



Universidad
Zaragoza

Tubulogénesis de túbulo proximal para estudios de nefrotoxicidad

Trabajo Fin de Grado
Grado en Biotecnología
2019

Autor

LAURA MARQUÉS GRACIA

Directores

IGNACIO GIMÉNEZ LÓPEZ

PATRICIA MEADE HUERTA

Departamento de Farmacología y Fisiología

Departamento de Bioquímica y Biología celular

|

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Nefrona	3
2.2. Túbulo proximal	4
2.3 Modelos tubulares renales.....	5
2.3.1. Modelos 2.5D	5
2.3.2. Modelos 3D	5
2.4 Nefrotoxicidad.....	6
2.5 Antecedentes	7
3. HIPÓTESIS.....	8
3.1 Objetivo general.....	8
3.2 Objetivos específicos.....	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
4.1 Cultivo celular.....	9
4.2 Modelo de tubulogénesis 2.5D sobre hidrogeles	9
4.3 Extracción y cuantificación de ARN.....	9
4.4 RT-PCR	10
4.5 Expresión y localización subcelular de marcadores epiteliales mediante inmunofluorescencia.....	11
4.6 Ensayo de citotoxicidad.....	12
5. RESULTADOS	13
5.1 Tubulogénesis de células RPTEC	13
5.2 Caracterización genotípica de las células RPTEC.....	15
5.317Expresión y localización subcelular de marcadores epiteliales mediante inmunofluorescencia.....	17
5.4 Estudio de la viabilidad celular tras el efecto nefrotóxico del cisplatino	20
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	23
7. CONCLUSIONES.....	24
8. BIBLIOGRAFÍA.....	25

1. RESUMEN

El túbulo proximal es el primer segmento tubular de la nefrona y uno de los más implicados en la reabsorción y secreción de sustancias. Debido a su importante actividad metabólica y a una elevada exposición a citotóxicos, es una de las principales dianas en el riñón en el organismo para el desarrollo de nefrotoxicidad inducida por fármacos. La evaluación de la toxicidad producida en el organismo es un aspecto fundamental en el desarrollo de nuevos fármacos. En la actualidad, los sistemas de cultivo 2D no son capaces de reflejar la respuesta real del organismo por la falta de especificidad del modelo y comprometen la extrapolación de in vitro a in vivo. Por este motivo el desarrollo y empleo de una nueva aproximación que mimetice el entorno celular in vivo puede resultar de gran interés.

En este trabajo se expone el desarrollo y caracterización de un sistema de cultivo 2.5D en el que las células epiteliales de túbulo proximal RPTEC/TERT1 forman estructuras tubulares. Las células cultivadas sobre un hidrogel compuesto por colágeno tipo I y matrigel y cubiertas por un medio de cultivo suplementado con 5% de matrigel adquieren una arquitectura tubular. Los túbulos formados in vitro cuentan con una capa de células polarizadas que delimitan el lumen del túbulo y entre las que se establecen uniones estrechas confirmando la consistencia de la estructura. El estudio de nefrotoxicidad realizado en este modelo tras el tratamiento con cisplatino permite evaluar la sensibilidad de las células RPTEC y demuestra que el cisplatino tiene un efecto negativo dependiente de la dosis sobre la viabilidad celular. Así, el modelo descrito puede ser útil para investigar los procesos implicados en morfogénesis tubular y evaluar la nefrotoxicidad.

ABSTRACT

The proximal tubule is the first tubular segment of the nephron. It is greatly involved in reabsorption and secretion of many substances. Due to its important metabolic activity and its high cytotoxic exposition, the proximal tubule is a main target for drug-induced nephrotoxicity. Evaluation of toxicity is a basic step in the development of new drugs. Currently, 2D cell culture are unable to reflect clinal response owing to the lack of specificity and compromise in vitro-in vivo extrapolation. Therefore, a new method mimicking cellular environment could be interesting.

Here, the development and characterization of a 2.5D culture system is described. Proximal tubule epithelial cells RPTEC/TERT1 form tubular structures when cultured above a gel composed by collagen type I and Matrigel and covered by medium supplemented with 5% Matrigel. Tubules created in vitro are characterized by a cell polarized monolayer delimiting the tubule lumen. Cells establishing tight junctions confirm the consistency of the structure. Nephrotoxicity analysed in this model after cisplatin treatment permit the evaluation of RPTEC sensibility and demonstrate cisplatin has a dose-dependent negative effect on cell viability. Thus, the model described could be useful to investigate tubular morphogenesis process and to evaluate nephrotoxicity.

2. INTRODUCCIÓN

El riñón desempeña un papel fundamental en la homeostasis del organismo a través de la filtración sanguínea y la posterior reabsorción de sustancias esenciales como glucosa, aminoácidos, agua y varios iones.

Es un órgano muy potente y eficiente, capaz de manejar 180 L de filtrado plasmático al día para finalmente excretar un uno por ciento de ese volumen en forma de orina que contiene productos de desecho como urea y amonio. (1,2)

Son precisamente la elevada actividad metabólica del riñón y la exposición a agentes citotóxicos las responsables de la alta incidencia de enfermedades renales. La insuficiencia renal aguda (IRA) se caracteriza por una disminución de la función renal con la consecuente acumulación de toxinas, retención de agua y sodio y desarrollo de hiperpotasemia y acidosis metabólica. (3) Un 18-27% de los casos de IRA se deben a nefrotoxicidad inducida por fármacos y, aunque algunos de estos casos son reversibles, también puede haber casos que deriven en una enfermedad crónica. La insuficiencia renal crónica (IRC) resulta en necrosis tubular, inflamación tubulointersticial y fibrosis, efectos más graves que los producidos por IRA y que resultan en que el 13% de los pacientes necesite diálisis continua y el 41% un trasplante de riñón. (4)

Estos datos revelan la importancia del desarrollo de nuevos modelos in vitro que mejoren la capacidad de estudio de la función renal. El problema de los modelos actuales, que consisten en cultivos en monocapa (2D), es que no reproducen el complejo ambiente que encontramos in vivo, por lo que los resultados obtenidos en ensayos funcionales realizados con estos modelos no corresponden con la respuesta real del organismo. Esta falta de reproducibilidad del ambiente in vivo sumada a una pérdida de diferenciación de la línea celular comprometen las extrapolaciones de in vitro a in vivo.

Las principales ventajas de los cultivos celulares clásicos es que son simples, de bajo coste y facilitan la proliferación y multiplicación celular, proporcionando un gran número de células en cada cultivo. Sin embargo, ahora no solo buscamos multiplicación sino también diferenciación, es decir, un mantenimiento por parte de las células en cultivo de las características propias de su fenotipo. Atendiendo a estas necesidades se plantean dos retos; el primero, conseguir un gran número de células con un fenotipo renal, y el segundo, conseguir mantener en el tiempo las actividades celulares de dicho fenotipo. Hasta el momento, para hacer frente a estos retos, contamos con dos aproximaciones posibles:

1. Cultivos celulares primarios

Por definición un cultivo celular primario es aquel que crece a partir de un tejido o a partir de células individualizadas obtenidas del tejido original. Esta aproximación presenta los problemas de dediferenciación y senescencia.

2. Líneas celulares inmortalizadas

Existen varias técnicas de inmortalización que posibilitan que las células adquieran la capacidad de proliferar indefinidamente. Uno de los mecanismos más utilizados es la transformación con el antígeno largo del virus SV40 que es capaz de inactivar proteínas implicadas en el control de la proliferación celular. Otro mecanismo consiste en la transfección de la subunidad catalítica de

la telomerasa que desencadena una actividad constitutiva de la enzima y consecuentemente las células pueden dividirse indefinidamente. Sin embargo, la inmortalización no garantiza que las células conserven su fenotipo, por lo que con esta segunda aproximación superamos el problema de la senescencia que presenta la primera aproximación, pero no el de dediferenciación.

Debido a las limitaciones que presentan estas dos herramientas, se ha hecho necesario el desarrollo de una nueva aproximación que hiciera frente a los dos problemas simultáneamente. Modelos 3D tubulares que simulan determinadas partes de la nefrona se han utilizado para el estudio funcional del riñón. Por ejemplo, modelos de túbulo proximal en los que las células de un cultivo, inicialmente en monocapa, se organizan formando túbulos y manteniendo la diferenciación. Para comprender la importancia de la especialización de estas células en primer lugar se deben conocer las características estructurales, morfológicas y la composición de esta región tan importante de la nefrona, el túbulo proximal. (5)

2.1. Nefrona

En el ser humano, cada riñón está formado por 1 millón de nefronas aproximadamente. La nefrona es la unidad estructural y funcional básica del riñón en la que se diferencian dos partes: el corpúsculo renal y el sistema tubular. Por un lado, el corpúsculo renal tiene una forma esférica y está formado por una red de capilares encargados de la filtración del plasma, que forman el glomérulo y están rodeados por la cápsula de Bowman. Por otro lado, el sistema tubular consiste en una estructura longitudinal con células epiteliales diversas cuya estructura y función varía de un segmento a otro. Atendiendo a los criterios de morfología, los patrones de expresión proteica y las actividades específicas se pueden diferenciar varias partes a lo largo de la nefrona: túbulo proximal, asa de Henle, túbulo distal y túbulo colector. (1,2)

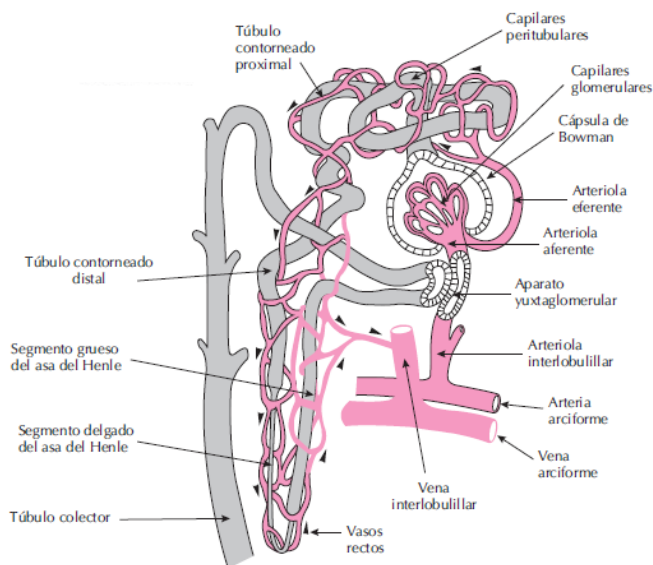


Figura 1. Estructura de la de la nefrona. Recurso obtenido de "Fisiología humana", J. A. F. Tresguerres. 3ª Ed. McGraw-Hill Interamericana de España.

2.2. Túbulo proximal

El túbulo proximal (TP) es el primer fragmento tubular y constituye el segmento más largo de la nefrona. Las paredes de este segmento están formadas por una monocapa de células epiteliales polarizadas unidas por un conjunto de uniones intercelulares que forman una barrera entre el compartimiento apical o luminal y el compartimiento basal (6). La superficie luminal de las células del TP cuenta con microvellosidades que constituyen el borde en cepillo, una estructura cuya morfología incrementa el área de superficie y favorece procesos, como la reabsorción, en los que las células necesitan una gran superficie de contacto con la sustancia implicada para resultar efectivos. Las células epiteliales tienen un complejo sistema de uniones formado por las uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas. Las uniones estrechas separan los dominios apicales y basales, forman puntos de adhesión entre las células y regulan el movimiento paracelular de iones y moléculas además de participar en la polarización de las células epiteliales impidiendo el movimiento libre de lípidos y proteínas a través de la membrana plasmática. ZO-1 es una proteína que forma parte del complejo proteico que forma las uniones estrechas y se encarga de unir las diferentes proteínas que forman el complejo entre ellas y también de la interacción de estas con el citoesqueleto. (7)

De todos los componentes estructurales de la nefrona, el túbulo proximal es responsable de la mayor parte de la reabsorción y secreción de sustancias. Sus células tienen una intensa actividad metabólica y cuentan con un gran número de mitocondrias que sostienen los procesos de transporte activo. De esta forma, el túbulo proximal presenta múltiples sistemas de transporte implicados en estos procesos. Por un lado los aniones son captados a través de los transportadores de aniones orgánicos (OAT) 1 y 3 localizados en la membrana basolateral y secretados por proteínas de resistencia a múltiples fármacos (MRP) 2 y 4 a través de la membrana apical. Por otro lado, los cationes son captados por el transportador de cationes orgánicos (OCT) 2 y eliminados por proteínas de extrusión de múltiples fármacos y toxinas (MATE) 1 y 2 y por la glucoproteína-P o proteína de resistencia a múltiples fármacos 1. (8)

El epitelio del túbulo proximal es una estructura compleja revestida por una matriz extracelular (ECM) formada por colágeno I, proteoglicanos y glucosaminoglicanos, y que tiene un papel fundamental en la morfogénesis del túbulo durante el desarrollo. El entorno de las células es muy importante para su diferenciación, concretamente la interacción con la membrana basal compuesta por laminina, colágeno IV y fibronectina. La unión de las integrinas y otros receptores transmembrana con estos componentes de la membrana basal desencadena una serie de vías de señalización que median la diferenciación. (9,10)

Tal y como se ha descrito, todas las interacciones a las que están sometidas las células RPTEC junto con los sistemas de transporte con los que están equipadas son fundamentales para la actividad de estas células. Por esta razón son considerados factores determinantes de su funcionalidad y por lo tanto puede ser de gran interés el desarrollo de nuevos modelos de cultivo que faciliten el mantenimiento de las características fisiológicas de las RPTEC.

2.3 Modelos tubulares renales

Con el fin de conservar todas las funciones del túbulo proximal nombradas anteriormente y que los cultivos celulares se mantengan diferenciados en el tiempo, se han desarrollado los modelos tubulares renales. Su construcción se basa en métodos elaborados de cultivo en el que se facilita un ambiente adecuado que desencadena la formación de los túbulos.

2.3.1. Modelos 2.5D

Células de origen renal como las RPTECs retienen su capacidad de desarrollar estructuras tubulares cuando se cultivan en las condiciones apropiadas. Las células se colocan sobre una capa de gel, cuya naturaleza química y propiedades físicas son críticas para la formación de dichas estructuras, y se cubren con un medio suplementado con factores de crecimiento que inducen la tubulogénesis. Este sistema de cultivo se denomina 2.5D y resulta muy útil para estudiar los fundamentos de la morfogénesis celular.

El colágeno de tipo I es el principal componente de la matriz extracelular que está en contacto con las RPTECs in vivo y por lo tanto es el sustrato más utilizado en la elaboración de estos geles. También es posible utilizar matrigel, una matriz compleja procedente de un tumor estromal que contiene una mezcla de compuestos que forman parte de la membrana basal y además proporciona factores de crecimiento. (11)

2.3.2. Modelos 3D

Los sistemas de cultivo 3D se basan en el mismo fundamento que los cultivos 2.5D. La principal diferencia es que en este caso las células no se sitúan sobre el gel sino dentro de este. Se ha comprobado que las células mezcladas con una matriz de colágeno o matrigel son capaces de formar estructuras tubulares de manera espontánea tras la polimerización de la mezcla.

En estos modelos las células quedan embebidas en el gel por lo que la disponibilidad de los nutrientes proporcionados a través del medio de cultivo como la eliminación de los productos generados por las células dependen de su difusión a través del gel. De esta forma los ensayos funcionales realizados en base al consumo o producción de estas sustancias están condicionados por esta característica del modelo.

Las células renales cultivadas en sistemas 2.5 D y 3D presentan mayor expresión de marcadores funcionales y una mayor sensibilidad a nefrotoxinas (12), lo que puede afirmar la importancia de un modelo de tubulogénesis que posibilite la realización de estudios funcionales más representativos. Este tipo de cultivo aplicado en células de TP debería proporcionar un modelo más próximo y similar a la morfología del túbulo proximal in vivo y por lo tanto la respuesta observada en él se debería acercar más a la respuesta real del organismo que la respuesta generada en un cultivo tradicional 2D. Además, el estudio de la morfogénesis tubular ha sido fundamental a la hora de establecer el papel que desempeñan las interacciones célula-célula o las interacciones célula-matriz en la diferenciación celular renal. Por estas razones, los modelos 2.5D y 3D no solo son necesarios para estudiar la respuesta del organismo ante la nefrotoxicidad producida por algunos fármacos sino también para entender el funcionamiento y los principios básicos de la actividad renal. (5)

Tabla 1.*Aspectos positivos y negativos de modelos renales de cultivo in vitro.*

	Ventajas	Desventajas
Modelos 2D	<ul style="list-style-type: none">- Modelos simples- Bajo coste- Elevada proliferación y multiplicación celular	<ul style="list-style-type: none">- Baja capacidad para simular un ambiente fisiológico- Dificultad de extrapolación de los resultados
Modelos 2.5D y 3D	<ul style="list-style-type: none">- Mejora del ambiente fisiológico- Buenos modelos para el estudio de nefrotoxicidad- Posibilidad de traslado de los resultados in vitro a una situación in vivo	<ul style="list-style-type: none">- Modelos nuevos todavía en estudio- El formato 3D no es recomendable en caso de utilización de técnicas de imagen.- Necesidad de adaptación a los nuevos sistemas

2.4 Nefrotoxicidad

Las células epiteliales renales del túbulo proximal son una de las principales dianas afectadas por la nefrotoxicidad inducida por fármacos debido a su papel en la concentración del filtrado glomerular y en el transporte y metabolismo de dichos fármacos. Algunos fármacos utilizados en el ámbito clínico y en situaciones como cáncer, sepsis, trasplantes y diagnóstico de imagen pueden generar daños renales. En este grupo de fármacos se incluyen aminoglicósidos, vancomicina, cisplatino y agentes de contraste ionizados para radiografía. (3)

Concretamente, el cisplatino es el fármaco utilizado en los ensayos de nefrotoxicidad realizados en este trabajo. Es un compuesto de platino efectivo en la terapia de numerosos carcinomas, sarcomas y linfomas. Tras el tratamiento quimioterápico, se acumulan grandes cantidades de cisplatino en el riñón, particularmente en el túbulo proximal. Este fármaco atraviesa las células epiteliales del túbulo proximal a través del transportador de cationes orgánicos (OCT2). La entrada en las células provoca daños en el ADN tanto nuclear como mitocondrial y esto conduce a la apoptosis de las células del túbulo proximal, causando un daño renal agudo. (3)

2.5 Antecedentes

Durante muchos años los cultivos 2D se han utilizado para estudiar la fisiología, farmacología y patología renales. En las últimas décadas el estudio de la influencia del microambiente celular sobre la morfogénesis se ha apoyado en la utilización de cultivos tridimensionales basados en geles de colágeno.

Se ha descrito un sistema de cultivo que permite que una línea celular de epitelio renal canino Madin-Darby (MDCK) forme estructuras tridimensionales cuando se coloca entre finas capas de gel que actúan simulando una matriz extracelular. Cuando las células MDCK se cultivan en un gel de colágeno tipo I forman estructuras polarizadas denominadas quistes, demostrando que este microambiente controlado promueve la morfogénesis epitelial. (13) Otros tipos celulares como la línea inmortalizada de células corticales epiteliales renales humana muestran un desarrollo más avanzado de estructuras tubulares 3D cuando se cultivan en una mezcla de matrigel y colágeno tipo I. (12)

Las aproximaciones más recientes se basan en la aplicación de aparatos de microfluídica que permiten el cultivo de células en canales de perfusión. Con estos sistemas se pretende recrear la fisiología de un tipo celular particular y conseguir una respuesta lo más similar posible a la generada in vivo. (14)

En el presente trabajo se utiliza la línea celular RPTEC/TERT1, una línea inmortalizada de células epiteliales de túbulo proximal renal humano. Estas células se caracterizan por un crecimiento ilimitado mientras mantienen la expresión de marcadores específicos, morfología epitelial, uniones estrechas funcionales y actividad transportadora. Los estudios acerca de la capacidad morfogénica de estas células son escasos, lo que ha despertado el interés en la utilización de esta línea celular para analizar el procedimiento de tubulogénesis.

3. HIPÓTESIS

Los modelos de cultivo convencionales de células renales no constituyen una herramienta fiable para predecir la respuesta del organismo porque no se asemejan lo suficiente a la organización y morfología real de las diferentes estructuras del riñón in vivo. Por esta razón un modelo más próximo a la realidad puede resultar muy útil para reducir la falta de reproducibilidad de la respuesta celular frente a tóxicos y para el estudio de los mecanismos involucrados en la reparación tras un daño renal.

3.1 Objetivo general

Desarrollo de un sistema de cultivo en el que las células se mantienen diferenciadas y conservan su fenotipo de túbulo proximal para evaluar el efecto de la nefrotoxicidad del cisplatino. En este sistema se desencadena un proceso de tubulogénesis en el que las células, además de diferenciarse, adquieren una estructura tridimensional que mimetiza la morfología del túbulo in vivo. Para llevarlo a cabo es necesario proporcionar un ambiente y unas condiciones adecuadas que van a favorecer las uniones entre las células y la formación de los túbulos.

3.2 Objetivos específicos

1. Tubulogénesis de túbulo proximal in vitro a partir de células epiteliales de túbulo proximal renal (RPTECs) humanas.
2. Caracterización genotípica de las células utilizando marcadores proteicos tanto de epitelio como específicos de diferentes segmentos de la nefrona.
3. Evaluación de la expresión y localización subcelular de marcadores epiteliales en las estructuras tubulares mediante inmunofluorescencia.
4. Estudio de la viabilidad celular tras el tratamiento con cisplatino y comparación de la supervivencia celular en el modelo tubular y en un sistema clásico de cultivo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cultivo celular

La línea celular de trabajo es RPTEC/TERT1, una línea de células epiteliales de túbulo proximal renal humano inmortalizada utilizando la subunidad telomerasa transcriptasa reversa humana (hTERT). Las células se mantienen en incubador a una temperatura de 37°C y en una atmósfera de 5% CO₂ en medio BioWest 5 (BW5C). Este medio contiene DMEM-F12 (BioWest) con 5 mmol/l de glucosa, HEPES (Biochrom AG L1613) a una concentración de 10mM, GlutaMax-I (Gibco 35050-038) 2mM, 10ng/ml hEGF (Sigma E9644), T3 (Sigma T6397) 5 pM, 3.5 µg/ml ácido L-ascórbico (Sigma A4544), 5 µg/ml Holo Transferrina (Merck 616424), 25 ng/ml prostaglandina E1 (Sigma P8908), 25 ng/ml hidrocortisona (Sigma H0396), 8.65 ng/ml selenito de sodio (Sigma S5261), 100 µg/ml G418 (InvivoGen ant-gn-5) y 5 µg/ml insulina (Sigma I9278).

Para realizar los subcultivos en primer lugar se lavan las células con PBS (Lonza), después se añade tripsina-EDTA 0,05% (Gibco, 25300054) para la separación de las células y se detiene la tripsinización con un inhibidor de tripsina o DTI (Gibco, R007100). Tras el conteo celular, las células se subcultivan en una placa de 96 pocillos (25000 cels/pocillo) en la que forman una monocapa, sirviendo como células control para cada uno de los ensayos realizados. Se hace un seguimiento diario de los cultivos para examinar el estado de las células y se cambia el medio de cultivo en días alternos. Durante los primeros días tiene lugar un crecimiento de las células y en el día 7 es cuando las células han alcanzado por lo menos el 90% de la confluencia, momento en el que se efectúan los diferentes ensayos.

4.2 Modelo de tubulogénesis 2.5D sobre hidrogeles

Para la tubulogénesis se hace un segundo subcultivo de manera paralela a la placa control de 96 pocillos. Las células se mantienen en cultivo 7 días de la misma forma que en la placa control.

Los hidrogeles necesarios para la tubulogénesis se preparan en el interior de los pocillos de un dispositivo de cultivo diseñado para el modelo de angiogénesis (Ibidi). Este dispositivo, en formato portaobjetos (slide) contiene 15 pocillos y cada uno puede albergar un gel de 10 µl y 50µl de medio, lo que supone un notable ahorro de reactivos sobre otros dispositivos. Los hidrogeles están compuestos por una mezcla de Matrigel (MG) 10% y Colágeno tipo I (Col I) 90%. Se colocan 10 µl de la mezcla Col I – MG (tabla 3 anexo I) en cada pocillo del slide y se deja polimerizar durante 15 minutos.

Se prepara 1 ml de células en una concentración de $1,8 \times 10^5$ células/ml y se añade MG a una concentración final del 5%. Es decir, a 760 µl del preparado celular se añaden 40 µl de MG para tener un volumen final de 800 µl. Una vez polimerizados los hidrogeles, se añaden 50 µl de la mezcla con las células en cada pocillo.

4.3 Extracción y cuantificación de ARN

Las células control se cultivan en cinco pocillos de una placa de 96 y las células de tubulogénesis en un slide completo. Se mantienen en cultivo 7 días cambiando de medio en días alternos hasta que las células control llegan a un 90-100% de confluencia. El ARN de las células control y tubulogénesis se extrajo utilizando en ambos casos el kit de purificación de RNA total (cat.

37500, Norgen Biotek Corp). La tecnología de purificación de este kit se basa en la retención en columna con resina de afinidad por ARN que permite separar el ARN de otros componentes celulares sin utilizar fenol o cloroformo. El proceso comienza con el lavado de los pocillos con PBS y el lisado de las células utilizando el Buffer RL. Se añade etanol al lisado y se incorpora a una columna que tiene la resina a la que solo se une el ARN por lo que los contaminantes son eliminados. Tras tres repeticiones de lavado de columna con el buffer de lavado y centrifugación, se añade el buffer de elución para recuperar el ARN.

Para cuantificar el ARN y evaluar su pureza se utiliza un espectrofotómetro de micro volúmenes NanoDrop. Se mide la absorbancia a 260 nm y 280 nm que corresponde a la absorbancia de los ácidos nucleicos y las proteínas respectivamente. El ratio 260/280 es un indicativo de la pureza de la muestra. Este ratio debe estar entre 1.8 y 2 para considerar que la pureza de la muestra es óptima y si está por debajo de 1.6 indica la presencia de compuestos aromáticos. También se mide la absorbancia a 230 nm que es la longitud de onda a la que absorben contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o glúcidos. El ratio 260/230 tiene que estar entre 1.5 y 2.2 y si está por debajo de 1.5 indica contaminación por sales, fenoles o glúcidos. Una vez cuantificado, el ARN recuperado se conserva a -80°C hasta su uso.

4.4 RT-PCR

Los transcritos se amplifican utilizando un kit de transcripción reversa de alta capacidad de ADNc que contiene todos los elementos necesarios para la conversión de ARN total a ADNc monocatenario en una única reacción. Se prepara la mezcla de reacción añadiendo 1 µl de RT Buffer, 0.4 µl de deoxinucleótidos, 1 µl de cebadores aleatorios, 0.5 µl de transcriptasa reversa (MultiScribe), 4.2 µl de RNA y agua de biología molecular hasta completar 10 µl.

La técnica RT-PCR de multiplex permite amplificar diferentes secuencias de ADN de una misma muestra simultáneamente. En este caso se llevan a cabo 12 reacciones combinadas en 4 mezclas con 3 parejas de cebadores en cada una de ellas. En la tabla 4 (anexo II) se recogen los marcadores incluidos en cada una de las mezclas de amplificación junto con el tamaño del fragmento que puede obtenerse si se da la amplificación y su localización.

Tras preparar la mezcla, se coloca en el termociclador siguiendo un programa de 25°C (10 minutos), 37°C (120 minutos), 85°C (5 minutos) y 4°C hasta la recogida de la reacción del termociclador.

Una vez realizada la amplificación se lleva a cabo una electroforesis en gel al 2% de agarosa. Para obtener un volumen final de 100 ml de gel se mezclan 2 g de agarosa en polvo, 100 ml de buffer SB y se calienta en el microondas. A continuación se deja enfriar y se añaden 5 µl de bromuro de etidio, un compuesto que se intercala entre las bases del ADN y genera fluorescencia cuando se ilumina con luz Ultravioleta. La mezcla se coloca en el soporte una vez nivelado y se deja gelificar con un peine de 15 púas para formar los pocillos. Se cargan 12 µl de una mezcla formada por 4 µl de tampón de carga y 8 µl de muestra en cada uno de los pocillos y se añade en un pocillo adicional un marcador de peso molecular de 100 pb, (que cubre el intervalo de 100 a 1000 pb). El tampón de carga contiene sucrosa o glicerol que aportan peso a la muestra facilitando que no se salga del pocillo, además de conducir la corriente y controlar el pH a lo

largo del gel. Una vez cargadas las muestras se aplican 200 V durante un periodo de tiempo de 40 minutos. Por último el gel se visualiza en un transiluminador Ultravioleta.

4.5 Expresión y localización subcelular de marcadores epiteliales mediante inmunofluorescencia

Las células se cultivan en una placa de 8 pocillos y se mantienen en cultivo 7 días antes de llevar a cabo la tinción. Se comparan tres condiciones variando el protocolo inicial de tubulogénesis. La primera condición es el cultivo de las células sobre hidrogel sin 5% de MG en el medio, la segunda condición el cultivo con 5% de MG pero sin gel y la tercera condición la combinación de ambos, hidrogel y 5% de MG. A continuación, se detallan los pasos a seguir para realizar la inmunotinción. Antes de cada paso se hacen lavados con 200 µl de tampón fosfato salino (PBS) 1x, compuesto por NaCl (Sigma S9888), NaH₂PO₄ (Sigma S9638) y Na₂HPO₄ 7 H₂O (Sigma S9390), con el objetivo de eliminar los restos de solución empleada en el paso anterior.

1. Fijación de las células que se van a teñir incubando con paraformaldehído (PFA) 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. El paraformaldehído es un polímero de formaldehído sólido que se disuelve en tampón PBS 10x para obtener la solución de trabajo.
2. Permeabilización de la membrana incubando las células con tritón x100 0,2% durante 10 minutos a temperatura ambiente. El tritón x100 es un detergente surfactante que actúa sobre la superficie de las células provocando la lisis celular por rotura de la membrana plasmática y liberación del contenido citoplasmático. En la tinción inmunoquímica se utiliza una concentración muy baja de este compuesto para que no solubilice la membrana y solo cree poros a través de los cuales van a entrar todos los elementos utilizados en la tinción.
3. Desactivación fluorescente incubando con la solución de desactivación, que contiene PBS 10x, NH₄Cl y agua miliQ, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Este paso es necesario para rebajar la autofluorescencia del tejido, en este caso de las estructuras 2.5D
4. Bloqueo de las muestras incubando con la solución de bloqueo, que contiene PBS 10x, BSA, suero de cabra y agua miliQ, durante 30 minutos a temperatura ambiente. El bloqueo permite saturar los posibles sitios de unión inespecíficos.
5. Adición del anticuerpo primario e incubación a 4°C durante una noche. Los anticuerpos primarios utilizados son ZO-1 de conejo (Invitrogen 40-2200) y tubulina acetilada de ratón (Sigma T6793), ambos con una dilución 1:200 en solución de bloqueo.
6. Adición del anticuerpo secundario e incubación a temperatura ambiente en oscuridad durante una hora. Los anticuerpos secundarios utilizados son Alexa Rb-488 (Invitrogen) para ZO-1, Alexa Ms-546 (Invitrogen) para tubulina acetilada y Faloidina-TRITC (Sigma P1951) para la actina. Todos los anticuerpos están diluidos 1:500 en solución de bloqueo.
7. Tinción con DAPI (DAPI 5mg/ml 1:1000 en PBS). DAPI es un marcador fluorescente que se une fuertemente a secuencias de ADN en regiones enriquecidas en adenina y timina por lo que va a teñir los núcleos de las células. Tiene un máximo de absorción a una longitud de onda de 358nm (ultravioleta) y un máximo de emisión a 461 nm (azul). Por lo tanto DAPI es excitado con luz ultravioleta para después ser detectado a través de un filtro azul.

La inmunofluorescencia se detecta mediante un objetivo de inmersión 60x en microscopio confocal Nikon ECLIPSE Ti con software EZ-C1 silver versión 3.91.

4.6 Ensayo de citotoxicidad

La determinación de la viabilidad celular tras el tratamiento con cisplatino es un ensayo que permite medir la actividad enzimática de las células basándose en la capacidad metabólica que tienen las células viables para reducir el reactivo PrestoBlue (PB). Consiste en una solución de resazurina, un compuesto no tóxico, no fluorescente de color azul con permeabilidad de membrana, que al añadirse al medio se introduce en las células y es reducido por estas, pasando de resazurina a resafurina. La resafurina es de color rojo y fluorescente y se puede medir su concentración excitando la muestra con una longitud de onda de 530 nm y midiendo la fluorescencia a 590 nm. Las células que mantienen su poder reductor son las viables, por lo que la cantidad de resafurina producida será proporcional a la viabilidad celular.

El ensayo de citotoxicidad se realiza en una placa de 96 pocillos con las células control en monocapa y en un slide de tubulogénesis. Las células se cultivan siguiendo el protocolo explicado en el apartado de tubulogénesis y se mantienen 7 días en cultivo antes de realizar el ensayo.

Se hace de manera simultánea en la placa control (96 pocillos) y en el slide aunque el protocolo presenta algunas diferencias. En la placa control se elimina el medio y se lava con HBSS antes de añadir la solución de PB 5% (PB 1:20 en DMEM sin rojo fenol). A continuación se incuba a 37 °C durante 30 minutos y se lee la fluorescencia de la placa en el lector (BioTek Synergy HT) durante 20 minutos en los que se realizan dos lecturas. En la placa de tubulogénesis no se lava con HBSS, la solución de PB es del 10% y no se incuba antes de las lecturas, que en este caso son 4 en 40 minutos. En ambos casos se mantienen pocillos sin células pero que reciben el mismo tratamiento para obtener una lectura blanco que se restará a las lecturas del resto de pocillos con células. De esta forma se elimina el efecto de las diferentes disoluciones utilizadas en el protocolo.

Un método simple para determinar la densidad celular es la tinción con cristal violeta (CV), un colorante que interacciona con las proteínas y el ADN. Durante la muerte celular las células RPTEC que son adherentes se desprenden del fondo de la placa de cultivo. Esta característica se puede usar para la cuantificación indirecta de la muerte celular tras el tratamiento con cisplatino. Para realizar el ensayo es necesario fijar las células con metanol, incubar 30 minutos con CV 0,1% (Sigma C0775) disuelto en agua destilada y disolver los cristales formados con ácido acético 10% disuelto en agua destilada antes de medir la absorbancia.

5. RESULTADOS

5.1 Tubulogénesis de células RPTEC

En los sistemas 2.5D el cultivo de las células RPTEC en contacto con colágeno tipo I y todos los componentes del matrigel, entre los que se incluyen lamininas, colágeno tipo IV, proteoglicanos como heparán sulfato y factores de crecimiento, favorece la morfogénesis y el desarrollo de estructuras tubulares.

El protocolo de tubulogénesis comienza con el cultivo de las células RPTEC sobre los hidrogeles preparados y polimerizados previamente que consisten en una mezcla de MG y Col I, 10% y 90% respectivamente (Fig. 2). El medio de cultivo que cubre las células adheridas al gel tiene un 5% de matrigel adicional, lo que implica la presencia de una cierta cantidad de proteínas propias de la matriz extracelular también en este medio. El resultado de este tipo de cultivo es la formación de estructuras tubulares (Fig. 3) similares a las observadas in vivo y el desarrollo de una arquitectura más fisiológica que en los cultivos convencionales 2D.

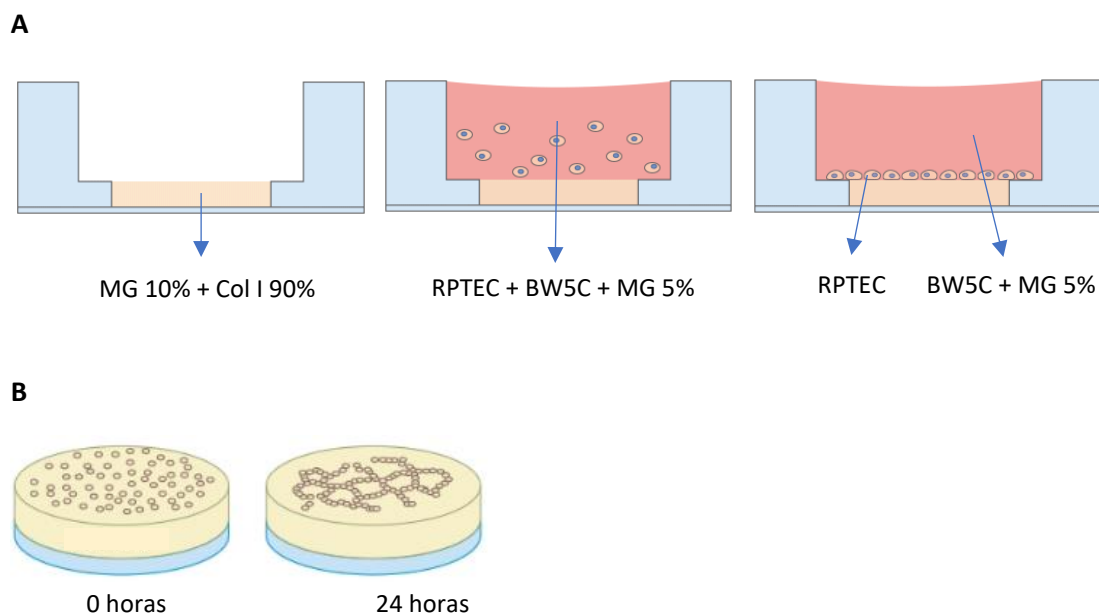


Figura 2. Esquema representativo del proceso de obtención del sistema de cultivo 2.5D. Ilustración modificada a partir de recurso obtenido de ibidi GmbH.

A. En el fondo del pocillo de placas IBIDI se coloca la mezcla de MG y Col I que polimeriza formando una capa de hidrogel. Sobre ella se disponen las células en medio de cultivo BW5C con 5% de MG. Las células caen al fondo y se adhieren al gel. B. Tras 24h en el cultivo se pueden observar estructuras tubulares.

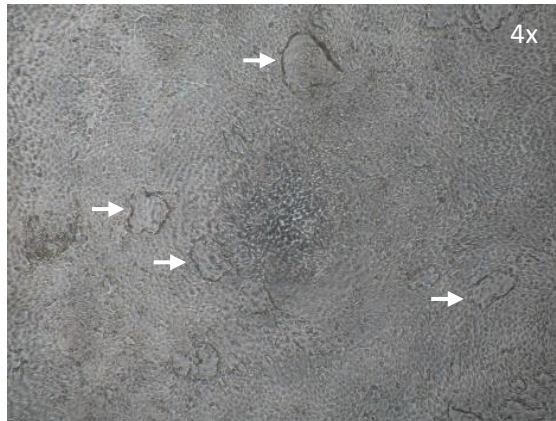
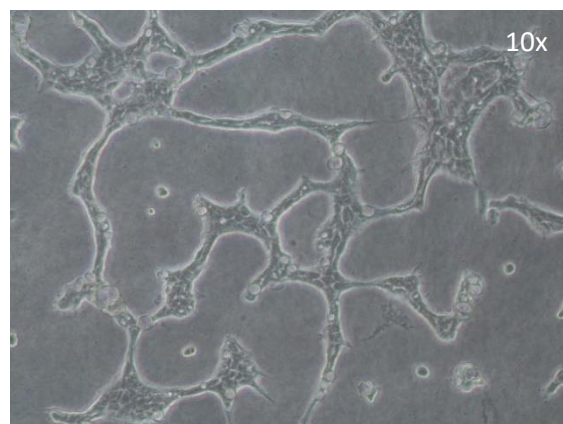
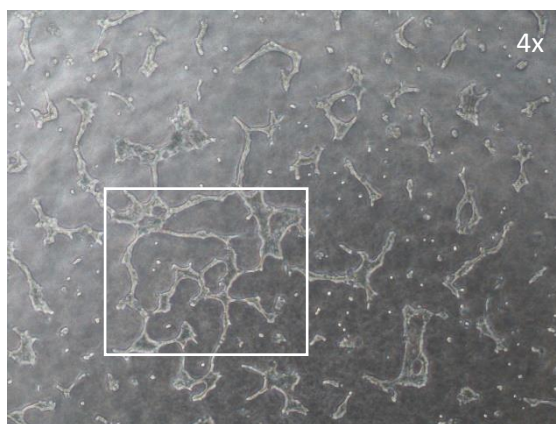
A**B**

Figura 3. El cultivo de células RPTEC sobre hidrogeles induce la morfogénesis tubular. Las imágenes han sido tomadas con microscopio Nikon Eclipse TS100.

A. Cultivo 2D de las células RPTEC en placa de 96 pocillos sobre plástico. Las células forman una densa monocapa tras 7 días de cultivo, momento en el que alcanzan la confluencia. En la imagen aparecen señalados los domos (flechas blancas), unas estructuras características formadas por este tipo de células en cultivo. B. Cultivo 2.5D de las células RPTEC en slide sobre hidrogel. En estas condiciones las células desarrollan estructuras tubulares a las pocas horas de iniciar el cultivo y alcanzan el máximo desarrollo a las 24h. La región resaltada en el cuadro blanco corresponde a lo observado en la imagen de mayor aumento y es un ejemplo de las redes tubulares observadas en estos cultivos 2.5D.

5.2 Caracterización genotípica de las células RPTEC

Una de las metas que se desea alcanzar con los modelos tubulares 2.5D es la máxima diferenciación de las RPTEC. Se ha visto que con el cultivo en un ambiente adecuado las células se disponen en forma de túbulos como consecuencia del contacto con los componentes del MG y el Col I. Estas estructuras resultantes se aproximan a la arquitectura del túbulo proximal in vivo, sin embargo, es necesario confirmar que las células mantienen el fenotipo de RPTEC y que no han perdido diferenciación o se han diferenciado a un fenotipo diferente.

El estudio de la transcripción de marcadores epiteliales y marcadores específicos de diferentes segmentos de la nefrona así como marcadores funcionales es una de las principales aproximaciones utilizadas para comprobar el fenotipo de las células y establecer la identidad del cultivo, además de determinar el nivel de heterogeneidad celular.

Tras la extracción del ARN de las células control y las células de tubulogénesis se realizó una cuantificación para conocer la cantidad de material extraído en ambas muestras (tabla 5).

La muestra control es resultado de la extracción del ARN en 5 pocillos de la placa de 96 y la muestra de tubulogénesis se ha obtenido con la extracción de todos los pocillos en el slide. La relación de absorbancia 260/280 próxima a 2 indica que las muestras tienen una elevada pureza y no hay contaminación con proteínas. El ratio 260/230 de 1,92 en las células control indica que no hay contaminaciones por sales. Sin embargo en la muestra de tubulogénesis está por debajo de 1,5 lo que indica la presencia de contaminantes. Esta contaminación se debe a la presencia del gel en los pocillos. Se puede observar que la cantidad de ARN obtenido en la muestra de tubulogénesis es muy inferior al de la muestra control. Esto se debe a que la proliferación de las células en los túbulos es menor que en la monocapa. Este dato permite ajustar la dilución de las muestras para trabajar con la misma cantidad de material en la amplificación.

Tabla 5.

Cuantificación con Nanodrop del ARN extraído.

Muestra	Concentración (ng/ μ l)	260/280	260/230
Control	124,6	2,07	1,92
Tubulogénesis	31,7	2,01	0,78

En la amplificación se utilizan 4 mezclas con 3 pares de cebadores cada una que corresponden a diferentes marcadores de expresión epitelial y marcadores específicos de diferentes segmentos de la nefrona (tabla 4 anexo II). Después de la amplificación el resultado se separa en una electroforesis en gel al 2% de agarosa y se toma una imagen en transiluminador ultravioleta (Fig.4)

KSP-cadherina (KSP) es un marcador epitelial renal. Megalina y dipeptidil peptidasa IV (DPP4) en el mix 1, cotransportador sodio-glucosa (SGLT2) en el mix 2, aminopeptidasa (APN) y γ -glutamyltransferasa-1 (GGT1) en el mix 3 son marcadores de expresión específicos de túbulo proximal. Todos ellos, a excepción de la megalina, aparecen como resultado de la amplificación confirmando el fenotipo de las células (Fig. 4). Es posible que la ausencia de banda correspondiente a la megalina se deba a una menor expresión de este gen. Por otro lado, el marcador de desdiferenciación α SMA aparece en la mayoría de los cultivos en los que las células se encuentran en proliferación. Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) es un gen ubicuo de expresión constitutiva que se utiliza como control interno.

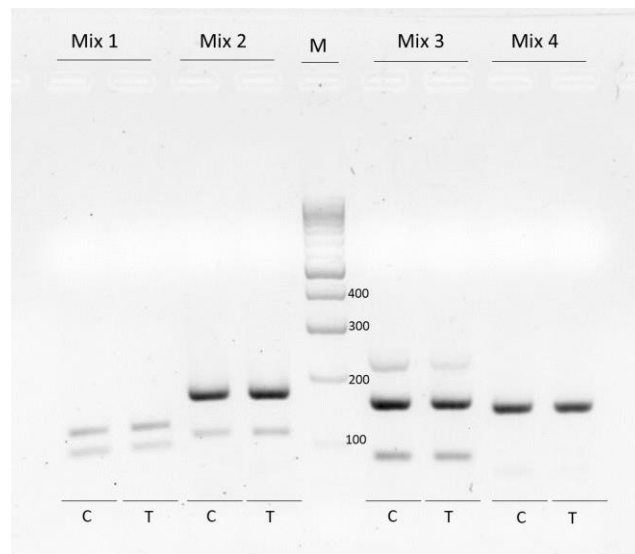


Figura 4. Caracterización genotípica de las células RPTEC mediante el estudio de la transcripción de marcadores epiteliales y marcadores específicos de segmentos de la nefrona a través de la técnica RT-PCR de alta capacidad. Imagen obtenida con transiluminador Ultravioleta. Resultado electroforesis en gel 2% agarosa. En el centro del gel se dispone el marcador de peso molecular (M) con las bandas de 100 a 400 pares de bases señaladas. Cada mezcla incluye dos carriles que corresponden a la muestra de las células control (C) y la muestra de las células de tubulogénesis (T) respectivamente.

5.3 Expresión y localización subcelular de marcadores epiteliales mediante inmunofluorescencia

Con análisis de inmunofluorescencia se busca una caracterización morfológica de las RPTEC utilizando los anticuerpos para ZO-1, actina y tubulina acetilada. Se comparan tres condiciones variando el protocolo inicial de tubulogénesis para ver si existen diferencias en los túbulos formados. La primera condición es el cultivo de las células sobre hidrogel sin 5% de MG en el medio, la segunda condición el cultivo con 5% de MG pero sin gel y la tercera condición la combinación de ambos, hidrogel y 5% de MG.

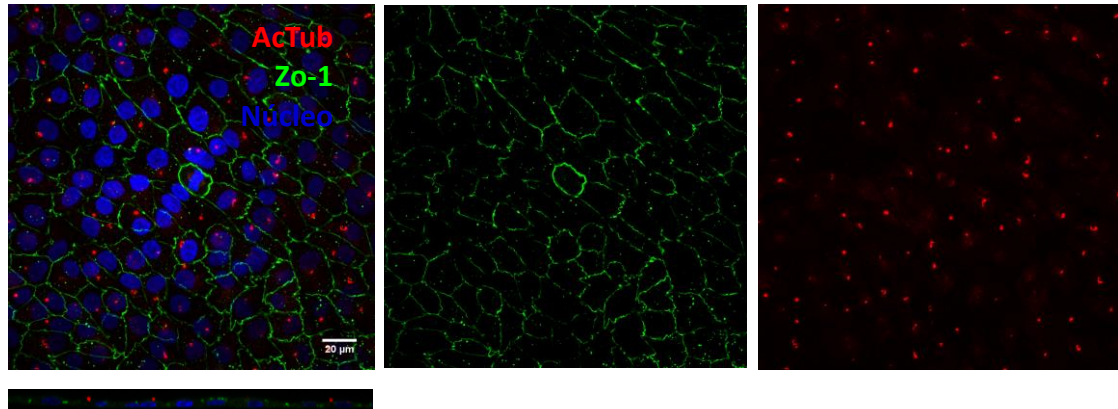
El cultivo de las RPTEC sobre una capa de hidrogel pero sin 5% de MG en el medio que las cubre revela que las células no forman túbulos sino una monocapa confluyente y bien definida (Fig. 5). La tinción es positiva tanto para ZO-1 como para tubulina acetilada, ambos marcadores específicos de las células epiteliales.

La utilización de anticuerpo para ZO-1 permite observar una distribución lineal de la proteína y confirma la existencia de uniones estrechas entre las células (Fig. 5 A y B). Se emplea un anticuerpo dirigido a la tubulina acetilada (Fig. 5A) para detectar los cilios, estructuras presentes en las células epiteliales y que son fundamentales para la regulación de la morfología tubular. La organización del citoesqueleto de las células se pone de manifiesto a través de la tinción de la actina (Fig. 5B). Se observa una polimerización de los filamentos de actina que forman las denominadas fibras de estrés.

Las estructuras tubulares formadas por las RPTEC, tras el cultivo sobre hidrogel y en medio BW5C con 5% MG, se observan como un conjunto de células RPTEC que se disponen diferenciando dos compartimentos. La superficie basal de las células queda dirigida hacia el exterior del túbulo y la superficie apical en contacto con el lumen o interior del túbulo. Estas superficies están caracterizadas por una expresión diferencial de proteínas de membrana y sistemas de transporte implicados en el correcto funcionamiento del túbulo proximal. La expresión de la proteína de unión estrecha ZO-1 demuestra la existencia de las uniones estrechas en estas células (Fig. 6 A y B). El análisis de la tubulina acetilada es positivo y manifiesta la presencia de los cilios, que en este caso están localizados hacia el lumen (Fig. 6A). Por su parte la tinción de los filamentos de actina muestra que, como ocurre en la monocapa, las células RPTEC con arquitectura tubular poseen un citoesqueleto con la actina polimerizada y formando fibras de estrés (Fig. 6B). (15)

El cultivo de las células RPTEC en medio BW5C con 5% MG pero sin una base de hidrogel muestra el desarrollo de túbulos también en estas condiciones (fig 6C). Sin embargo se pueden observar algunas diferencias entre los túbulos formados sobre hidrogel y en medio BW5C con 5% MG y los túbulos formados únicamente en presencia de MG. Estos últimos presentan un menor tamaño y tienen una estructura más aplanada. Debido a las diferencias de grosor de los túbulos observados las imágenes en Z (Fig. 6) no tienen el mismo tamaño en los tres casos ya que tienen diferente número de planos. Se observa también un menor número de estructuras tubulares y una mayor cantidad de pequeñas formaciones circulares. De esta forma se confirma que las condiciones más favorables para el desarrollo de estructuras tubulares son el cultivo sobre hidrogeles y en presencia de una pequeña cantidad de MG en el medio.

A



B

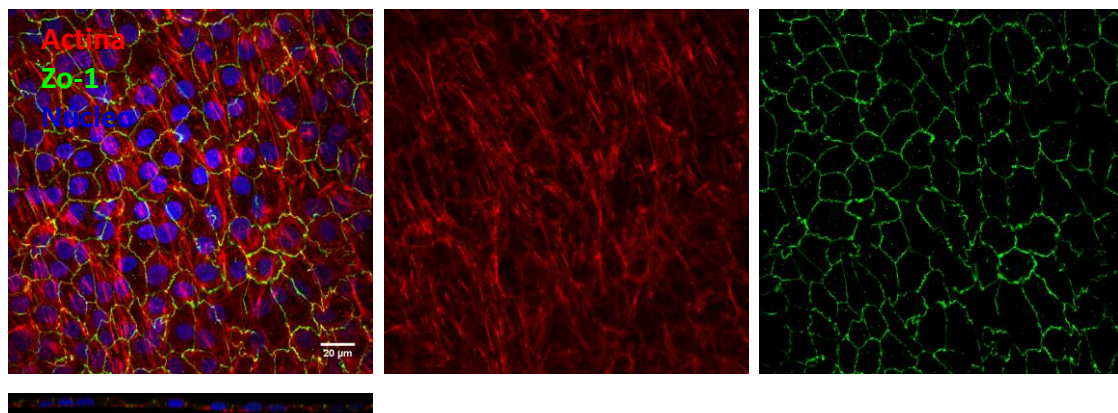


Figura 5. Monocapa de células RPTEC-TERT1 situada sobre hidrogel tras 7 días de cultivo. Inmunofluorescencia observada con microscopio confocal Nikon ECLIPSE Ti y software EZ-C1 silver versión 3.91. Ajuste de las características de imagen y composición de los diferentes canales con programa de imagen Fiji-Image J. A. La expresión del marcador epitelial ZO-1 (verde) confirma la formación de uniones estrechas entre las células. El análisis de tubulina acetilada (rojo) muestra la formación de los cilios. B. La tinción de la actina (rojo) permite ver la organización del citoesqueleto de las células. Los filamentos de actina están muy polimerizados y se encuentran formando las fibras de estrés.

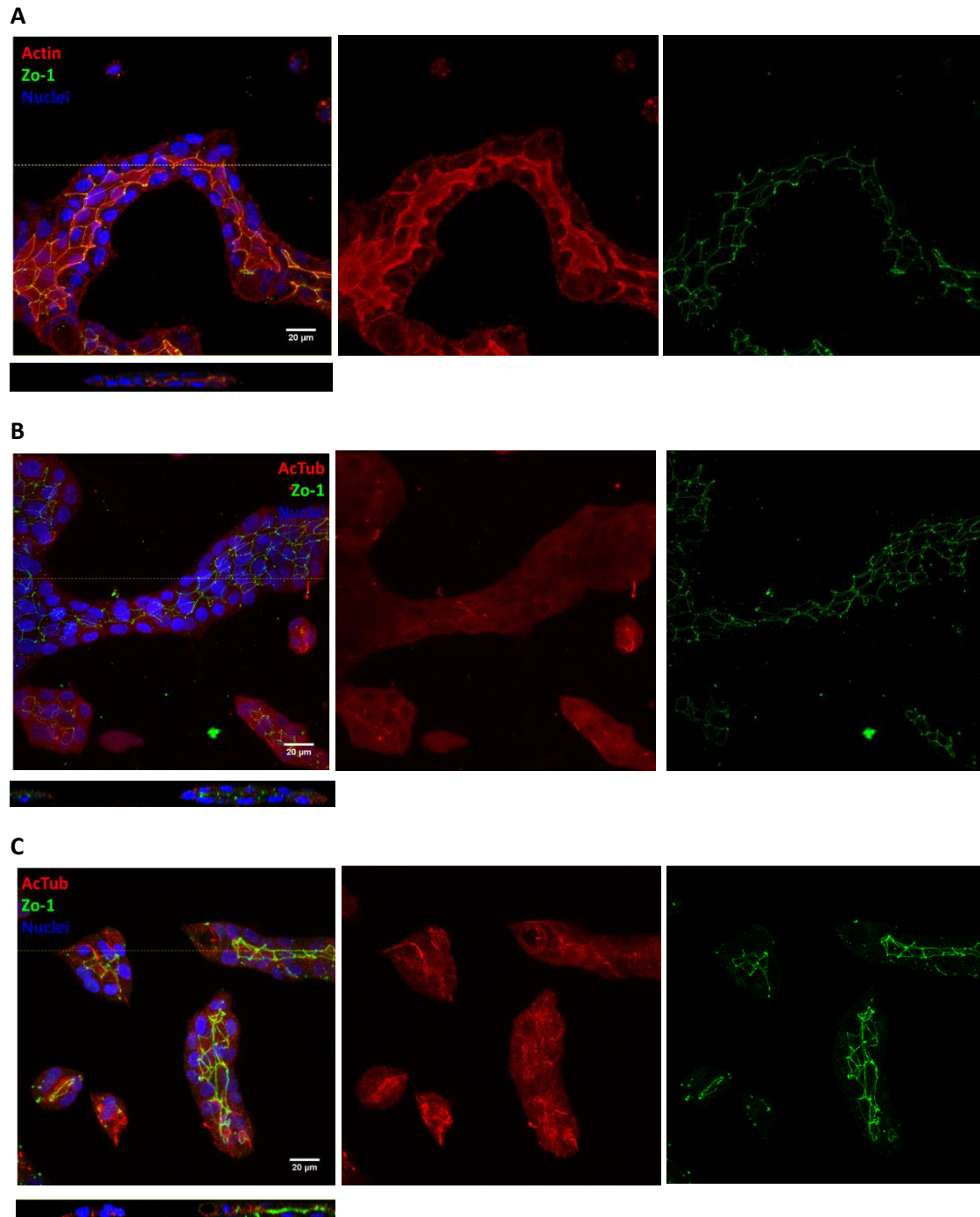


Figura 6. Estructuras tubulares de RPTEC/TERT1. Inmunofluorescencia observada con microscopio confocal Nikon ECLIPSE Ti y software EZ-C1 silver versión 3.91. Ajuste de las características de imagen y composición de los diferentes canales con programa de imagen Fiji-Image J. A. Túbulos sobre hidrogel y en medio BW5C con 5% de MG. Los núcleos (azul) están localizados hacia la periferia del túbulo y la distribución de ZO-1 (verde) confirma la polarización de las células y la existencia de un espacio interior o lumen en el túbulo. B. Túbulos sobre hidrogel y en medio BW5C con 5% de MG. La tinción de tubulina acetilada revela la formación y localización de los cilios (flecha blanca). C. Túbulos en medio BW5C con 5% MG sin hidrogel. Tinción positiva de ZO-1 y tubulina acetilada. Plano correspondiente a la imagen en Z resaltado con línea discontinua amarilla.

5.4 Estudio de la viabilidad celular tras el efecto nefrotóxico del cisplatino

Para evaluar si hay un cambio fenotípico en las células RPTEC cuando se usa el modelo tubular 2.5D se empleó el nefrotóxico cisplatino. El ensayo de nefrotoxicidad comienza con el tratamiento de cisplatino (CDDP) tras 7 días de cultivo. Las células se exponen a diferentes concentraciones del nefrotóxico durante 24 h y una vez transcurrido el tiempo de tratamiento se cambia el medio con cisplatino por medio fresco BW5C manteniendo las células 24 h más en incubador a 37°C y en atmósfera de 5% CO₂ antes de evaluar los efectos del cisplatino.

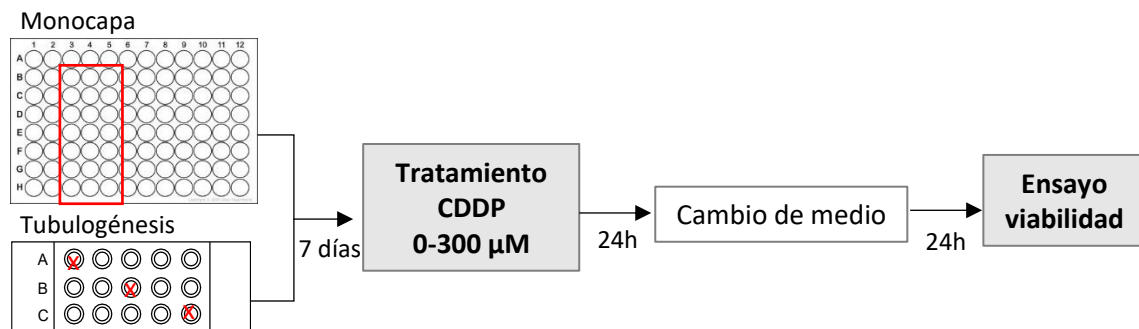


Figura 7. Diseño experimental del ensayo de viabilidad realizado simultáneamente en la placa de 96 pocillos correspondiente a las células en monocapa y en el slide de tubulogénesis. En la placa control los pocillos B-H de las columnas 3-5 (cuadro rojo) se exponen a diferentes concentraciones de cisplatino (0, 5, 15, 30, 50, 100 y 300 µM) por triplicado. En los tres pocillos superiores (fila A) no se cultivan células y se utilizan para calcular el blanco. En el IBIDI las concentraciones de cisplatino se disponen por duplicado y se conservan tres pocillos sin tratamiento como control (cruz roja).

Los efectos producidos por el cisplatino sobre la morfología de las RPTECs son observables a simple vista 24 h después del tratamiento tanto en la placa control de monocapa como en el slide de tubulogénesis.

En las células en monocapa se producen cambios morfológicos como consecuencia de la muerte celular en respuesta a la concentración creciente de cisplatino. Las concentraciones más bajas de 5 y 15 µM no tienen un efecto apreciable y las células apenas se diferencian de las células control que no han sido tratadas (0 µM). A partir de 30-50 µM se ve un mayor efecto y el máximo se observa en los pocillos de 100 y 300 µM. En los túbulos se observa el mismo efecto dependiente de la concentración de platino, siendo los pocillos con una concentración de 100 y 300 µM de CDDP los más afectados por el tratamiento.

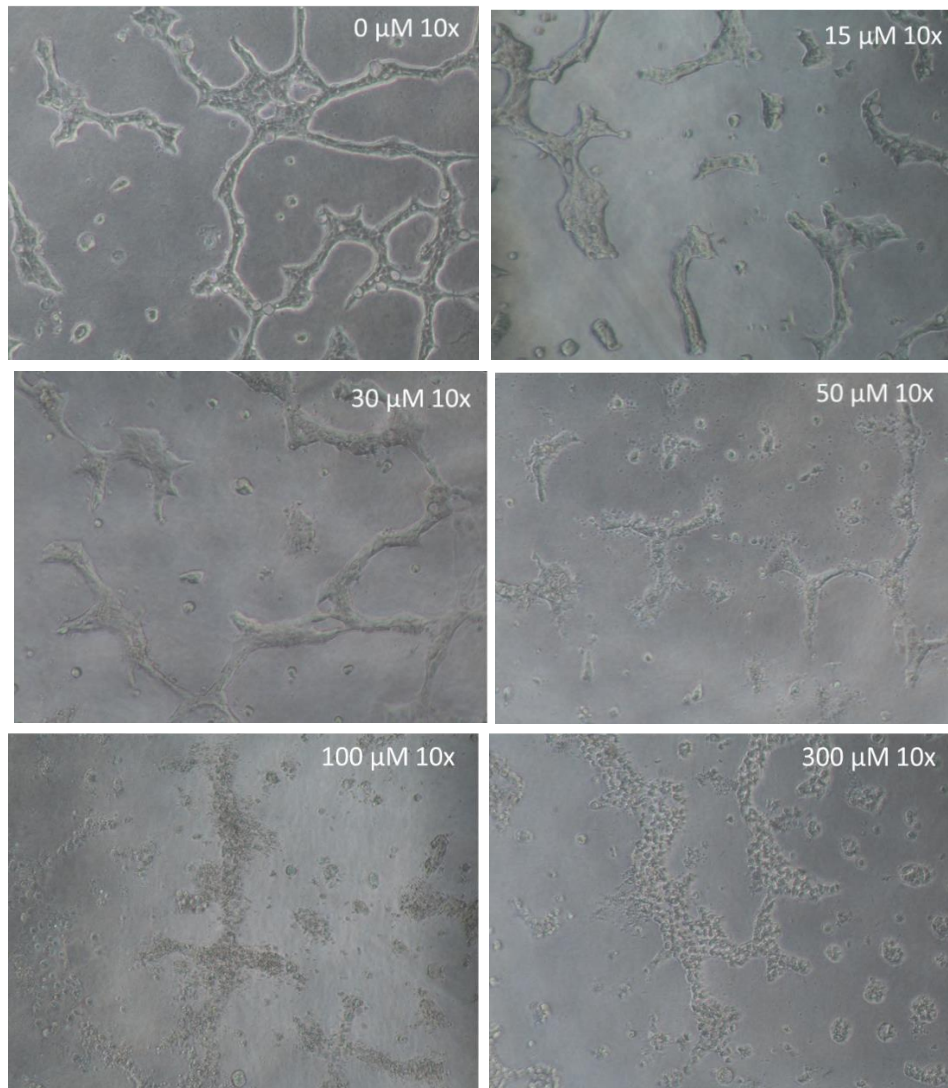


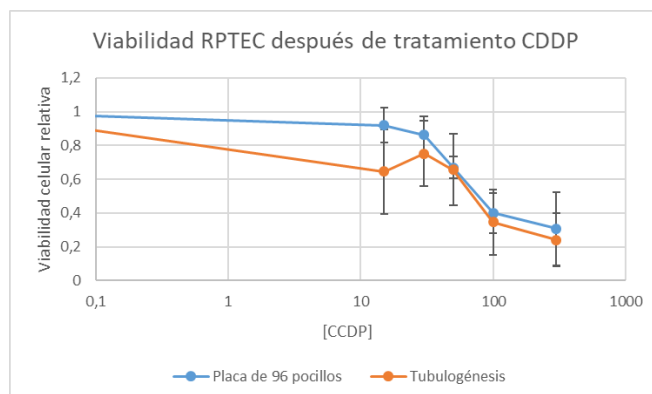
Figura 8. Efecto del tratamiento con CDDP (0-300 µM) en slide de tubulogénesis. Imágenes obtenidas con microscopio Nikon Eclipse TS100. Las células expuestas a diferentes concentraciones de CDDP sufren cambios morfológicos asociados a la muerte celular. Los pocillos con concentraciones superiores a 50 µM de CDDP son los que presentan más diferencias respecto al control.

La técnica utilizada para analizar la viabilidad se basa en la medida de la actividad reductora de las células mientras que la densidad se mide con la utilización de un colorante que se une al ADN de las células. Aunque son técnicas con un fundamento diferente ambas permiten conocer la cantidad de células presentes y contrastar los resultados. Tanto en la placa control con células RPTEC en monocapa como en el slide de tubulogénesis la viabilidad celular descende a medida que aumenta la concentración de cisplatino (Fig. 9A). Esto confirma que los efectos citotóxicos del cisplatino son dependientes de la dosis de nefrotóxico, tal y como se ha observado en las imágenes tomadas con el microscopio.

La densidad celular también disminuye con la dosis de cisplatino. La población de células muertas como consecuencia del tratamiento se separa del fondo del pocillo y se pierde con los

lavados realizados para la tinción con CV. El número de células muertas es mayor cuanto mayor es la concentración de cisplatino, lo que explica por qué se reduce la densidad celular (Fig. 9B).

A



B

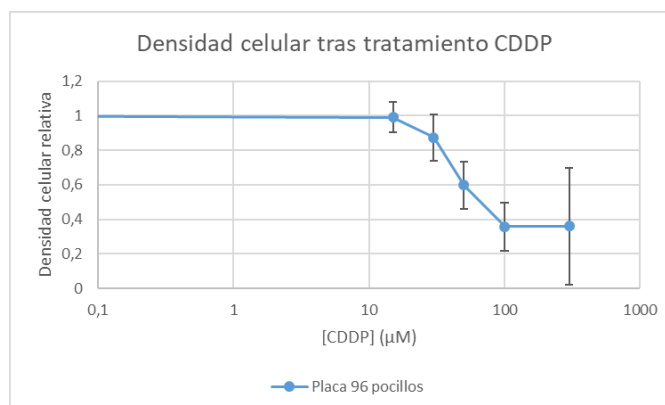


Figura 9. Evaluación de los efectos del cisplatino en el ensayo de nefrotoxicidad. A. Efectos sobre la viabilidad celular determinada por la fluorescencia de la resafurina. ($n=3$). B. Efectos sobre la densidad celular determinada por la medida de la absorbancia tras la tinción con CV. Los resultados son la media \pm SD de dos experimentos con 3 repeticiones en A y de un experimento con 3 repeticiones en B.

Como se puede ver tras la determinación de la viabilidad celular, no hay grandes diferencias en el comportamiento de las células en los dos modelos ante el tratamiento con cisplatino y en ambos casos se produce mayor muerte celular con el aumento de la dosis de cisplatino. Puede observarse una leve diferencia entre las células cultivadas en monocapa en el sistema 2D y el modelo tubular 2.5D, siendo este último ligeramente más sensible al cisplatino. Sin embargo, esta diferencia no es significativa. En toxicología la concentración de tóxico que provoca la muerte del 50% de las células se denomina EC50 y permite medir la sensibilidad celular. El valor de EC50 calculado en función de la viabilidad celular está en torno a 50-60 μM de CDDP mientras que el calculado en función de la densidad celular es inferior, en torno a 40-50 μM de CDDP. Esta diferencia se puede deber a la pérdida de células provocada por los lavados realizados en el ensayo de PB y CV que hace que en la medida de la densidad celular el número de células sea menor que en la medida de la viabilidad. Como consecuencia es necesario menos cantidad de CDDP para inducir la muerte de la mitad de la población celular.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El cultivo de células epiteliales del túbulo proximal sobre un hidrogel compuesto por colágeno tipo I y matrigel que contiene una mezcla de componentes de la membrana basal supone una novedosa técnica de cultivo celular que posibilita la formación de estructuras tubulares (Fig. 2B).

Las RPTECs conservan la expresión de varios marcadores específicos del túbulo proximal (figura 3B) así como transportadores típicos de este segmento de la nefrona (16) por lo que el medio y las condiciones en las que se desarrollan los túbulos no afectan negativamente a las características de las células sino que ofrecen un ambiente propicio para la diferenciación celular.

Gracias a las interacciones establecidas con los componentes de la matriz del gel y a los factores presentes en el medio de cultivo las células desarrollan aspectos básicos de su fisiología para un correcto funcionamiento y actividad celular. La polarización de las células, las uniones estrechas que se fijan entre ellas y el desarrollo de los cilios confirman una correcta morfogénesis en las estructuras tubulares observadas (Fig. 6). Durante el ensayo de tubulogénesis se han probado varias condiciones para la construcción de los túbulos. La primera condición analizada ha sido el cultivo en medio suplementado con matrigel pero sin base de gel, la segunda el cultivo exclusivo sobre la capa de hidrogel pero sin matrigel en el medio y la tercera una combinación de las dos anteriores. Esto ha permitido confirmar que las condiciones más favorables para la formación de túbulos de mayor tamaño, con un lumen más grande y definido, incluyen el cultivo de las células sobre una capa de hidrogel y la presencia de matrigel en el medio que las cubre (Fig. 6A).

Estos modelos celulares reproducen la arquitectura del túbulo proximal *in vivo*, permitiendo así un estudio óptimo de los efectos producidos por diferentes fármacos a nivel renal (13,17). Los ensayos de nefrotoxicidad con cisplatino permiten evaluar la sensibilidad de estos modelos *in vitro* y los resultados de la determinación de la viabilidad celular muestran que el cisplatino tiene un efecto negativo dependiente de la dosis sobre la viabilidad celular (Fig. 9A). Sin embargo no se ha observado una gran diferencia en la sensibilidad de los dos modelos estudiados, 2D y 2.5D, un indicativo de la necesidad de mejorar los modelos para realizar estudios más representativos.

La tubulogénesis de túbulo proximal es una herramienta nueva y que todavía se encuentra en fase de estudio por lo que va a ser necesaria una amplia investigación en este campo. La evaluación de la respuesta del organismo al proceso farmacológico es un factor fundamental en la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos y tratamientos. De ello deriva el gran interés en torno a estas nuevas técnicas de cultivo, haciendo de ellas una aproximación sujeta a futuras investigaciones y centro de grandes retos en el ámbito de la biología, fisiopatología y farmacología.

7. CONCLUSIONES

1. Las células RPTEC/TERT1 en un cultivo 2.5D forman estructuras tubulares similares a la fisiología in vivo del túbulo proximal.
2. El análisis de diferentes condiciones de cultivo determina que un ambiente que imita la matriz extracelular favorece la formación de los túbulos
3. El estudio de la expresión de marcadores específicos de túbulo proximal confirma la diferenciación de las células en el cultivo. Sin embargo, debido a la falta de expresión de alguno de los marcadores y a la presencia de un marcador no deseado se deduce que el sistema empleado no es el ideal.
4. La polarización de las células, las uniones estrechas establecidas entre ellas y la formación de cilios confirman una morfogénesis adecuada de los túbulos.
5. La tubulogénesis de túbulo proximal da lugar a un modelo apto para el estudio de nefrotoxicidad producida por fármacos.
6. Los modelos tubulares renales no solo sirven para analizar la respuesta del organismo ante un fármaco sino también para mejorar la comprensión acerca de los procesos que tienen lugar durante la morfogénesis in vivo.

CONCLUSIONS

1. RPTEC/TERT1 cells in a 2.5D culture make tubular structures similar to proximal tubule in vivo physiology.
2. Different conditions analysed determine that an extracellular matrix like environment assist tubules formation.
3. Studying proximal tubule specific markers expression confirm cell differentiation in culture. However, the system employed is not the perfect one due to the lack of expression of some of makers analysed and the presence of an unwanted marker.
4. Cell polarization, tight junctions and cilia development support tubules appropriate morphogenesis.
5. Proximal tubule tubulogenesis results in a competent model for drug-induced nephrotoxicity research
6. Renal tubular models not only are useful for analysing organism response to drugs but also for improving understanding about in vivo morphogenesis process.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiología médica. 10ª ED. S.A. MCGRAW-HILL / INTERAMERICANA DE ESPAÑA, editor. 2005.
2. Hernando Avendaño L. Nefrología clínica. 4ª Ed. Panamericana, editor. 2013.
3. Tiong HY, Huang P, Xiong S, Li Y, Vathsala A, Zink D. Drug-Induced Nephrotoxicity: Clinical Impact and Preclinical in Vitro Models. 2014;
4. King SM, Higgins JW, Nino CR, Smith TR, Paffenroth EH, Fairbairn CE, et al. 3D proximal tubule tissues recapitulate key aspects of renal physiology to enable nephrotoxicity testing. *Front Physiol.* 2017;8(MAR):1–18.
5. Sánchez-Romero N, Meade P, Giménez I. Microfluidic-Based 3D Models of Renal Function for Clinically Oriented Research. *Transl Regen Med to Clin.* 2015;315–34.
6. Hoppensack A, Kazanecki CC, Colter D, Gosiewska A, Schanz J, Walles H, et al. A Human In Vitro Model That Mimics the Renal Proximal Tubule . *Tissue Eng Part C Methods.* 2013;20(7):599–609.
7. Denker BM, Sabath E. The Biology of Epithelial Cell Tight Junctions in the Kidney: Figure 1. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(4):622–5.
8. Secker PF, Luks L, Schlichenmaier N, Dietrich DR. RPTEC/TERT1 cells form highly differentiated tubules when cultured in a 3D matrix. *ALTEX.* 2018;35(2):223–34.
9. Wallner EI, Yang Q, Peterson DR, Wada J, Kanwar YS. Relevance of extracellular matrix, its receptors, and cell adhesion molecules in mammalian nephrogenesis. *Am J Physiol Physiol.* 2017;275(4):F467–77.
10. Miner JH. Renal basement membrane components. *Kidney Int.* 1999;56(6):2016–24.
11. Kleinman HK, Martin GR. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol.* 2005;15(5 SPEC. ISS.):378–86.
12. Desrochers TM, Suter L, Roth A, Kaplan DL. Bioengineered 3D Human Kidney Tissue , a Platform for the Determination of Nephrotoxicity. 2013;8(3).
13. Ming Chung I, Enemchukwu N, Khaja S, Murthy N, Mantalaris A, García A. Bioadhesive Hydrogel Microenvironments to Modulate Epithelial Morphogenesis. *Biomaterials.* 2008;29:2637–45.
14. Nieskens TTG, Wilmer MJ. Kidney-on-a-chip technology for renal proximal tubule tissue reconstruction. *Eur J Pharmacol.* 2016;790:46–56.
15. Weber EJ, Chapron A, Chapron BD, Voellinger JL, Kevin A, Yeung CK, et al. Development of a microphysiological model of human kidney proximal tubule function. 2017;90(3):627–37.
16. Aschauer L, Carta G, Vogelsang N, Schlatter E, Jennings P. Expression of xenobiotic transporters in the human renal proximal tubule cell line RPTEC/TERT1. *Toxicology in Vitro.* 2015;30(1):95–105.
17. Subramanian B, Rudym D, Cannizzaro C, Perrone R, Zhou J, Ph D, et al. Tissue-Engineered Three-Dimensional In Vitro Models for Normal and Diseased Kidney. 2010;16(9).

