Esto altera varias funciones celulares, entre las que se incluyen la

reabsorción de solutos y la remodelación de la matriz externa, factores que son característicos y comunes de muchas de las enfermedades crónicas de riñón.[11]

2.4 Cisplatino

El cisplatino o cis-diamminedichloroplatinum(II) (CDDP) es un medicamento quimioterápico basado en platino utilizado para tratar diversos tipos de cáncer, entre los que se encuentran sarcomas, algunos carcinomas, linfomas y tumores de las células germinales. Fue el primer compuesto basado en platino que se utilizó, aunque en la actualidad existen otros como el carboplatino y el oxaliplatino. Molecularmente está compuesto por un átomo de platino central al que se unen dos grupos amino y dos cloro (*Figura 3*). La presencia de los grupos cloro, altamente reactivos, le permite unirse a varias moléculas de forma simultánea y es imprescindible para su función.

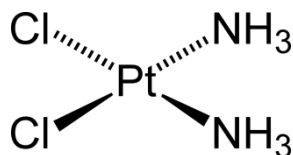


Figura 3. Estructura de la molécula de cisplatino. El átomo de platino está unido a dos átomos de cloro que se sitúan en cis y dos grupos amino.

Tras administrarse, el CDDP entra en las células diana y tiene dos mecanismos de acción. Por una parte actúa como agente alquilante, añadiendo grupos alquilo a bases de DNA. Esto resulta en el corte de la cadena de DNA por enzimas de restricción que intentan reparar las bases alquiladas, e impide la replicación y la transcripción de las cadenas de DNA afectadas. Además puede sufrir una reacción en la que se sustituye uno de sus cloros por una molécula de agua. Este nuevo ligando se desplaza con facilidad, lo que permite al CDDP insertarse en el DNA en un residuo de guanina. Entonces el grupo cloro también es desplazado y se le une un segundo residuo de guanina, que puede ser de la misma molécula de DNA o de otra distinta, y se entrecruzan ambas cadenas. Esto hace que las cadenas no se puedan separar y se detiene la replicación del DNA. Todo esto conlleva el arresto de las células en la fase G2 del ciclo celular.

En cuanto a su ruta de eliminación, al ser una molécula polar de bajo peso molecular, es filtrada en el glomérulo y expulsada en la orina.[12]

2.5 Nefrotoxicidad

Una vez que es filtrado pasa al túbulo proximal. La mayoría del CDDP administrado se acumula en la corteza renal, lo que hace que la concentración en el túbulo proximal sea cinco veces mayor que en el plasma sanguíneo, y ésta elevada concentración contribuye a la nefrotoxicidad. Aproximadamente uno de cada tres pacientes que son tratados con cisplatino desarrollan nefrotoxicidad.[1], [11], [13]

La nefrotoxicidad se debe a cuatro procesos independientes que son causados por el CDDP; daño en el túbulo proximal, estrés oxidativo, inflamación y daño en los vasos del riñón. De éstas la más importante es el daño en el túbulo proximal, que se debe a diferentes mecanismos entre los que se incluyen la apoptosis, la autofagia, la desregulación del ciclo, la activación de la ruta MAPK y daño directo sobre el DNA de las células del túbulo.[11]

2.5.1 Apoptosis

Hay varias rutas descritas que inducen apoptosis, la muerte celular programada. La ruta extrínseca necesita mensajeros proapoptóticos producidos por otras células que activan receptores mortales, que son los que inducen la apoptosis mediante la activación de caspasas. La ruta intrínseca se inicia por daños en la mitocondria, que activan las proteínas Bax y Bak. Éstas inducen la liberación de factores proapoptóticos al citoplasma para iniciar el proceso de muerte celular. La tercera ruta es la del estrés del retículo endoplasmático (RE), donde el iniciador es la caspasa 12. El CDDP induce la activación de las proteínas Bax y activa la caspasa 12, iniciando las rutas apoptóticas intrínseca y de estrés del RE. Además el CDDP activa p53. Esta proteína es activada en respuesta a daños en el DNA producidos por una replicación anómala. Al ser activada detiene el ciclo celular e induce la apoptosis mediante varias rutas distintas. Una de estas rutas está mediada por el factor PUMA, que también puede ser activado directamente por CDDP. Además, según la dosis, el CDDP puede causar apoptosis o necrosis, *in vitro* la necrosis sólo se produce a altas concentraciones pero *in vivo* pueden darse ambos procesos de forma simultánea. A diferencia de la apoptosis, la necrosis se produce por un agente nocivo, que activa mecanismos celulares que afectan a la integridad de la membrana, aumentando su permeabilidad y permitiendo la liberación de compuestos citoplasmáticos al exterior. Estos compuestos inducen una respuesta inmune al salir al exterior, mientras que en la apoptosis esta respuesta no se produce porque los componentes de la célula apoptótica son fagocitados por macrófagos. Ambos procesos comparten algunas rutas de señalización, por lo que un mismo agente citotóxico puede desencadenar ambas respuestas en la misma célula.[1], [14], [15]

2.5.2 Autofagia

La autofagia es un proceso celular en el cual componentes citoplasmáticos son confinados en vesículas autofágicas y llevados a los lisosomas para su degradación. La autofagia está inducida en presencia de CDDP y está considerada como un mecanismo protector, ya que promueve la supervivencia celular y retrasa la apoptosis. Sin embargo la autofagia excesiva o mal regulada puede llevar a la muerte de la célula.[16]

2.5.3 Otras rutas

El CDDP puede actuar sobre otras rutas como la de las MAPK, una cascada de fosforilación entre serín/treonín quinasas que regula la proliferación celular, la diferenciación y la supervivencia. En concreto activa intermediarios de esta ruta, y la inactivación de algunos de estos intermediarios reduce el daño mitocondrial asociado al CDDP.[1]

En presencia de CDDP se reduce la actividad de los receptores activados por el proliferador del peroxisoma (PPARs), que tienen un papel importante en la regulación del metabolismo de lípidos y de glucosa, el crecimiento celular y la diferenciación. Al inactivarse se inhiben los enzimas encargados de la oxidación de los ácidos grasos, lo que hace que éstos se acumulen y lleguen a ser tóxicos para la célula.[17]

2.6 Antecedentes

Inicialmente el papel del flujo en la regulación de la reabsorción en el túbulo proximal se estudió realizando micropunciones directamente en el túbulo de animales vivos, perfundiendo líquido y estudiando los efectos que tenía en la reabsorción. Estos estudios demostraron que la reabsorción de Na^+ , HCO_3^- , K^+ y agua en el túbulo proximal aumentaba de forma proporcional al flujo perfundido. Trabajos posteriores determinaron que la cara apical de las células epiteliales del túbulo proximal detecta cambios en el *shear stress* mediante sus microvellosidades y cilios, y que estas células son capaces de transformar estos estímulos mecánicos en respuestas fisiológicas. Otras investigaciones han demostrado que el *shear stress* afecta principalmente a la organización del citoesqueleto y del borde en cepillo, fenómenos que pueden modificar la reabsorción de solutos.[1], [18]

La nefrotoxicidad es uno de los efectos adversos que se producen más frecuentemente durante el desarrollo de fármacos. La falta de un modelo eficaz basado en el cultivo celular y la variabilidad de los estudios en animales ha generado la necesidad de desarrollar un modelo para evaluar la nefrotoxicidad *in vitro* de forma efectiva y precisa. Este modelo debe reproducir las condiciones a las que se encuentran expuestas las células del túbulo proximal, como la histología del tejido, la composición del medio extracelular o las fuerzas mecánicas a las que se ven sometidas las células. Esto ha llevado al desarrollo de sistemas de cultivo en los que se introduce el efecto del flujo o a la creación de dispositivos del tipo “*organ-on-a-chip*”, que además de perfundir medio simulan la histología del tejido de origen. Otro paso importante es la utilización de cultivos primarios de células humanas en lugar de líneas establecidas, ya que las primeras presentan una mayor diferenciación y son más parecidas a las células de túbulo proximal.[13]

Además se han identificado diferentes proteínas que tienen un papel importante en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino, como los transportadores basolaterales OCT2 y CTR-1, que son importantes para la incorporación de cisplatino del medio, o la enzima GGT1. De ésta enzima no se conoce con certeza su papel en el mecanismo de acción del cisplatino, pero se sabe que se encarga de convertir el cisplatino en una molécula más reactiva. Hasta el momento no se ha probado que la actividad de esta enzima sea regulada por el *shear stress*. [19]

3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

En un modelo de nefrotoxicidad basado en el cisplatino en el que se cultivan células epiteliales de túbulo proximal la viabilidad de éstas aumentará tras el tratamiento con cisplatino si antes se le expone a flujo laminar que genere *shear stress* sobre la zona apical de dichas células.

4. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es testar un modelo de nefrotoxicidad basado en el cultivo de las células de túbulo proximal en un dispositivo fluídico compuesto por canales en cuya base las células crecen formando una monocapa. Este dispositivo permite perfundir medio de cultivo a través de los canales de forma que se genera *shear stress* sobre la superficie del cultivo, lo que producirá alteraciones en el fenotipo de las células que podrán ser observadas y cuantificadas mediante un ensayo de nefrotoxicidad. En este ensayo se evalúa la capacidad de las células para resistir diferentes concentraciones de cisplatino.

Se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Testar un modelo de nefrotoxicidad basado en cisplatino en un cultivo estático de células de túbulo proximal.
2. Comprobar que este modelo funciona de la misma forma en el dispositivo fluídico cuando no se le aplica flujo.
3. Realizar el mismo ensayo sobre células cultivada en dispositivo fluídico y expuestas a flujo luminal y comparar con el resultado obtenido en estático para observar las diferencias.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Línea celular

Se emplea la línea NRK-52E (ATCC® CRL-1571™), compuesta por células epiteliales del túbulo proximal de rata (*Rattus Norvegicus*). Estas células se cultivan en medio compuesto por un 95% de DMEM con L-glutamina y un 5% de suero bovino. Son células adherentes que crecen en monocapa, lo que permite cultivarlas en placas planas y simular el *shear stress* mediante flujo superficial.

Para mantener la línea celular se realizan dos subcultivos cada semana, en cada uno de ellos se siembran las células en frascos, añadiendo 50000 células suspendidas en 5 ml de medio. No es necesario cambiar el medio de los frascos entre los subcultivos.

5.2 Medios de cultivo y reactivos

Compuestos empleados en cultivo celular	
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with glucose (4.5 g/l), with L-glutamine	Lonza
Suero ternera fetal	
Anti-evaporation oil for cell culture	Ibidi
Tripsina	Lonza
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Lonza
Compuestos empleados en los ensayos de nefrotoxicidad	
<i>cis</i> -diaminodicloroplatino(II) (CDDP)	Sigma
Cristal Violeta	Sigma
PrestoBlue Cell Viability Reagent	TermoFisher
Gamma-glutamyl p-Nitroanilina (GGpN)	Sigma
Glicilglicina	Sigma
DMEM sin rojo fenol	Lonza
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) without Phenol Red	Lonza
Ácido acético	

5.3 Características del dispositivo fluídico

En este trabajo se ha empleado el dispositivo fluídico μ Slide VI 0.4 de la casa Ibidi. Tienen 6 canales dispuestos de forma paralela con una altura de 0.4 mm y una superficie de cultivo de 0.6 cm², y a ambos lados de cada canal tienen dos reservorios a los que se pueden adaptar conectores Luer macho. En los canales se siembran las células de forma que crecen formando una monocapa en la base del canal que no llega a bloquear su luz, dejando los reservorios conectados (*Figura 4*). A la hora de sembrar no es necesario emplear ningún *coating* porque las células NRK se adhieren bien, además el plástico con el que está hecho el μ Slide tiene propiedades ópticas parecidas a las del cristal, por lo que se puede medir la absorbancia o la fluorescencia a través de él.

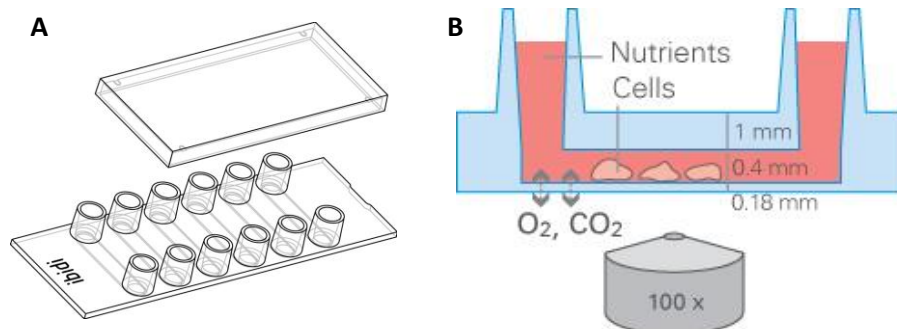


Figura 4. A: Disposición de los canales del μ Slide. B: Al cultivar las células no se bloquea completamente el canal. Además el plástico es permeable al paso de gases.

5.4 Siembra del μ Slide

Las células se tripsinizan y se cuentan. La muestra obtenida se diluye para preparar la solución de siembra, con 150000 céls/ml y se añaden 30 μ l en cada canal del μ Slide, cuidando que no queden burbujas. Se siembran siempre dos μ Slides, a uno de ellos se le pondrá flujo y el otro servirá como control. Estos μ Slides se incuban por 2 horas a 37°C para que las células se adhieran a los canales e impedir que al llenar el canal con medio fresco sean arrastradas. Tras el periodo de incubación se añaden 120 μ l de medio nuevo a un reservorio, éste llenará el canal y ambos reservorios. Se mantiene el μ Slide a 37°C y con un 5% de CO₂ hasta que se alcanza la confluencia, que suele ser a los 4-5 días. Durante ese tiempo se le renueva el medio cada 24 horas, y en el caso de que vaya a pasar más tiempo con el mismo medio se añade aceite mineral en ambos reservorios para evitar la evaporación.[20]

5.5 Sistema de flujo

El sistema de perfusión que se utiliza es en serie, conecta la salida de un canal con la entrada del siguiente de forma que el flujo sigue un único camino mientras recorre los 6 canales. El sistema de flujo está compuesto de tres partes: un reservorio, el tubo de la bomba y el μ Slide.

En el reservorio se encuentra el medio que alimenta el sistema, al principio del ensayo se añaden 10 ml de medio fresco. El tubo de la bomba está conectado al reservorio y al μ Slide por sus extremos, además su parte central se introduce en una bomba peristáltica, que hace que avance medio desde el reservorio. El μ Slide se adapta al sistema por medio de conectores Luer. Se han utilizado dos tipos de conectores Luer, acodados y verticales.

Se perfunde medio por el μ Slide 4 días después de la siembra, que es cuando las células han alcanzado la confluencia. Antes de montar el sistema se deben equilibrar todos los componentes dejándolos 2 horas a 37°C. A continuación se monta el sistema sin el μ Slide, utilizando un tubo de silicona que lo sustituye para poder cerrar el circuito, y tras purgar el sistema se recircula el medio durante al menos 2 horas. Al mismo tiempo que se monta el sistema se ponen los conectores en el μ Slide evitando atrapar burbujas y se deja 2 horas a 37°C.

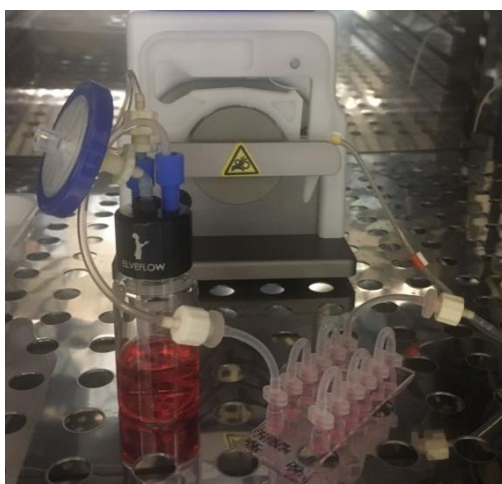


Figura 5. Sistema de flúidica. En la imagen se observan los tres componentes del sistema de flúidica. En este caso el μ Slide tiene conectores verticales.

Una vez ha pasado el tiempo de incubación se para el sistema y se sustituye el tubo de silicona por el μ Slide evitando atrapar burbujas. Entonces se comienza a perfundir el flujo por el μ Slide a un ritmo de 180 μ l/min. Esto genera un *shear stress* en la superficie del cultivo de 0.235 dyn/cm^2 . Este valor está en el rango considerado como fisiológico, que va desde 0.2 dyn/cm^2 a 1 dyn/cm^2 , y está muy cerca del mínimo.[21]

Sólo se conecta un μ Slide al sistema de flujo, el otro se deja en estático y habrá que seguir el protocolo normal de mantenimiento del cultivo, cambiando el medio cada 24 horas

5.6 Tratamiento con cisplatino

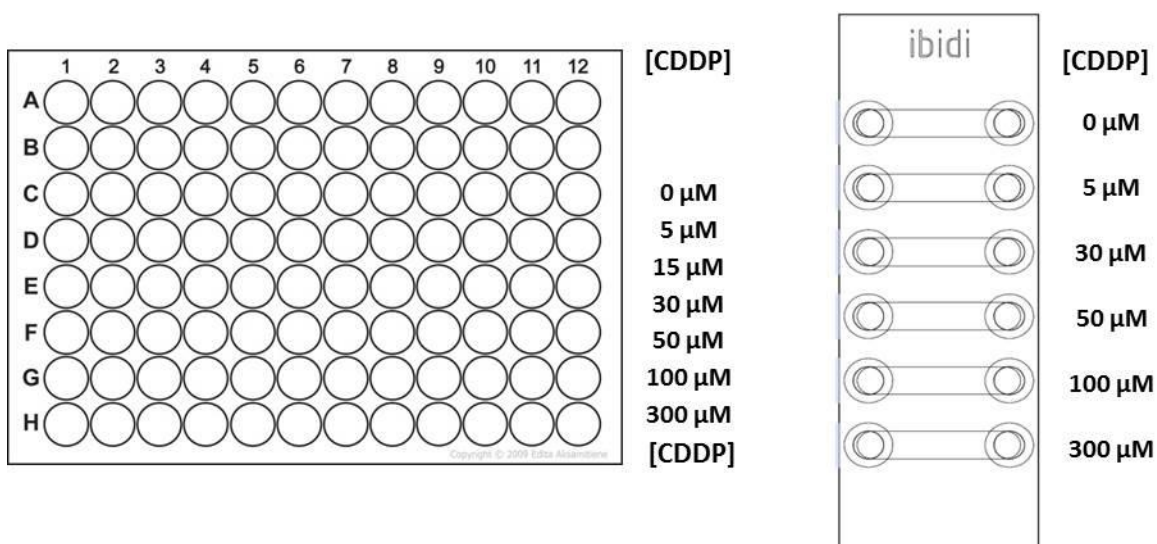


Figura 6. Diseño del tratamiento con CDDP. Se añaden diferentes concentraciones para ver su efecto. Como el μ Slide es más pequeño que la placa no pueden ponerse todas las concentraciones, por lo que se prescinde de la 15 μM .

El tratamiento con cisplatino se hace tanto en los μ Slides como en las placas de 96 pocillos. Se realizará cuando las células hayan alcanzado la confluencia en las placas de 96 pocillos y en los μ Slides en estático y tras 24 horas con flujo en los μ Slides que se hayan conectado al sistema de fluidica.

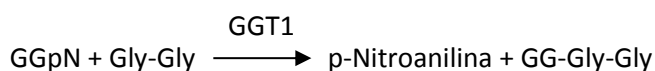
Para ello se parte de una solución stock de CDDP 3.3 mM, a partir de la cual se preparan las diluciones de trabajo utilizando como disolvente el medio de cultivo habitual. Se sustituye el medio de cultivo por las diluciones de CDDP como muestra la imagen 6. Tras 8 horas se retira el CDDP y se añade medio nuevo.

5.7 Ensayo de nefrotoxicidad

Este ensayo consta de dos partes, en la primera se evalúan la viabilidad celular y la actividad de GGT-1 y en la segunda se determina la cantidad de células en el soporte de cultivo.

Para la determinación de la viabilidad se mide la capacidad de las células para reducir la resazurina. Como se precisa de un entorno reductor para que se dé esta reacción sólo puede producirse en células viables. Además se hace un ensayo para determinar la actividad enzimática de la Gamma Glutamyl Transpeptidasa 1 (GGT1), que cataliza la transferencia de un grupo gamma-glutamil. Se estudia la actividad de esta enzima por dos motivos; el primero es que es un marcador específico de células del túbulo proximal, esto sirve para determinar si los posibles cambios en la viabilidad se deben a las células NRK. El segundo motivo es que la actividad GGT1 protege a la célula del daño causado por el CDDP, por lo que puede ser interesante su estudio.[19]

Estos dos ensayos se hacen simultáneamente, primero se lavan las células con tampón HBSS para eliminar el medio de cultivo y se añade la solución sustrato, que contiene gamma-glutamil p-Nitroanilina (GGpN), Glicilglicina y PrestoBlue. La GGpN actúa como dador del grupo gamma-glutamil y la glicil-glicina como aceptor de forma que se genera p-Nitroanilina a un ritmo proporcional a la actividad de GGT1. La p-Nitroanilina tiene color amarillo, por lo que su concentración se puede calcular midiendo la absorbancia de la muestra a 410 nm y determinar así la actividad GGT1.



El PrestoBlue es un compuesto comercial compuesto por una solución de resazurina. Es un compuesto no fluorescente de color azul con permeabilidad de membrana, que al añadirse al medio se introduce en las células y es reducido, pasando de resazurina a resafurina. Las células que mantienen su poder reductor son las viables, por lo que la cantidad de resafurina producida será proporcional a la viabilidad celular. La resafurina es de color rojo y fluorescente, se puede medir su concentración excitando la muestra con una longitud de onda de 530 nm y midiendo la fluorescencia a 590 nm.

La GGpN, la glicilglicina y el PrestoBlue se diluyen en medio de cultivo DMEM sin rojo fenol para preparar la solución sustrato. Después se incuba en el lector (BioTek, Synergy HT) a 37°C durante una hora, tomando medidas cada 20 minutos.

Para la determinación de la densidad celular se utiliza un ensayo de cristal violeta, un tinte que se une a ADN. Para ello es necesario fijar primero las células con metanol, incubar 30 minutos con el cristal violeta y disolver los cristales formados en ácido acético. Midiendo la absorbancia a 590 nm se puede calcular la concentración de cristal violeta, que será proporcional a la cantidad de células que había en la muestra.

5.8 Diseño del experimento

Se utilizarán dos soportes para cultivar las células; placas de 96 pocillos y μ Slides. Las placas se siembran y una vez hayan alcanzado la confluencia se hace el tratamiento con cisplatino, para dos días después hacer el ensayo de nefrotoxicidad.

Los μ Slides se siembran por parejas, de forma que cuando hayan alcanzado ambos la confluencia uno de ellos se conecta al sistema de flujo. Tras 24 horas se desconecta y se aplica en ambos el tratamiento de cisplatino, para hacer el ensayo de nefrotoxicidad dos días después.

6. RESULTADOS

6.1 Efectos del cisplatino en las células cultivadas en placas de 96 pocillos.

En este ensayo se cultivaron las células NRK en una placa de 96 pocillos hasta alcanzar la confluencia. En ese momento se realizó el tratamiento con cisplatino, y 48 horas después el ensayo de nefrotoxicidad. Se pueden apreciar los efectos del cisplatino a simple vista 48 horas después del tratamiento. Se puede observar que se produce muerte celular al añadir el cisplatino en el cultivo, y que ésta es mayor conforme aumenta la cantidad de fármaco (*Figura 7*).

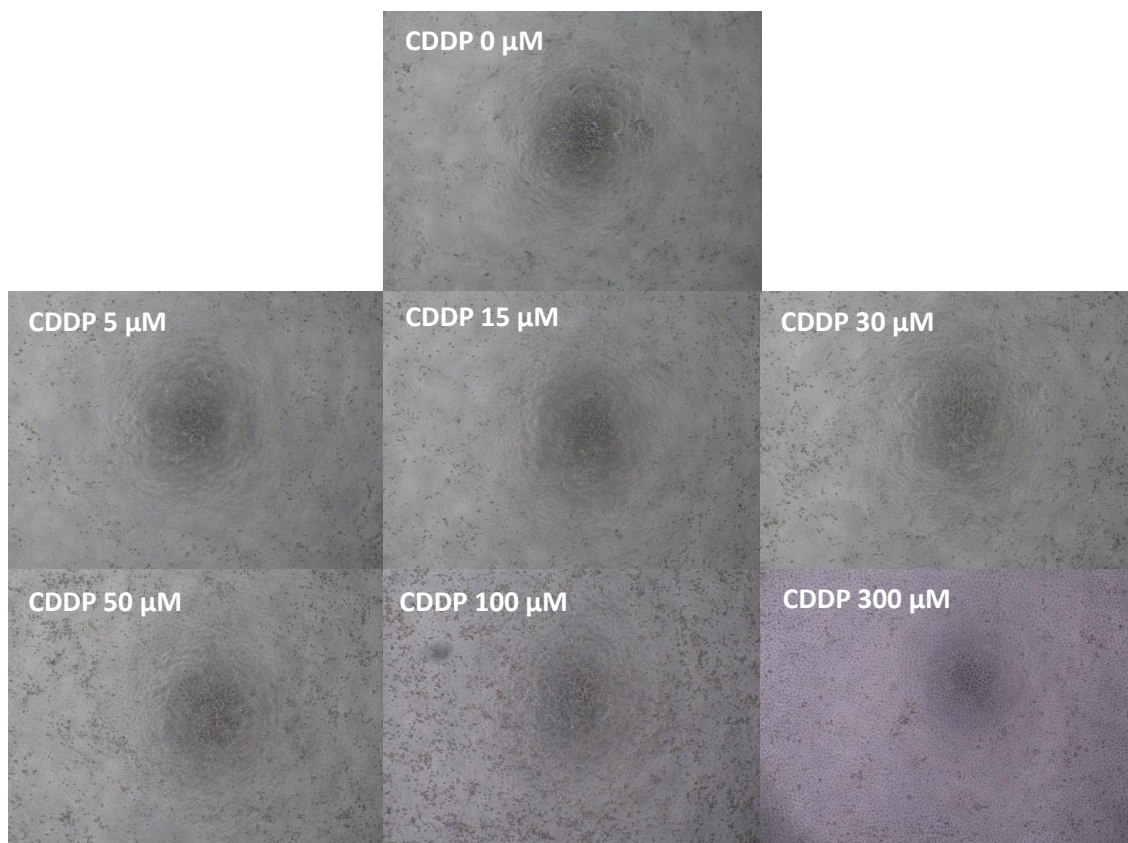


Figura 7. Efecto de las diferentes concentraciones de cisplatino sobre los cultivos celulares 48 horas después del tratamiento. Puede observarse que conforme aumenta la concentración de CDDP la muerte celular es mayor.

Para observar de forma objetiva cómo varía la viabilidad celular se mide la concentración de resafurina en cada pocillo. La resafurina es fluorescente, así que excitando la muestra a 530 nm y midiendo la fluorescencia a 590 nm se puede determinar su concentración.

En este caso la resafurina desciende conforme aumenta la concentración de cisplatino (*Figura 8A*), por lo que se puede afirmar que la viabilidad celular también lo hace. Se observa una gran diferencia entre los dos últimos valores, correspondientes a concentraciones de cisplatino de 100 μM y 300 μM, y los demás, lo que hace suponer que el efecto de la concentración es muy importante en la muerte celular inducida por cisplatino.

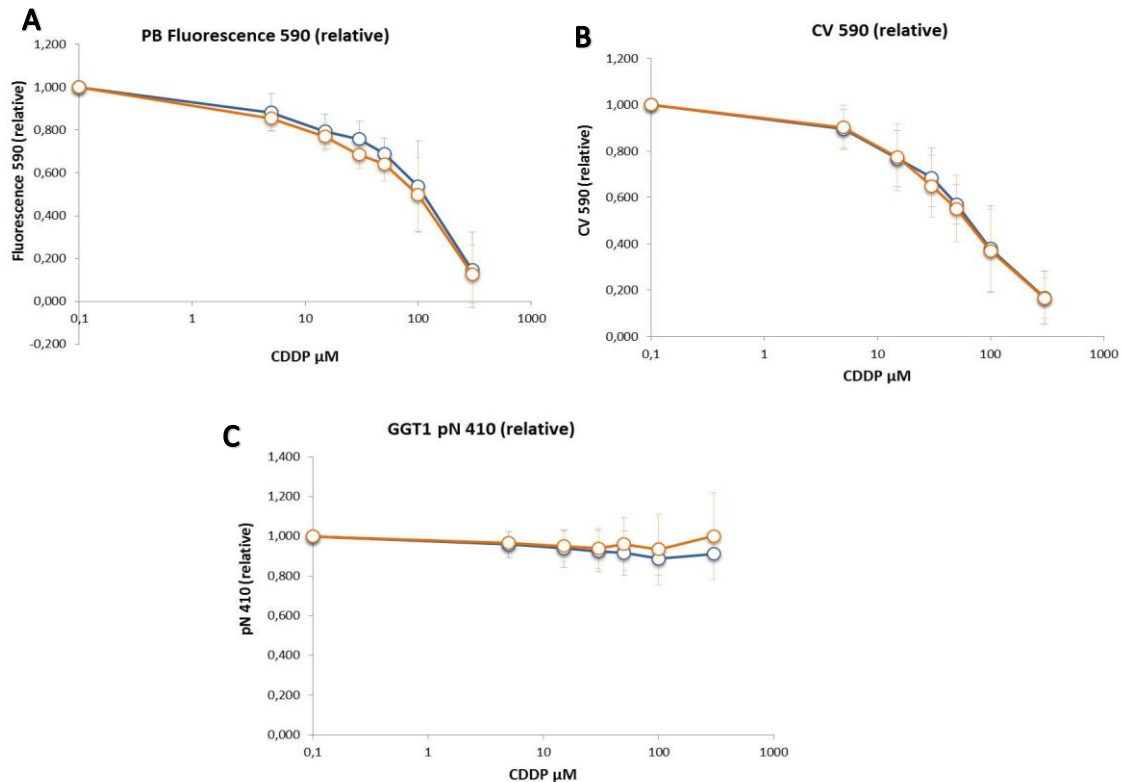


Figura 8. Ensayo de nefrotoxicidad en las placas de 96 pocillos. $n=4$. En cada punto se representa la media \pm SD. A: Viabilidad del cultivo a diferentes concentraciones de CDDP (0-300 μM). Se observa un marcado descenso de viabilidad como consecuencia del tratamiento con cisplatino. B: Densidad celular en función de la concentración de CDDP. La celular descende conforme aumenta la concentración de cisplatino. C: Actividad de GGT1 a diferentes concentraciones de CDDP (0-300 μM). La actividad se mantiene constante.

En cuanto a la densidad celular, se observa que ésta también decrece conforme aumenta la concentración de cisplatino (*Imagen 8B*). Esto se debe a que al morir las células se separan de la superficie de cultivo y son retiradas durante los lavados que se realizan durante el ensayo de nefrotoxicidad, por lo que sólo las células que estaban adheridas a la superficie de cultivo en el momento de fijarlas son teñidas por el cristal violeta y resultan incluidas en esta determinación.

La actividad de GGT1 permanece constante a pesar de que varíe la concentración de cisplatino (*Figura 8C*), lo que confirma la identidad de las células del cultivo, ya que la enzima GGT1 es un marcador de túbulo proximal. Sin embargo, se ha demostrado que aunque la actividad se mantiene, descende el número de células totales en cultivo. Esto se debe a que el cisplatino a altas concentraciones induce el aumento de la actividad GGT1. [22]

6.2 Efectos del cisplatino en las células cultivadas en μ Slide sin perfusión.

Una vez observados los efectos que produce el cisplatino en un cultivo estático de células de túbulo proximal se repite el ensayo en el μ Slide, el dispositivo que se emplea para hacer los experimentos con flujo pero en estático. El objetivo es observar las posibles diferencias en el efecto del cisplatino que sean consecuencia del dispositivo empleado en el cultivo y evitar confundirlas con las diferencias producidas por el efecto del flujo.

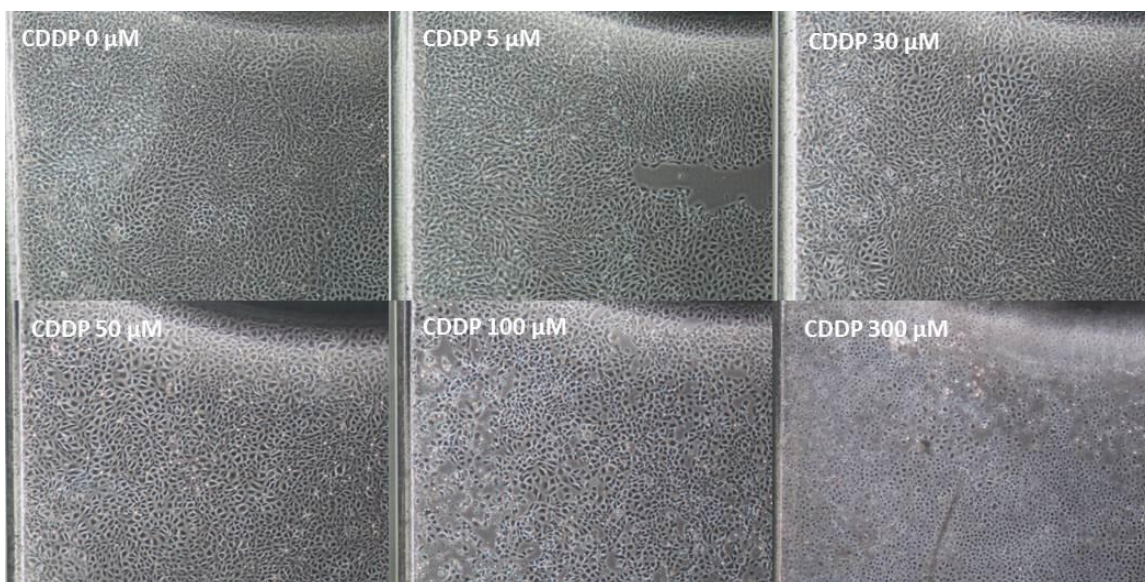


Figura 9. Efecto de las diferentes concentraciones de cisplatino sobre los cultivos celulares 48 horas después del tratamiento en el μ Slide. Puede observarse que conforme aumenta la concentración de CDDP la muerte celular es mayor.

Como en el caso del ensayo en la placa, los efectos del cisplatino sobre los cultivos se pueden apreciar a simple vista, 48 horas después del tratamiento se observa un aumento de la muerte celular conforme crece la concentración de cisplatino (*Imagen 9*). Tras realizar el ensayo de nefrotoxicidad se comprueba que los efectos del cisplatino sobre las células cultivadas en el μ Slide son muy parecidos a los que produce en los cultivos en placa.

La viabilidad celular decae conforme aumenta la concentración de cisplatino (*Imagen 8A*), además, igual que en el ensayo en placas de 96 pocillos el descenso es mucho más acusado a partir de una concentración de cisplatino de 100 μ M. La densidad celular también baja como consecuencia a un aumento de la muerte celular durante los días previos al ensayo. Esto contrasta con las imágenes del estado de los cultivos en los que se observaba que la confluencia se mantenía prácticamente hasta una concentración de cisplatino de 50 μ M. Esto sucede porque aunque mueren parte de las células, las que sobreviven aumentan de tamaño y ocupan el espacio libre, por lo que aparentemente se mantiene la confluencia de la monocapa. Por otra parte la actividad GGT1 se mantiene constante a bajas concentraciones de cisplatino, luego cae a la mitad y finalmente vuelve a aumentar.

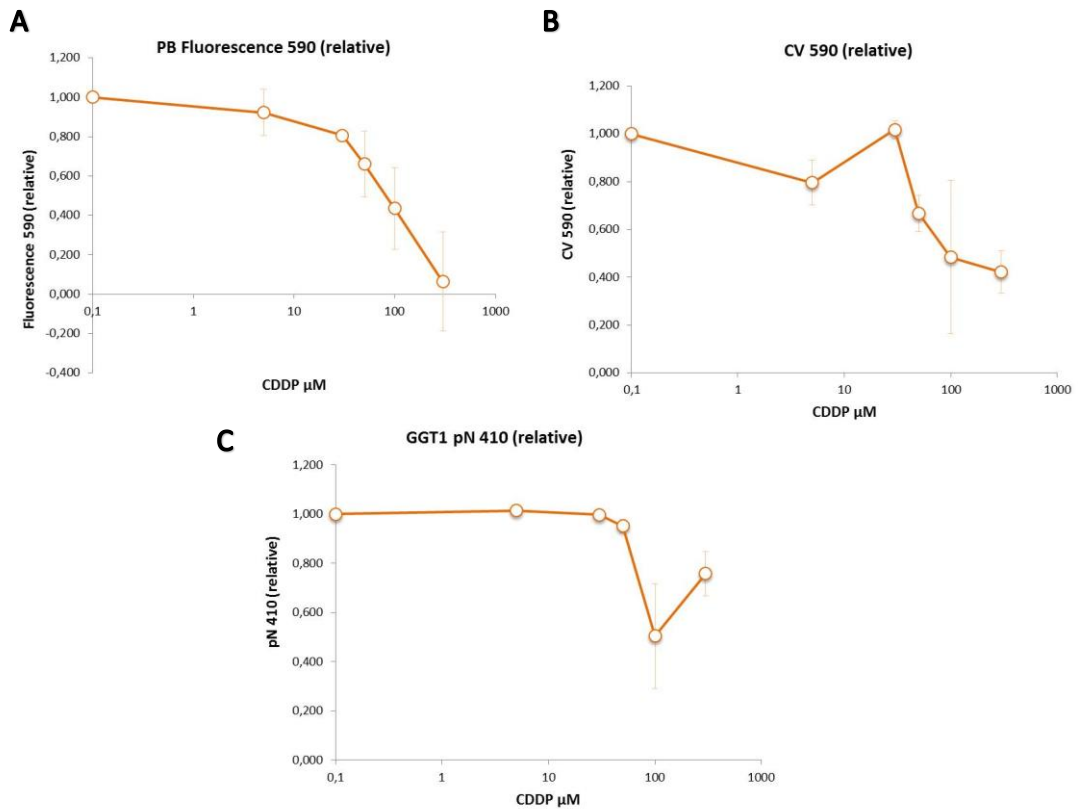


Figura 10. Ensayo de nefrotoxicidad en μSlides en estático. $n=2$. En cada punto se representa la media \pm SD. **A: Viabilidad del cultivo a diferentes concentraciones de CDDP (0-300 μM). Se observa un marcado descenso de viabilidad como consecuencia del tratamiento con cisplatino. **B:** Densidad celular en función de la concentración de CDDP. La celular descende conforme aumenta la concentración de cisplatino. **C:** Actividad de GGT1 a diferentes concentraciones de CDDP (0-300 μM). La actividad se mantiene constante.**

Estos datos permiten afirmar que las células NRK responden de forma similar al tratamiento de cisplatino tanto si son cultivadas en una placa de 96 pocillos como en un μSlide , su sensibilidad a este fármaco es igual en ambos soportes.

6.3 Efectos del cisplatino en las células cultivadas en μSlide con flujo.

En este ensayo se perfunde flujo durante 24 horas por el dispositivo μSlide en cuyos canales están sembradas las células. El objetivo es compararlo con el experimento anterior para ver si se puede observar algún cambio en la resistencia de las células al cisplatino debida al flujo. Para ello se utiliza el equipo explicado en la sección de materiales y métodos, empleando conectores acodados para adaptar el μSlide al sistema de flujo. Sin embargo ninguno de estos ensayos se pudo concluir porque durante las 24 horas que permanecían conectados al sistema de flujo los cultivos se veían dañados y no eran aptos para realizar el ensayo de nefrotoxicidad ya que las células se levantaban y eran arrastradas por el flujo (Figura 11). El motivo de que se

produjese este daño es que entraban burbujas de aire en el sistema de flujo y quedaban atrapadas en los canales, dejando las células expuestas al aire.

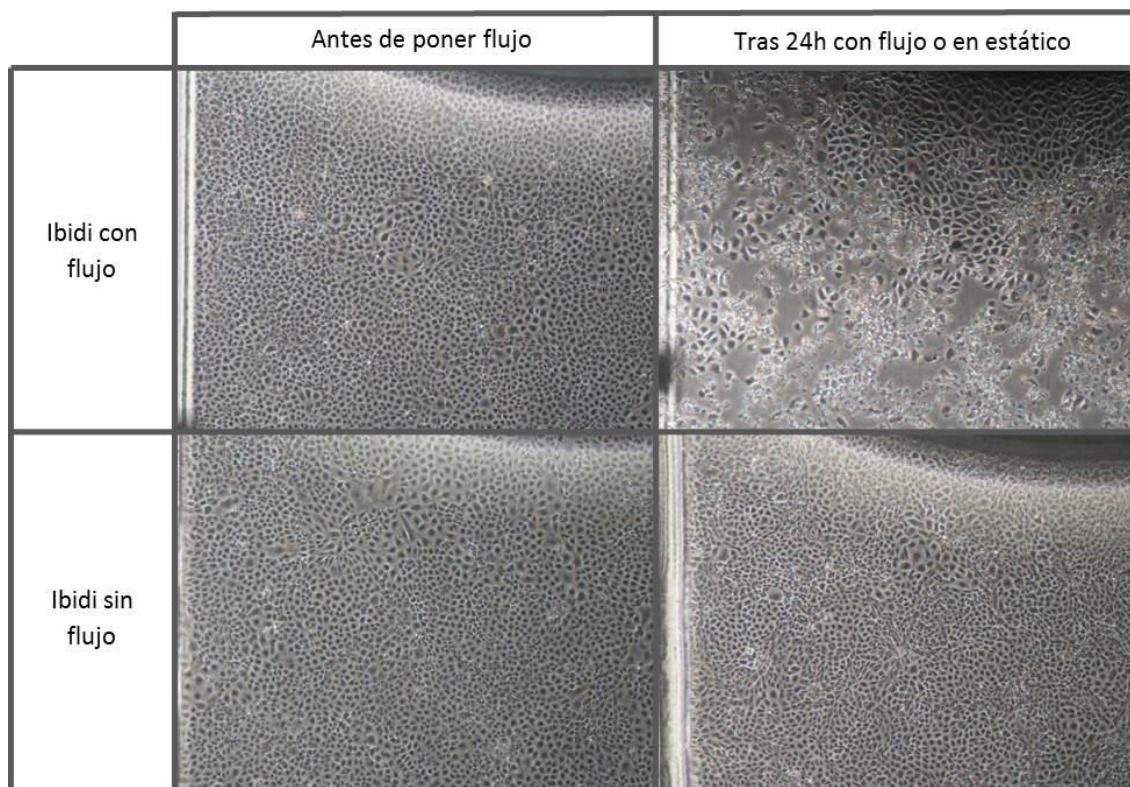


Figura 11. Efecto del flujo sobre los cultivos celulares. Las imágenes superiores corresponden al μ Slide antes y después de perfundir flujo. En este ensayo entró una burbuja de aire en el canal, dañando el cultivo. Por otra parte se observa como el μ Slide en estático no ha sufrido daños en el mismo período de tiempo.

Se identificaron los conectores acodados como los principales responsables de la entrada de aire, ya que los codos favorecían que se quedasen pequeñas burbujas atrapadas que al irse acumulando crecían y finalmente entraban en los canales produciendo los daños observados.

Por ello se decidió sustituir estos conectores por otros verticales, que tienen las mismas características excepto por que carecen del codo, por lo que es más difícil que queden burbujas atrapadas. Con estos nuevos conectores se repite el ensayo y se consigue llegar a 24 horas de perfusión sin que entre ninguna burbuja a los canales. Los cultivos no sufren daños después de estar expuestos a flujo (*Figura 12*) por lo que se puede hacer el tratamiento con cisplatino. Además pueden observarse a simple vista diferencias en el fenotipo de las células que han estado expuestas a flujo frente a las que no. Ambas presentan gránulos, pero mientras que en las segundas éstos se encuentran dispersos por toda la célula, en las primeras se encuentran en mayor cantidad y agrupados en zonas concretas, frecuentemente en los extremos de las células.



Figura 12. Efecto del flujo sobre los cultivos celulares. Las imágenes superiores corresponden al μ Slide antes y después de perfundir flujo utilizando conectores verticales. Tras 24 horas de exposición al flujo los cultivos no han sufrido daños y se mantiene la confluencia. Además se pueden observar diferencias en la morfología de las células al observarlas con 20 aumentos, como la disposición de los gránulos, marcada con flechas.

Los conectores verticales se adoptaron tarde en el protocolo por lo que únicamente se pudieron hacer dos ensayos con perfusión de flujo. Durante el primero de ellos se produjeron daños en los cultivos mientras estaba conectado el μ Slide al sistema de flujo, a pesar de que no se observó ninguna burbuja en los canales. Estos daños afectaron más a los primeros canales, que es donde una vez concluido el periodo de exposición al flujo se ponen las concentraciones más bajas de cisplatino. A pesar de esto se decidió seguir con el ensayo. El segundo experimento se desarrolló con normalidad. Los resultados mostrados a continuación corresponden a esos dos ensayos.

48 horas después del tratamiento con cisplatino sus efectos son visibles a simple vista (*Figura 13*). Las células parecen ser más sensibles al cisplatino tras ser expuestas al flujo, ya que para una concentración de 30 μ M hay daños muy notables en el cultivo y a partir de 50 μ M mueren prácticamente todas las células.

En el ensayo de PrestoBlue ambos μ Slides se comportan de forma muy parecida (*Figura 14A*). La fluorescencia baja conforme aumenta la concentración de cisplatino, lo que indica que la viabilidad también lo hace. Esto sucede en ambas series de datos, lo que indica que la exposición al flujo no ha modificado la sensibilidad de las células al cisplatino.

En el caso del cristal violeta tampoco se observan diferencias significativas entre la serie de datos correspondiente a los ensayos en estático y los ensayos en flujo, en ambos casos la densidad celular en los cultivos va disminuyendo al crecer la concentración de cisplatino que se aplica (*Figura 14B*). Por último, en el ensayo de actividad de GGT1, ésta permanece constante a diferentes concentraciones de cisplatino en ambos ensayos, tanto en estático como con flujo (*Figura 14C*).

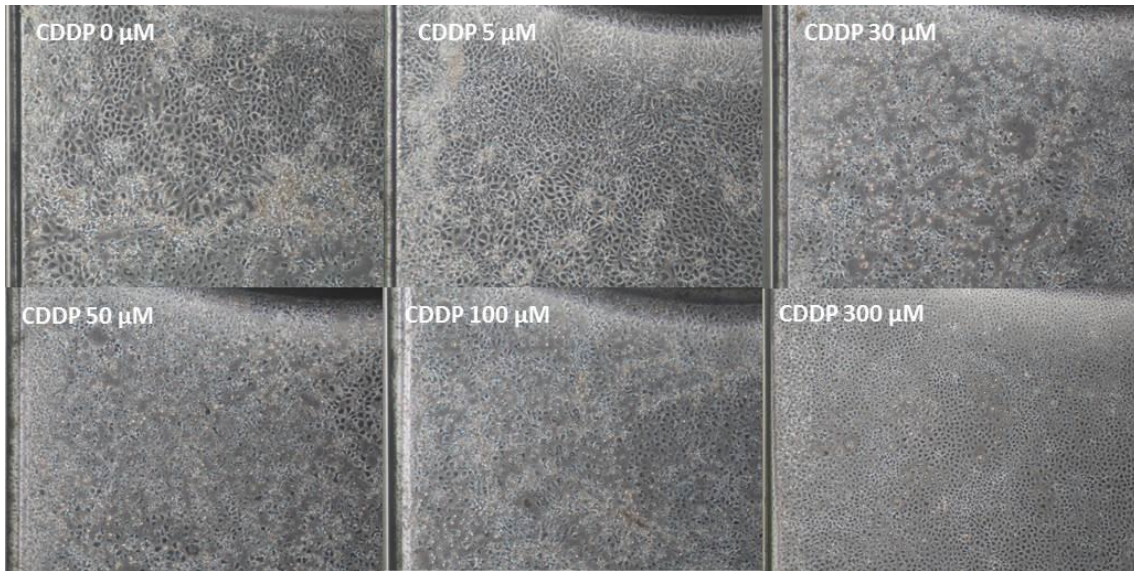


Figura 13. Efecto de las diferentes concentraciones de cisplatino sobre los cultivos celulares. Estas imágenes se tomaron 48 horas después del tratamiento con cisplatino en un μ Slide que había sido conectado previamente a un sistema de flujo durante 24 horas.

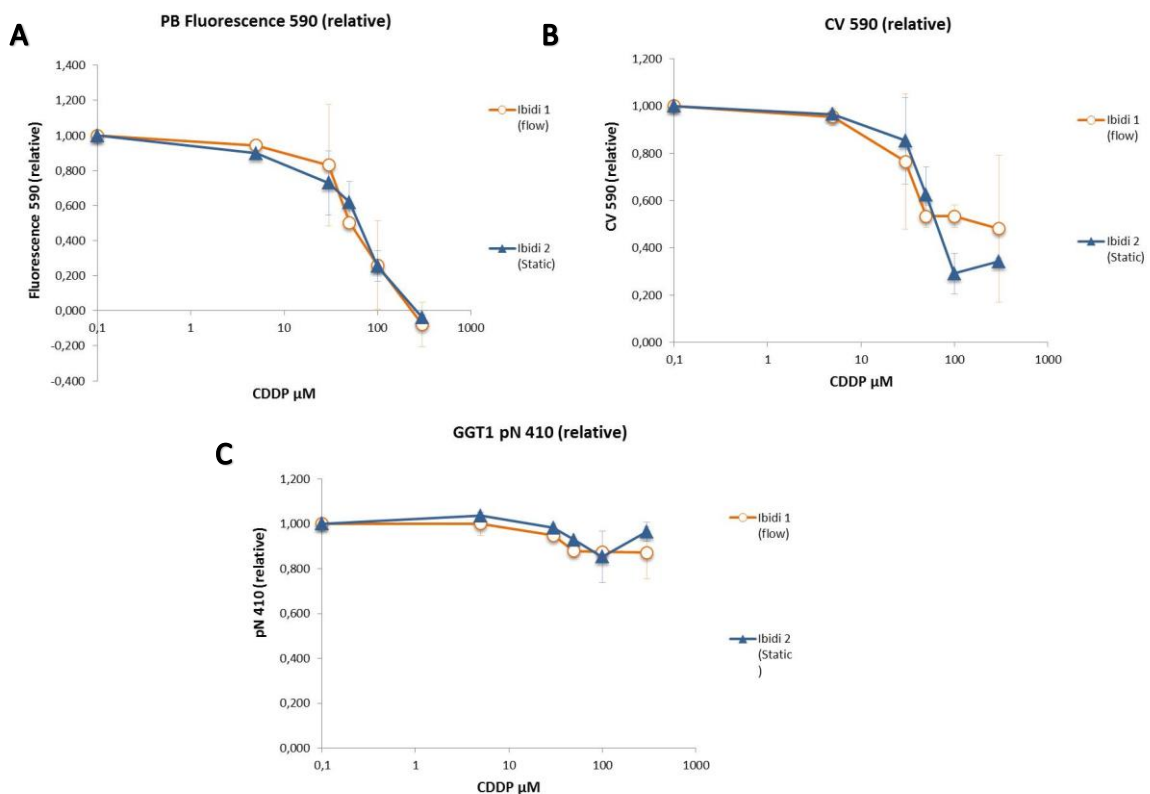


Figura 14. Comparación del ensayo de nefrotoxicidad en μ Slides en estatico y con flujo. $n=2$. En cada punto se representa la media \pm SD. **A: Viabilidad del cultivo a diferentes concentraciones de CDDP (0-300 μ M).** Se observa un marcado descenso de viabilidad como consecuencia del tratamiento con cisplatino. **B: Densidad celular en función de la concentración de CDDP.** La celular desciende conforme aumenta la concentración de cisplatino. **C: Actividad de GGT1 a diferentes concentraciones de CDDP (0-300 μ M).** La actividad se mantiene constante.

7. DISCUSIÓN

Hasta el momento se han realizado estudios que ponen en evidencia que el *shear stress* es un mecanismo regulador que permite modificar el fenotipo de determinadas células. Además, ensayos de nefrotoxicidad desarrollados en condiciones de *shear stress* han demostrado que mimetizan mejor la respuesta que se produce *in vivo* que los ensayos de nefrotoxicidad tradicionales.[13], [18]

En este proyecto se trabajaba con la hipótesis de que el *shear stress* disminuye la sensibilidad de las células epiteliales del túbulo proximal al cisplatino. Se ha conseguido testar un modelo de nefrotoxicidad basado en cisplatino en un cultivo estático de células de túbulo proximal, y después adaptar éste modelo a un dispositivo fluidoico sin aplicarle flujo. Al aplicarle el flujo cabía esperar que se produjesen cambios fenotípicos en las células cultivadas, como sucede en otros trabajos mencionados anteriormente. No obstante en los ensayos realizados se ha demostrado que no hay diferencia en la viabilidad celular tras el tratamiento con cisplatino. Estos resultados están condicionados por el bajo número de repeticiones que se han hecho, ya que sólo se han podido hacer dos ensayos con flujo. Habría que hacer más repeticiones para poder afirmar que el flujo no altera la sensibilidad de las células al cisplatino. También es posible que estos cambios no se hayan producido porque el *shear stress* generado sobre las células era demasiado bajo. El valor de flujo empleado corresponde al mínimo fisiológico, por lo que es probable que con un flujo más alto que siguiese siendo considerado como fisiológico se diesen los cambios esperados en el fenotipo.

Además en los ensayos de nefrotoxicidad se analizaba la actividad de la enzima GGT1. Esta enzima tiene es importante en el mecanismo de acción del cisplatino en las células epiteliales del túbulo proximal, aunque su papel no está bien definido se sabe que se encarga de convertir el cisplatino en una molécula más reactiva. Hasta el momento no se ha probado que la actividad de esta enzima sea regulada por el *shear stress*. [19] No se observó ningún cambio en la actividad de la GGT1 en el ensayo realizado con flujo respecto al control estático, pero una vez más es posible que esto sea debido a un flujo demasiado bajo. Por lo tanto sería necesario repetir el ensayo en condiciones diferentes de flujo para ver si cambia la actividad de GGT1.

8. CONCLUSIONES

1. La exposición de un cultivo de células epiteliales de túbulo proximal a cisplatino produce una disminución dosis-dependiente en la viabilidad de estas células.
2. Las células NRK-52E responden de forma similar al tratamiento de cisplatino tanto si son cultivadas en una placa de 96 pocillos como si se utiliza un μ Slide en estático.
3. La utilización de conectores acodados en el sistema de fluídica puede generar problemas derivados de la entrada de burbujas de aire en el circuito, por lo que es mejor utilizar conectores verticales.
4. El *shear stress* al que se ven expuestas las células cultivadas no produce cambios en la sensibilidad de éstas al cisplatino con respecto al control ni modula la actividad de la enzima GGT1.

CONCLUSIONS

1. Exposing a proximal tubule epithelial cells culture to cisplatin generates a drop of the cells viability which seems to be dose-dependant.
2. NRK-52E cells respond in a similar way to cisplatin treatment if they are cultured in a 96 well plate or in a static μ Slide.
3. Using elbow connectors in the fluidic device may lead to problems related with the entrance of air bubbles in the circuit. Due to this it is preferable to use vertical connectors.
4. The shear stress to which cells are exposed does not produce changes in the cell sensibility to cisplatin nor modulates the GGT1 activity.

9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] V. Raghavan and O. A. Weisz, "Discerning the role of mechanosensors in regulating proximal tubule function," *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.*, vol. 15261, no. 31, p. ajprenal.00373.2015, 2015.
- [2] K. Kühn and E. Reale, "Junctional complexes of the tubular cells in the human kidney as revealed with freeze-fracture," *Cell Tissue Res.*, vol. 160, no. 2, pp. 193–205, 1975.
- [3] F. Hanner, C. M. Sorensen, N.-H. Holstein-Rathlou, and J. Peti-Peterdi, "Connexins and the kidney," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 298, no. 5, pp. R1143-55, 2010.
- [4] J. E. Hall, "GUYTON Y HALL. TRATADO DE FISIOLOGÍA MÉDICA," 13th ed., Elsevier, 2016.
- [5] H. Sackin, "Stretch-activated ion channels," vol. 48, pp. 1134–1147, 1995.
- [6] T. Wang, S. Weinbaum, and A. M. Weinstein, "Regulation of glomerulotubular balance : flow-activated proximal tubule function," 2017.
- [7] J. Costa López, J., Cervera, S., Cunill, F., Mans, C. y Mata Alvarez, *Curso de Química Técnica*. Barcelona: Reverté, 1983.
- [8] J. M. Calleja, G.; García, F.; Martínez, A.L.; Prats, D.; Rodríguez, *Introducción a la Ingeniería Química*. Madrid: Síntesis SA, 1999.
- [9] S. Weinbaum, Y. Duan, L. M. Satlin, T. Wang, and A. M. Weinstein, "Mechanotransduction in the renal tubule," pp. 1220–1236, 2010.
- [10] V. Raghavan, Y. Rbaibi, N. M. Pastor-soler, M. D. Carattino, and O. A. Weisz, "Shear stress-dependent regulation of apical endocytosis in renal proximal tubule cells mediated by primary cilia," 2014.
- [11] D. P. Basile, M. D. Anderson, and T. A. Sutton, "Pathophysiology of Acute Kidney Injury," *Compr. Physiol.*, vol. 2, no. 2, pp. 1303–53, 2011.
- [12] "National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=2767, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2767> (accessed May 22, 2017)." [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2767#section=Mechanism-of-Action>.
- [13] K.-J. Jang *et al.*, "Human kidney proximal tubule-on-a-chip for drug transport and nephrotoxicity assessment," *Integr. Biol.*, vol. 5, no. 9, p. 1119, 2013.
- [14] R. Hwa Lee, J. Mi Song, M. Young Park, S. Kyung Kang, Y. Keun Kim, and J. Sup Jung, "Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 62, no. 8, pp. 1013–1023, 2001.
- [15] S. Y. Proskuryakov, A. G. Konoplyannikov, and V. L. Gabai, "Necrosis: A specific form of programmed cell death?," *Exp. Cell Res.*, vol. 283, no. 1, pp. 1–16, 2003.
- [16] S. Periyasamy-Thandavan, M. Jiang, Q. Wei, R. Smith, X.-M. Yin, and Z. Dong, "Autophagy is cytoprotective during cisplatin injury of renal proximal tubular cells," *Kidney Int.*, vol. 74, no. 5, pp. 631–640, 2008.
- [17] D. Portilla *et al.*, "Alterations of PPARalpha and its coactivator PGC-1 in cisplatin-

induced acute renal failure.," *Kidney Int.*, vol. 62, no. 4, pp. 1208–18, 2002.

- [18] M. Essig, "Tubular Shear Stress and Phenotype of Renal Proximal Tubular Cells," *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 14, no. 90001, p. 33S–35, 2003.
- [19] L. Fliedl, M. Wieser, G. Manhart, and M. P. Gerstl, "Controversial Role of Gamma-Glutamyl Transferase Activity in Cisplatin Nephrotoxicity," pp. 269–278, 2014.
- [20] IBIDI, "Instructions: u-Slide VI 0.4," vol. 3, p. 4, 2015.
- [21] A. Note, P. Setup, S. Connection, and I. The, "Serial Connection of the six channels in ibidi," pp. 1–7.