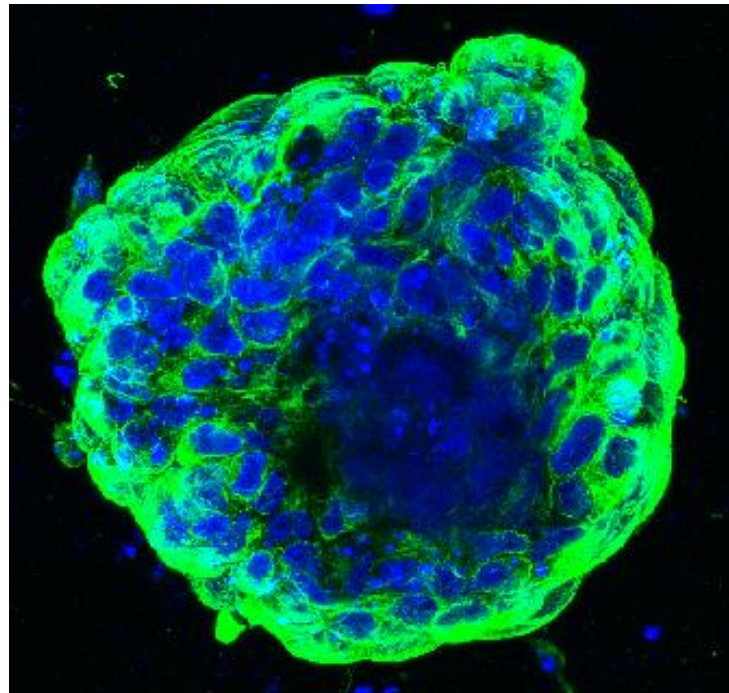


**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS**

Tesis para optar al Título de Licenciado en Ciencias Biológicas
Orientación Biología Celular

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ACUMULACIÓN DE
AGEs EN LA MEMBRANA BASAL EN CULTIVOS EN
3D DE TUBULOS RENALES**



MARÍA FERNANDA AMEIGEIRAS DORA

Tutor: Dra. Mercedes Rodríguez-Teja
Departamento de Genética, Facultad de Medicina

Montevideo, Uruguay
2017

PÁGINA DE APROBACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS

El tribunal docente integrado por los abajo firmantes aprueba la Tesis de Investigación:

Título

Estudio del efecto de la acumulación de AGEs en la membrana basal en cultivos en 3D de túbulo renales

Autor

María Fernanda Ameigeiras Dora

Tutor

Mercedes Rodríguez-Teja

Carrera

Licenciatura en Ciencias Biológicas – Orientación Biología Celular

Puntaje

Tribunal

Profesor.....

(Nombre y firma)

Profesor.....

(Nombre y firma)

Profesor.....

(Nombre y firma)

Fecha

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer grandemente a mi tutora, Dra. Mercedes Rodríguez-Teja, por abrirme las puertas del laboratorio, por permitirme aprender de sus conocimientos y experiencia siempre con la mejor disposición a ayudarme y enseñarme, y por darme su apoyo incondicional sin importar día ni horario. Muchas gracias Checha!

A mis compañeras de laboratorio, Claudia y Guillermina, por su compañía y ayuda, sin ellas hubiera sido imposible finalizar este trabajo.

A la Dra. Adriana Cassina por brindarnos las células HK-2 para realizar esta Tesina.

A mis amigos de hoy y de siempre, por alentarme constantemente y acompañarme en este proceso de aprendizaje.

A mi familia, por ser mi sostén. Especialmente a mis padres por enseñarme e impulsarme a estudiar, a crecer y a seguir adelante a pesar de las dificultades.

Gracias infinitas a todos!

ÍNDICE

ÍNDICE	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
RESUMEN.....	VI
ABREVIATURAS	VIII
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Fibrosis renal y Enfermedad Renal Crónica	10
1.2 Productos finales de glicación avanzada y ERC	16
1.3 Importancia de los cultivos en tres dimensiones (3D).....	22
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	28
2.1 Hipótesis	28
2.2 Objetivo general.....	28
2.3 Objetivos específicos	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1 Cultivo de líneas celulares humanas	29
3.2 Cultivos en 3D.....	30
3.3 Ensayo de viabilidad y tratamiento con HGF	31
3.4 Producción de membrana basal rica en AGEs	32
3.5 Inmunofluorescencia	33
3.6 Obtención de imágenes	35
3.7 Análisis estadístico.....	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1 Puesta a punto de los cultivos en 3D	36
4.2 Cultivos en 3D de células epiteliales del túbulo proximal renal HK-2 sobre MBr nativa o rica en AGEs	46
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	52
BIBLIOGRAFÍA.....	55
ANEXO 1- Soluciones	60
ANEXO 2- Reactivos y fungibles	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Vías de formación de AGEs.....	17
Figura 2 - Implementación de cultivos en 3D sobre membrana basal rica en AGEs.	33
Figura 3 - Cultivos en 3D sobre Matrigel de células RWPE-1 y HK-2 en distintos medios: KSFM (suplementado con BPE y EGF) y DMEM (suplementado con 5 % FBS)..	39
Figura 4- Cultivos en 2D y 3D de células HK-2 en medio DMEM suplementado con 5 % FBS con y sin HGF..	41
Figura 6- Cultivos en 3D sobre MBr de células HK-2 en medio DMEM suplementado con 5 % FBS con y sin HGF (10 ng/ml)..	43
Figura 7 - Cultivos en 3D de células HK-2 sobre MBr nativa o rígida..	47
Figura 8 - Cambios fenotípicos en el túbulo proximal renal a causa de la acumulación de AGEs.	51
Figura 9 - Esquema de las metodologías empleadas y experimentos realizados durante este trabajo.	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 - Factores de riesgo de ERC.....	15
Tabla 2 - Tipos de AGEs.....	16
Tabla 3 – Diferencias entre cultivos en 2D y 3D	23
Tabla 4 - Características de células HK-2 y RWPE-1	31
Tabla 5 – Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para las inmunofluorescencias	35
Tabla 6 - Área y el perímetro de las estructuras formadas en los cultivos en 3D de HK-2 en medios KSFM y DMEM con 5% FBS.....	40
Tabla 7 - Área y el perímetro de las estructuras formadas en los cultivos en 3D de HK-2 en medios DMEM suplementado con 5% FBS y en presencia o ausencia de HGF.....	44

RESUMEN

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) tiene una alta prevalencia a nivel mundial y nacional. Implica una pérdida progresiva de las funciones renales y se caracteriza por la deposición excesiva de matriz extracelular llevando a la generación de fibrosis. En parte la deposición de la matriz es llevada a cabo por células del túbulo renal que han sufrido una transición de un fenotipo epitelial a uno mesenquimal. Dentro de los factores de riesgo de sufrir ERC se encuentra la edad del paciente y la presencia de patologías como diabetes, obesidad, hipertensión, enfermedades cardiovasculares. Todos estos factores están asociados a la acumulación, a lo largo de la vida, de productos finales de glicación avanzada (AGEs) en el organismo. Varios estudios indican que un ambiente enriquecido en AGEs contribuye a cambios en el fenotipo epitelial de las células del túbulo proximal renal; sin embargo aún resta por estudiar ¿cómo este ambiente afecta la estructura tridimensional del túbulo renal? Por esto nos proponemos establecer cultivos en 3D de células epiteliales de túbulo proximal renal (HK-2) sobre una membrana basal reconstituida (MBr) para luego modificarla mediante la reacción de Maillard, obteniendo así cultivos sobre MBr ricas en AGEs. Los resultados obtenidos muestran que al sembrar células HK-2 en medio de cultivo DMEM suplementado con 5% de FBS y 10 ng/ml de HGF, se observan estructuras esféricas con un lumen central definido luego de 5 días. Cuando estas estructuras fueron

cultivadas sobre una MBr rigidizada por la acumulación de AGEs pocas pudieron distinguirse; las mismas fueron polimórficas sin cavidad luminal central, observándose una pérdida de la polaridad apico-basal de las célula epitelial y una presencia en el cultivo de células con fenotipo mesenquimal pro-fibrótico. Estos resultados sugieren que la acumulación de AGEs observada en el riñón de un individuo adulto y/o diabético contribuye con la transición epitelio-mesenquimal, provocando atrofia de los túbulos que junto con la fibrosis favorece al desarrollo de la ERC.

Palabras clave: enfermedad renal crónica, productos finales de glicación avanzada, factor de crecimiento de hepatocitos, cultivos en 3D, membrana basal.

ABREVIATURAS

2D	Dos dimensiones
3D	Tres dimensiones
A	
α -SMA	Alpha-actina del musculo liso
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGEs	Productos finales de glicación avanzada
AGE-BSA	Albumina de suero bovino modificada por AGEs
ALEs	Productos finales de lipoxidación avanzada
ATCC	American Type Culture Collection
B	
BSA	Albumina de suero bovino
BK	Bacilo de Koch
BPE	Extracto pituitario bovino
C	
CEL	N ^ε -carboxi etil-lisina
CML	N ^ε -Carboxi metil-lisina
D	
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOLD	Dímero de lisina derivado de 3-deoxiglucosona
E	
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ERC	Enfermedad renal crónica
F	
FAK	Quinasa de las adhesiones focales
FBS	Suero fetal bovino
G	
G-M	Hidroimidazolone derivado de Glioxal
GM130	Proteína 130 de matriz del Golgi
GOLD	Dímero de lisina derivado de Glioxal
H	
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos recombinante
HPV	Virus del papiloma humano
K	
KSFM	Medio de queratinocitos libre de suero
M	
MB	Membrana Basal
MBr	Membrana Basal reconstituida
MDCK	Células de riñón canino
MG-H	Hidroimidazolone derivado del Metil glioxal
MLC2	Cadena liviana de miosina 2
MOLD	Dímero de lisina derivado de Metil glioxal
N	
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
P	
PBS	Buffer fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
R	
RAGE	Receptor de AGEs

RT qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, con transcripción reversa
<hr/>	
T	
TA	Temperatura ambiente
TEM	Transición epitelio-mesenquimal
TEndoM	Transición endotelio-mesenquimal
TGF- β 1	Factor de crecimiento transformante β 1
<hr/>	
V	
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
<hr/>	
Z	
ZEB2	Factor de transcripción Homeobox 2 con dedos de Zinc de unión a E-box
<hr/>	

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Fibrosis renal y Enfermedad Renal Crónica

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) tiene una elevada prevalencia a nivel nacional y mundial. En Uruguay se registraron al Programa de Salud Renal entre los años 2004-2014 más de 14000 pacientes voluntariamente con diferentes grados de ERC (información obtenida en abril de 2017 del Fondo Nacional de Recursos http://www.fnr.gub.uy/guia_renal). La ERC se define como la presencia de anomalías en la estructura y/o la función renal con implicancias en la salud del paciente durante un periodo mayor a tres meses. La misma se caracteriza por una deposición excesiva de componentes de la matriz extracelular en el espacio intertubular y capilares peritubulares, así como en el espacio glomerular y periglomerular del riñón, fenómeno llamado fibrosis¹. Esta acumulación de matriz fibrótica rígida (en especial colágeno fibrilar²) distorsiona el tejido, causando el colapso del parénquima y pérdida de función renal.

Si bien la inflamación es un mecanismo de defensa contra los daños, cuando ésta se da de manera sostenida en el tiempo se convierte en una gran impulsora de la fibrosis renal, que luego progresa a la ERC. De hecho, la fibrosis renal es considerada un proceso de cicatrización fallido luego de un daño inicial provocado por varias injurias³.

El desarrollo de la fibrosis renal es un proceso dinámico que puede ser dividido artificialmente en cuatro fases: **preparación (*priming*)**, **activación**, **ejecución y progresión**³.

Desarrollo de la fibrosis renal: preparación o priming

La primera fase, **preparación o *priming***, comienza luego de un daño sostenido, generando pequeñas áreas de inflamación en el tejido renal por medio de las cuales se generan gradientes de citoquinas quimiotácticas que guían a las células inflamatorias hacia los sitios afectados⁴. Se ha observado que el reclutamiento y activación de linfocitos son eventos importantes en etapas tempranas de la patogénesis de la fibrosis renal; por ejemplo, Han, H. *et al.* y Tapmeier, T. *et al.* han demostrado que ratones carentes de linfocitos B y T maduros están protegidos de la fibrosis luego de una obstrucción uretral unilateral^{5,6}. El proceso de inflamación no-resolutivo, debido a la injuria crónica genera un círculo vicioso de inflamación, daño tisular y fibrosis. Los pequeños nichos inflamatorios se expanden y difunden un estímulo pro-fibrótico persistente^{3,7}.

Desarrollo de la fibrosis renal: activación

Este estímulo genera un ambiente propicio para la **activación** y la expansión de los fibroblastos productores de matriz extracelular, comenzando con la segunda etapa en el desarrollo de la fibrosis renal. Se han sugerido cuatro tipos celulares diferentes que a través de distintos

mecanismos contribuyen con el pool de fibroblastos activos, llamados también miofibroblastos debido a que expresan α -SMA (α -actina del musculo liso)⁸. La mayor fuente de miofibroblastos es la activación y proliferación de los fibroblastos que residen en el intersticio tubular renal (aprox. 50%)⁹. Una segunda fuente de miofibroblastos se origina por un programa de diferenciación dependiente de la citoquina profibrótica TGF- β 1 (factor de crecimiento transformante β 1) de células madres derivadas de la medula ósea (aprox. 35%)⁹. Las otras dos fuentes de miofibroblastos son las células del endotelio capilar (aprox. 10%) y del epitelio tubular (aprox. 5%), que han sufrido una transición de su fenotipo a uno mesenquimal, mediante los procesos llamados transición endotelio-mesenquimal (TEndoM) y transición epitelio-mesenquimal (TEM), respectivamente^{8,9}. Tanto la TEndoM y la TEM son eventos tardíos y contribuyen de manera irreversible a la progresión de la fibrosis renal, produciendo rarefacción capilar y potenciando el proceso inflamatorio³.

En particular, el proceso de TEM ha sido definido como la adquisición de un fenotipo con características mesenquimales, pro-migratorias, por parte de las células epiteliales. El mismo ha sido observado en diferentes contextos como ser en el desarrollo embrionario, cáncer y fibrosis, incluso se ha clasificado el proceso en tres tipos distintos de TEM¹⁰. El tipo I de TEM es el que se observa durante los procesos de implantación, embriogénesis y desarrollo de órganos. El tipo II de TEM se asocia a la regeneración de tejidos en un contexto de inflamación y fibrosis tisular. A

diferencia del tipo I, el tipo II de TEM se distingue por perdurar periodos largos de tiempo y puede eventualmente destruir el órgano afectado, si perdura el daño inflamatorio primario. Por último, el tipo III de TEM es el que se observa durante el proceso de invasión y metástasis de las células cancerígenas¹⁰.

En el contexto de la fibrosis renal, tradicionalmente se pensaba en un proceso completo de TEM tipo II, donde la célula epitelial se convertía completamente en un miofibroblasto, perdiendo todas sus características epiteliales. En el año 2015 dos estudios demostraron que las células epiteliales tubulares sufren un proceso parcial de TEM durante la fibrosis; las células mantienen la expresión de algunos marcadores epiteliales y comienzan a expresar algunos mesenquimales manteniéndose asociadas a la membrana basal que soporta al túbulo renal^{11,12}. Para demostrar la importancia de la TEM en el desarrollo de la fibrosis renal, los dos grupos generaron ratones “*knockout*” condicionados, en donde los factores de transcripción esenciales para la TEM, *SNAI 1/2* o *Twist*, fueron inhibidos genéticamente en las células epiteliales del túbulo, resultando en la inhibición completa del programa de TEM^{11,12}. Ambos estudios demostraron que la inhibición de la TEM reduce la fibrosis intersticial en tres modelos diferentes de ERC y que esta inhibición lleva a una mejor preservación de la integridad y función de las células epiteliales tubulares, con disminución de miofibroblastos en el estroma tisular^{11,12}. En ambos casos las células epiteliales tubulares no se convertían en miofibroblastos

intersticiales, sino que se mantenían en el túbulo, mostrando un estado de TEM parcial. Este estado igualmente afecta dramáticamente la capacidad de absorción y secreción de las células epiteliales. Además, TEM induce un arresto del ciclo celular en G2, impidiendo la reparación del tejido dañado y promoviendo la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, manteniendo una situación de inflamación sostenida y el daño crónico del tejido^{11,12}. En pacientes con ERC la presentación histopatológica del daño tubular se caracteriza por atrofia tubular debido a la TEM; de hecho se ha propuesto que la determinación de la extensión de TEM podría servir como diagnóstico de ERC y los genes responsables podrían servir como blancos terapéuticos⁸.

Desarrollo de la fibrosis renal: ejecución y progresión

La tercera etapa del proceso de fibrosis renal es la **ejecución**, en donde se da la producción y acumulación excesiva de la matriz extracelular por parte de los miofibroblastos en el intersticio. En etapas tempranas la matriz extracelular es susceptible a la degradación, por lo que la fibrosis es potencialmente reversible, pudiendo resultar en la cicatrización del tejido. Al perpetuarse la fibrosis, la matriz extracelular sufre modificaciones químicas cambiando sus propiedades elásticas y otorgándole protección frente a la proteólisis³. Por último, el concepto de fibrosis renal no es solamente el resultado de la acumulación excesiva de la matriz extracelular, de hecho aún no está demostrado que esta acumulación *per se* causa falla renal. En la última etapa del desarrollo de

la fibrosis renal, **progresión**, se observa rarefacción microvascular, hipoxia crónica y atrofia tubular con pérdida de la función renal y desarrollo de la ERC³.

Entre los factores que predisponen al desarrollo de ERC (Tabla 1) se encuentran la edad del paciente, historia familiar de ERC y la presencia de enfermedades como ser obesidad, diabetes, hipertensión, enfermedades cardiovasculares entre otras. En particular, estas enfermedades mencionadas están directamente asociadas a la acumulación de glicotoxinas en el organismo, denominadas productos finales de glicación avanzada (AGEs)¹³.

Tabla 1 - Factores de riesgo de ERC. Si bien los factores de riesgo han sido clasificados en 6 categorías, la progresión de ciertas enfermedades puede llevar a que la misma se encuentre en varias categorías.

Factores no modificables
Historia familiar de ERC
Edad (50 o 60) años
Bajo peso al nacer
Factores modificables
Obesidad
Exposición a fármacos nefrotóxicos
Tabaquismo
Enfermedades predisponentes médicas
Hipertensión arterial
Diabetes Mellitus
Enfermedades autoinmunes
Infecciones del tracto urinario
Infecciones sistémicas (como por ejemplo: VIH*, BK*, Hepatitis B y C, Malaria)
Enfermedades predisponentes quirúrgicas benignas
Patologías obstructivas del tránsito urinario bajo y alto
Poliquistosis renal
Enfermedades predisponentes quirúrgicas malignas
Neoplasias
Factores socio-económicos
Bajo nivel educativo
Bajos ingresos

*VIH: virus de inmunodeficiencia humana, BK: bacilo de Koch

1.2 Productos finales de glicación avanzada y ERC

Los AGEs son un grupo heterogéneo de compuestos (Tabla 2) que se forman luego de una reacción de glicación no enzimática entre proteínas, lípidos o ácidos nucleicos a través de una secuencia de reacciones llamadas en su conjunto reacción de Maillard (Figura 1). En 1912, Louis Camille Maillard (químico francés) describió cómo el grupo carbonilo de un azúcar reducida reacciona con un grupo amino nucleofílico de un aminoácido en presencia de agua y temperatura, produciendo un compuesto de color amarillo-marrón. La reacción ocurre espontáneamente formando como intermediario una base lábil de Schiff. Esta etapa de la reacción puede revertirse fácilmente deteniendo el proceso (Figura 1). De continuar, la base Schiff puede lentamente formar un aducto de quetosamina denominado producto de Amadori, que luego puede seguir una descomposición oxidativa compleja, condensación y un re-arreglo intramolecular adquiriendo una estructura química estable, que con el tiempo derivará en la formación de AGEs (Figura 1).

Tabla 2 - Tipos de AGEs. Existen al menos 20 tipos diferentes de AGEs, esta tabla presenta los AGEs con función biológica importante identificados hasta la fecha.¹⁵

No fluorescentes y no generan entrecruzamiento (<i>crosslinking</i>) entre las moléculas
N ^ε -Carboxi metil-lisina (CML)
N ^ε carboxi etil-lisina (CEL)
Pirralina
No-fluorescentes y generan entrecruzamiento (<i>crosslinking</i>) entre las moléculas
Dímero de lisina derivado de glioxal (GOLD)*
Dímero de lisina derivado de metil glioxal (MOLD)*
Dímero de lisina derivado de 3-deoxiglucosona (DOLD)*
Hidroimidazolones
Hidroimidazolone derivado del Glioxal (G-M)
Hidroimidazolone derivado del Metil glioxal (MG-H)
Otros AGEs que generan entrecruzamiento (<i>crosslinking</i>) entre las moléculas
Pentosidina**

*Forma entrecruzamiento entre lisina-lisina, **Forma entrecruzamiento entre arginina-lisina

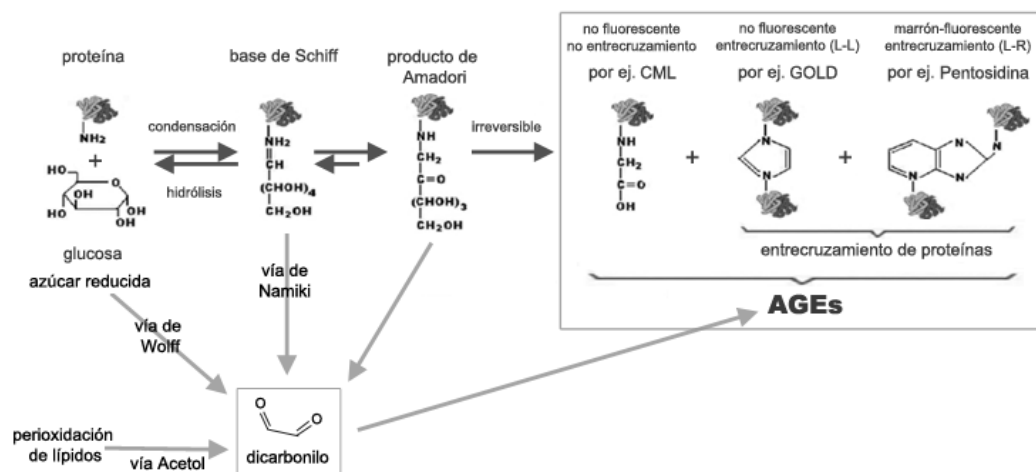


Figura 1 - Vías de formación de AGEs. Reacción de Maillard; en un primer paso un azúcar reducido reacciona con el grupo amino de un aminoácido libre para formar una base de Schiff; luego en una segunda etapa el producto de Schiff sufre rearrreglos que dan origen a los productos de Amadori; los cuales, por último, sufren rearrreglos irreversibles que derivan en la producción de AGEs y posible entrecruzamiento de las moléculas involucradas en la reacción de Maillard. Los AGEs también pueden formarse debido a la degradación de lípidos y aminoácidos, y ruptura de compuesto dicarbonilos siguiendo las vías Acetol, de Wolff y Namiki.

La primera descripción de la presencia de AGEs en el cuerpo humano fue a fines de la década del 60, cuando Rahbar y colaboradores observaron un aumento de la hemoglobina glicada (HbA1c, producto de Amadori) en pacientes con diabetes^{16,17}. Posteriormente, se identificaron más de una decena de AGEs en diferentes tejidos, en la membrana basal que nutre la retina, en las paredes de los vasos sanguíneos, en el colágeno arterial y en casi todo el tejido renal, entre otros. La reacción de Maillard ocurre lentamente a lo largo de la vida, llevando a la acumulación de AGEs en el organismo y a la alteración de la estructura y función de las biomoléculas, contribuyendo con el proceso de envejecimiento de un individuo. Este proceso acumulativo tiene implicancias en la patogenia de neuropatías, retinopatías y nefropatías debidas a la diabetes, así como el progreso de enfermedades cardiovasculares e hipertensión entre otras

enfermedades (por ejemplo: aterosclerosis, Alzheimer y diferentes tipos de cáncer). En esta línea de razonamiento, un microambiente rico en AGEs debido a la edad del paciente y/o a la presencia de enfermedades como diabetes^{18,19}, hipertensión, enfermedades cardiovasculares²⁰ aumenta el riesgo de sufrir ERC.

Los AGEs se forman como resultado del metabolismo normal, pudiéndose llegar a niveles patogénicos en la circulación y tejidos debido a hiperglicemia o estrés oxidativo²⁰⁻²². La generación de estrés dicarbonilo puede derivar por diferentes vías en la generación de AGEs (Figura 1). Las bases de Schiff pueden sufrir fragmentación oxidativa para formar intermediarios dicarbonilos que generarán AGEs mediante la vía de Namiki. La autoxidación de monosacáridos (glucosa, ribosa, fructosa y gliceraldehído) puede derivar en la formación de AGEs siguiendo la vía de Wolff. Por último, la peroxidación de los lípidos (vía Acetol) es otra fuente de precursores de AGEs, llamados por algunos investigadores ALEs (advanced lipoxidation end-products)²².

Además de los AGEs formados endógenamente, existen importantes fuentes exógenas de estas glicotoxinas²³, generadas durante los procesos de gratinado, asado y frito de los alimentos²⁴. Los hábitos de la alimentación moderna han llevado a que la reacción de Maillard cobre importancia en la ciencia de la nutrición. Las melanoidinas son pigmentos de alto peso molecular que se generan por la reacción de Maillard y se utilizan para darle color marrón a varios tipos de alimentos como el pan, el

café y la cerveza. Además, la reacción Maillard también produce compuestos volátiles (por ejemplo: pirroles y pirimidinas) que le dan el olor al café, al pan y a la carne luego de cocinados²⁵. Desde el punto de vista alimenticio esta reacción reduce el valor nutricional de la comida perdiendo los aminoácidos esenciales y carbohidratos, incluso muchos de sus productos son tóxicos para el organismo. Entre los productos tóxicos más conocidos se encuentra la acrilamida que se produce cuando se fríen los alimentos ricos en almidón, como ser las papas fritas²⁵. Durante la producción del pan y de los productos derivados de la leche se producen los AGEs clásicos CML, pentosidina y piralina. Cantidades elevadas de CML se encuentran en las comidas con alto contenido en grasas, y por otro lado las bebidas colas contienen una alta concentración de pentosidina, GOLD y MOLD²⁵. Alrededor del 10% de los AGEs ingeridos son transportados en la circulación, de los cuales 2/3 son incorporados a los tejidos y sólo 1/3 es eliminado vía renal²³, por tanto el riñón actúa como un detoxificador de AGEs circulantes²⁶.

En su rol detoxificador, el riñón se ve afectado por la acumulación de los AGEs participando éstos en la progresión de la ERC ²⁷⁻²⁹. Trabajos recientes demuestran el papel de estas glicotoxinas en la amplificación de las repuestas inmune e inflamatoria durante dicha enfermedad³⁰⁻³³, así como en el estrés oxidativo del estroma renal^{31,34,35}. Uribarri, J. y colaboradores³⁶, observaron un aumento de AGEs así como de marcadores de inflamación y estrés oxidativo en adultos mayores como

resultado de la dieta. Por otro lado, Feng, J.X. y colaboradores trataron ratas con tres tipos de dietas: normal, de bajo contenido de AGEs y de alto contenido de AGEs; observaron que las ratas alimentadas con una dieta rica en AGEs sufrían un aumento del volumen renal y glomerular así como una rápida progresión de la fibrosis y glomeruloesclerosis, también un aumento en la proteinuria, en la infiltración de macrófagos y en el estrés oxidativo con respecto a las ratas con dieta normal, todo lo cual indica un aceleramiento en el daño renal. Por el contrario, las ratas alimentadas con una dieta pobre en AGEs se vieron beneficiadas con una disminución de los daños con respecto a las ratas control³⁷. La pérdida de función renal, debida en parte a la acumulación de AGEs y la progresión de la ERC, lleva a la acumulación de AGEs y a la reducción en la excreción de los mismos³⁸, observándose así un *loop* de retroalimentación positiva que deriva en la aceleración de la fibrosis y el avance de la ERC con consecuencias nocivas para el organismo³⁷.

Cualquier proteína podría ser blanco de sufrir modificaciones glicoxidativas *in vivo*. Las proteínas que tienen una vida media larga con poco recambio, como ser proteínas estructurales o de la matriz extracelular, son más susceptibles de ser partícipes de la reacción de Maillard y ser modificadas por la acumulación de AGEs. En particular, cuando la reacción de Maillard produce AGEs capaces de entrecruzar los componentes de la membrana basal (laminina, colágeno tipo IV, enactina, heparán sulfatos y proteoglicanos) cambia las propiedades estructurales y

mecánicas de la misma, generando una estructura filamentosa más rígida y resistente a su degradación^{39,40}. A nivel molecular, las fuerzas tensionales ejercidas por la membrana basal rigidizada debido a la acumulación de AGEs son transmitidas al ambiente intracelular por mecano-receptores situados en la superficie de la célula epitelial. Estos receptores activan cascadas de señalización molecular que modulan la adhesión célula-célula y célula-membrana basal, la contractilidad celular y la capacidad migratoria de la célula epitelial⁴¹.

A comienzos de este siglo Oldfield M. y colaboradores⁴² demostraron que en presencia de albumina de suero bovino modificada por AGEs (AGE-BSA) se induce la expresión del marcador de miofibroblasto α -SMA y la disminución de la expresión del marcador epitelial E-caderina en células del epitelio del túbulo proximal renal, sugiriendo el comienzo de la TEM; además los investigadores fueron capaces de bloquear el proceso de transición mediante el uso de anticuerpos monoclonales neutralizantes de la función del receptor de AGEs (RAGE) o de TGF- β 1, incluso la utilización de un inhibidor de AGEs generadores de entrecruzamiento (ALT 711) oprime el proceso de TEM⁴². Años después, Li, J. H. y colaboradores observaron que los AGEs también inducen la TEM de manera independiente de TGF- β 1⁴³. Recientemente, Kumar y colaboradores demostraron que CML contribuye con el proceso de TEM de manera dependiente de la vía de señalización de NF- κ B, a través del factor de transcripción ZEB2⁴⁴.

En términos generales, varios estudios indican que un microambiente rico en AGEs contribuye a cambios en el fenotipo epitelial de las células del túbulo proximal renal, sin embargo resta por estudiar cómo este microambiente podría afectar la estructura tridimensional del túbulo renal.

1.3 Importancia de los cultivos en tres dimensiones (3D)

El cultivo en 3D de células epiteliales abre nuevas puertas al estudio de cómo el microambiente modula características típicas de las células epiteliales como ser su morfología polarizada (apico-basal), sus contactos célula-célula y célula-membrana basal, la deposición de los componentes de la membrana basal (por ejemplo: colageno tipo IV y laminina V), la formación de estructuras con un espacio luminal central y, en muchos casos, la producción de secreción hacia el mismo. El desarrollo y el mantenimiento de estas estructuras polarizadas son esenciales para la función de la célula epitelial, y en particular para la función de filtrado del túbulo proximal renal.

Si bien los cultivos en dos dimensiones (2D) han sido largamente empleados debido a que son simples de implementar, tienen bajo costo y se obtiene una muy buena viabilidad celular, los mismo presentan ciertas desventajas en comparación con los cultivos en 3D⁴⁵. Preguntas como: ¿cuáles son los mecanismos involucrados en mantener la estructura polarizada de las células del túbulo renal?, ¿cómo afecta a la función del túbulo renal la pérdida de su arquitectura 3D?; requiere una metodología

diferente del cultivo de las células en monocapa (2D). El cultivo en 2D no representa adecuadamente el ambiente celular, se pierde la arquitectura tisular, se generan cambios en la morfología y en la migración de las células, sin reflejar la fisiología compleja de los tejidos lo que puede llevar a deficiencias a la hora de obtener resultados biológicamente confiables^{46,47}.

En vista de que los tejidos *in vivo* son estructuras en 3D, con tipos celulares variados que interaccionan entre ellos y con la matriz extracelular en la que se encuentran, se crearon los cultivos en 3D para poder disminuir la distancia entre los cultivos en monocapa y un tejido real⁴⁵⁻⁴⁷. En la Tabla 3 se muestran las diferencias entre los cultivos en 2D y 3D.

Tabla 3 – Diferencias entre cultivos en 2D y 3D (Tomado de MacQueen, H. *et al.* 2007)

	Características	Cultivo 2D	Cultivo 3D
Funciones biológicas	Forma de las células (por ej. Células epiteliales)	Elongadas, pérdida de polaridad celular	Cuboidales, con polaridad celular
	Morfología	Inducida por sustrato 2D	Inducida por membrana basal en 3D
	Movilidad celular	Diferente a las células <i>in vivo</i>	Dependiendo de la membrana basal utilizada, se asemeja a las células <i>in vivo</i>
	Interacciones célula-matriz	No	Sí
	Diferenciación de células madre	Inducida por sustrato 2D, diferentes de las células <i>in vivo</i>	Inducida por la matriz 3D, se asemeja a las células <i>in vivo</i>
Manipulación de cultivo	Implementación del cultivo	Fácil	Compleja
	Cambio de medio	Sí	Sí
	Manipulación del microambiente	No	Sí
	Señales mecánicas	No	Sí
Operaciones y costos	Riesgo de contaminación	Alto	Bajo
	Costo del cultivo	Barato	Caro

La importancia de realizar cultivos de células epiteliales en 3D se ve en el estudio de la adhesión y migración celular, de la polaridad de la célula epitelial, del transporte de sustancias, en el testeo de drogas y en la formación de una estructura con una cavidad central.

Cultivos en 3D para el estudio de la adhesión y migración celular

Mientras que en los cultivos en 2D la migración celular está relacionada con la adhesión célula-superficie, en los 3D se observan comportamientos más complejos y ordenados que dependen de las propiedades de la matriz extracelular^{47,48}. En el 2001, Cukierman E. y colaboradores demostraron que los perfiles de adhesión de fibroblastos diferían entre cultivos 2D y en cultivos en 3D realizados sobre diferentes tipos de matrices extracelulares, cambiando el tipo de las adhesiones focales de las células y la expresión de sus componentes integrina $\alpha_v\beta_3$, paxilina, vinculina y FAK (Quinasa de las adhesiones focales)⁴⁹. Recientemente, Rahman, A. y colaboradores mostraron que la ausencia de vinculina (*knockdown*) en células de adenocarcinoma mamario lleva a una severa reducción de la activación de la FAK en cultivos en 3D, sin embargo esta activación no se observa cuando se realizan cultivos en 2D⁵⁰. En modelos de cultivo de acinos protáticos realizados en el laboratorio, el enriquecimiento en AGEs de la membrana basal (MB) lleva a una ruptura de las uniones adherentes dependientes de E-caderina y a la activación del aparato contráctil celular necesario para la adquisición de un tipo de migración mesenquimal⁴¹.

No solamente la composición molecular de la matriz extracelular puede modular la adhesión de la célula epitelial al sustrato, sino también las propiedades visco-elásticas (grado de rigidez) de la misma. En un artículo publicado recientemente por Joaquin D. y colaboradores se distinguen diferencias en los patrones de adhesión y migración de células epiteliales de glándula mamaria humanas en relación a un gradiente de rigidez de la matriz extracelular, en el cual las células migran a través del gradiente hacia la región con mayor rigidez del cultivo en 3D (fenómeno llamado durotaxis)⁵¹. Un trabajo publicado recientemente por el laboratorio⁵², muestra que en cultivos de 3D de células de metástasis de cáncer de próstata, las mismas adquieren una morfología más alargada con formación de adhesiones focales y aumento de su velocidad de migración, si la matriz se encuentra enriquecida con AGEs.

Cultivos en 3D para el estudio de la polaridad de la célula epitelial

En el laboratorio del Depto. de Genética se trabaja con el cultivo en 3D de acinos glandulares prostáticos, para ello se cultiva sobre una MB reconstituida (MBr) células del epitelio luminal prostático (línea celular RWPE-1). Cuando estas células son cultivadas en monocapa el aparato de Golgi rodea todo el núcleo, sin embargo cuando son cultivadas en 3D forman una estructura acinar con un lumen central y se observa una localización apical del aparato de Golgi y del retículo endoplasmático, mostrando el establecimiento de una polaridad apico-basal de la célula epitelial en el cultivo en 3D⁴¹. Interesantemente, esta localización apical

se pierde cuando las mismas células son sembradas sobre una MBr con un elevado contenido en AGEs, mostrando que un microambiente rico en AGEs inhibe el fenómeno de polarización apico-basal de la célula epitelial⁴¹.

Cultivos en 3D para el estudio de transporte de sustancias

Mientras que en los cultivos en 2D los nutrientes, factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, etc. difunden libremente por el medio llegando rápidamente a un equilibrio, en los de 3D la difusión está más controlada por la porosidad de la matriz extracelular, y se generan gradientes por más tiempo. En trabajos de Raghavan, S. *et al.* se observaron diferencias en la difusión del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) entre cultivos en 2D y 3D de células de riñón canino (MDCK), así como en la activación de la cadena liviana de miosina 2 (MLC2) por parte del HGF⁵³.

Cultivos en 3D para el testeo de drogas

Al tener un cultivo que se asemeja más a los tejidos reales, se obtienen resultados más confiables que con cultivos en 2D, reduciendo costos y cantidad de animales empleados en la experimentación⁵⁴. Prange, J. A. *et al.* observaron que la toxicidad causada por la exposición a cadmio y gentamicina era mayor en cultivos en 2D que en cultivos en 3D de células epiteliales de túbulo proximal renal⁵⁵.

Cultivos en 3D para el estudio de la formación de estructuras complejas

En los 2D las células crecen en monocapa, son planas y no pueden crecer verticalmente. En los 3D las células pueden formar estructuras más polarizadas como quistes o túbulos que tienen extremos apicales y basales diferenciados, pudiendo formar en algunos casos un compartimento luminal^{47,49,56}. Como se ha mencionado anteriormente en el laboratorio se han implementado cultivos en 3D de células epiteliales prostáticas que luego de una semana en cultivo llegan a formar acinos glandulares prostáticos con un lumen central diferenciado^{41,52,57}. En el 2011, Kher, R. y colaboradores fueron capaces de formar quistes y estructuras tubulares en cultivos en 3D de la línea celular HK-2 de epitelio tubular proximal renal humano, que luego de 14 días de cultivo podían llegar incluso a conectarse entre sí y formar una estructura “arborizada”⁵⁸.

Con este trabajo proponemos implementar en el laboratorio el cultivo en 3D de túbulos renales a partir de la línea celular HK-2; además planeamos modificar el microambiente donde se generan estas estructuras, generando MBr ricas en AGEs mediante la reacción de Maillard.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

De acuerdo a los antecedentes planteados en la sección anterior esperamos que la acumulación de AGEs en la membrana basal module el fenotipo de la célula epitelial de los túbulos proximales renales, contribuyendo con el proceso de TEM que podría observarse durante el desarrollo de la ERC.

2.2 Objetivo general

Este trabajo se propone estudiar el efecto de la acumulación de AGEs en la membrana basal en el fenotipo de las células epiteliales del túbulo proximal renal.

2.3 Objetivos específicos

- Establecer cultivos en 3D de células epiteliales HK-2 del túbulo proximal renal sobre una membrana basal reconstituida.
- Modificar la membrana basal reconstituida produciendo la reacción de Maillard para obtener matrices con elevada concentración de AGEs *in vitro*.
- Establecer los cultivos en 3D de células HK-2 sobre membranas basales ricas en AGEs.
- Establecer los cambios en la estructura de los túbulos proximales renales debido a la acumulación de AGEs en la membrana basal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Las soluciones y los productos utilizados en este trabajo se detallan en los Anexos I y II respectivamente.

3.1 Cultivo de líneas celulares humanas

Los cultivos se realizaron con células HK-2⁵⁹ (ATCC® CRL-2190™) y RWPE-1⁶⁰ (Tabla 4). En un principio ambos tipos celulares fueron crecidos en placas de cultivo de 100 x 20 mm en el medio recomendado por ATCC (American Type Culture Collection), el cual consiste en un kit de KSM (keratinocyte serum free medium) suplementado con extracto pituitario bovino (BPE) (0,05 ng/ml) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) (5 ng/ml) al cual se le agregó penicilina-estreptomicina (100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina). Ambas se mantuvieron a 37°C y 5 % CO₂, cambiándoles el medio cada 48 horas debido a que el mismo no contiene suero. Como se explicará en el capítulo de resultados, las HK-2 se cultivaron también en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado con penicilina-estreptomicina y 5 % de suero fetal bovino (FBS) (v/v), condición en la cual crecieron mejor las estructuras en 3D. Una vez que la placa estuvo confluyente, se procedió a levantar las células. Para ello se quitó el medio de cultivo y se lavó con 5 ml de buffer fosfato salino (PBS), se removió el PBS y se agregaron 3 ml de tripsina-EDTA (0,05 %, v/v) y se dejó actuar durante 5 minutos para que las

células pudieran desprenderse de la placa; la reacción de la tripsina se paró agregando 5 ml de PBS suplementado con 2 % FBS (v/v). Se tomó el medio con células, se colocó en un tubo de 15 ml y se centrifugó durante 5 minutos a 125-150 g y a temperatura ambiente (TA). Una vez obtenido el *pellet*, se resuspendieron las células en 5 ml de medio de cultivo a fin de obtener una solución de una sola célula, y se contaron en una Cámara de Neubauer para sembrar el número deseado de células. Para el mantenimiento a largo plazo se dividió en 4 crioviales 3,6 ml de suspensión de células con 0,4 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) y se conservaron en Nitrógeno líquido.

3.2 Cultivos en 3D

Para implementar los cultivos en 3D se usó membrana basal reconstituida (*3D Culture Matrix reduced growth factor*). La misma es una forma soluble de membrana basal (MB) purificada de un tumor Engelbreth-Holm-Swarm a la cual se le han depletado los factores de crecimiento. Los componentes principales de esta membrana incluyen laminina, colágeno IV, enactina y proteoglicanos de heparan sulfato, con una concentración proteica de aproximadamente 15 mg/ml. Previo a su uso, la membrana debe incubarse en hielo a 4°C durante toda la noche para que pueda entrar en solución. Una vez obtenida la membrana líquida, se mantuvo en hielo una cámara de 8 pocillos y se cubrió cada pocillo con 40 µl de membrana procurando no dejar burbujas. Luego se

mantuvo a 37°C durante 30 minutos para polimerizar la MB (de aquí nombrada como membrana basal reconstituida, MBr) y se sembraron 5×10^3 RWPE-1 y 5, 10, 15, 20 y 25×10^3 HK-2 por pocillo según lo indicado en cada experimento, y se cultivaron durante 5, 8 y 10 días. Debido a que los medios de cultivo están suplementados con factores de crecimiento específicos (ver sección 3.1), los mismos se cambiaron cada 48 horas a fin de preservar la integridad de dichos factores.

Tabla 4 - Características de células HK-2 (ATCC® CRL-2190™) y RWPE-1 (ATCC® CRL-11609™)

Características	HK-2	RWPE-1
Organismo	<i>Homo sapiens</i> , humano	<i>Homo sapiens</i> , humano
Tejido	Riñón, corteza/túbulo proximal	Próstata
Tipo celular	HPV-16 transformado	Epitelial – transformado con HPV-18
Edad	Adulto	Adulto de 54 años
Género	Masculino	Masculino
Morfología	Epitelial	Epitelial
Propiedades de cultivo	Adherente	Adherente
Enfermedad	Papiloma	Normal
Condiciones de almacenamiento	Nitrógeno líquido en fase gaseosa	Nitrógeno líquido en fase gaseosa

3.3 Ensayo de viabilidad y tratamiento con HGF

Se realizaron por triplicado cultivos en 2D de células HK-2 en medio DMEM con 5 % FBS (v/v) y penicilina-estreptomicina suplementado con 10 ng/ml de HGF durante 144 horas. Se contó la cantidad de células vivas en una Cámara de Neubauer previa tinción con *Trypan blue* a las 24, 72 y 144 horas post sembrado, y se realizó una curva de sobrevivencia donde se grafica el número de células por horas de cultivo.

3.4 Producción de membrana basal rica en AGEs

La reacción de Maillard se realizó sobre la MBr de acuerdo al protocolo descrito por Rodríguez-Teja, M. *et al.* 2016⁵². Se descongeló la MB incubándola en hielo a 4°C durante toda la noche. Se colocó una cámara de 8 pocillos sobre hielo para mantener la temperatura durante el procedimiento y se cubrió cada pocillo con 40 µl de MB. Para cubrir los pocillos se utilizó una pipeta de 200 µl con tips a los que previamente se les había cortado la punta, para facilitar la cobertura de la superficie, evitando la formación de burbujas. Luego se mantuvo la cámara a 37°C durante 30 minutos para reconstituir la MB (MBr), cuidando de no exceder el tiempo de incubación a fin de evitar la deshidratación de la MBr. En los pocillos en los cuales se iba a realizar la reacción de Maillard se cubrió la MBr con 300 µl de glicolaldehído 50 mM, a los pocillos control se los cubrió con 300 µl de PBS y se incubó durante 14 horas a 37°C. Transcurrido el tiempo se quitó el glicolaldehído y se agregó 300 µl glicina etil éster 1 M y se volvió a incubar a 37°C por 1 hora. Luego se quitó la glicina cuidadosamente y se hicieron 5 lavados con 500 µl de PBS por pocillo para quitar los restos glicina y glicolaldehído, y se dejó en PBS toda la noche a 37°C. Para finalizar se realizaron 2 lavados con 500 µl de PBS y uno con 500 µl de medio de cultivo y se sembraron las células (Figura 2).

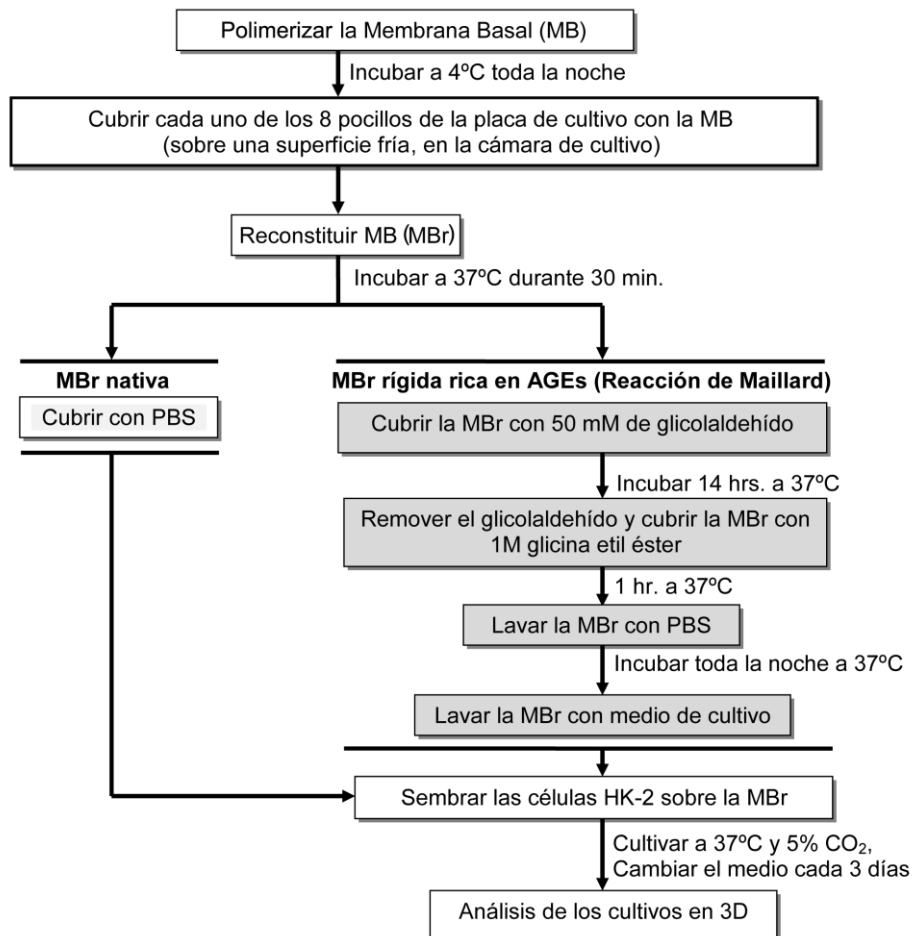


Figura 2 – Reacción de Maillard para generar las MBr ricas en AGEs. Esquema representativo del protocolo llevado a cabo para generar la reacción de Maillard sobre MBr e implementar los cultivos en 3D sobre la misma.

3.5 Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia sobre los cultivos se realizó de acuerdo al protocolo usado por Rodríguez-Teja, M. *et al.* 2016⁵². Para ello, en cada pocillo se lavaron los cultivos con 300 μ l de PBS+ 3 veces, se removió el PBS+ y se fijó con 250 μ l de paraformaldehído (PFA) 4 % (m/v) durante 30 minutos a TA. Se quitó el PFA y se cubrió con 250 μ l de solución de desactivación (*quenching solution*) durante 5 minutos a TA en continua agitación, repitiendo esta acción 5 veces. Tras la desactivación, se

removió la solución de desactivación y se realizó la permeabilización con 250 µl de 0,5 % Triton X-100 (30 minutos a TA) para permitir la entrada de los anticuerpos a la célula. Se quitó el Tritón X-100 y se cubrieron los cultivos con solución de bloqueo suplementado con 10 % de suero de cabra (v/v) por 2 horas a TA, para prevenir uniones inespecíficas. Luego de transcurridas las 2 horas, se incubaron los cultivos con 200 µl de anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo (como se describe en la Tabla 5) a 4°C toda la noche. Se quitó la solución de anticuerpos y se lavó con 300 µl de solución de bloqueo (10 minutos a TA, agitando, x3). Desde este punto en adelante se trabajó en oscuridad ya que los anticuerpos secundarios son sensibles a la luz. Se removió la solución de bloqueo y se cubrieron los cultivos con 200 µl de anticuerpos secundarios diluidos en solución de bloqueo (ver Tabla 5) durante 2 horas a TA, en agitación. Se quitó la solución de anticuerpos secundarios y se lavó con solución de bloqueo (10 minutos a TA, agitando, x3). Luego de quitar la solución de bloqueo, se lavó con 300 µl de PBS+ 2 veces por 5 minutos y se procedió a la tinción nuclear con 200 µl de DAPI (4',6'-4',6'-diamidino-2-phenylindole) a una concentración de 1:5.000 (diluido en PBS) durante 5 minutos a TA. Para finalizar se lavó 2 veces con PBS+ y se montó. Para el montaje se puso una gota de medio de montaje en cada pocillo y se cubrió con un cubreobjetos sin dejar burbujas. Luego se selló con esmalte de uñas para evitar el resecamiento de los cultivos y se mantuvieron a 4°C.

Tabla 5 – Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para las inmunofluorescencias

	Anticuerpos	IgG	Diluciones empleadas
1^{ario}	α -AGE	Conejo policlonal	1:250
	α -GM130 [†] [EP892Y]	Conejo monoclonal	1:250
	α -Integrina β 1 [EP1041Y]	Conejo monoclonal	1:100
	α - α Tubulina [B-5-1-5]	Ratón monoclonal	1:2000
2^{ario}	Anti IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor 488	Cabra	1:500
	Anti IgG de conejo conjugado a Alexa Fluor 594	Cabra	1:500

* GM130: *Golgi matrix protein 130*

3.6 Obtención de imágenes

Las imágenes de contraste se obtuvieron en un microscopio invertido Nikon ECLIPSE TE200, software NIS-Elements F3.00.

Las imágenes de microscopía confocal de inmunofluorescencia se obtuvieron en el microscopio confocal Leica TCS SP5, software LAS-AF versión 1.0.

3.7 Análisis estadístico

A partir de las imágenes obtenidas con el microscopio de contraste, se tomaron las medidas del área y perímetro de las estructuras formadas en los cultivos 3D usando el programa ImageJ 1.44p (el número de estructuras contadas se muestran en Tabla 6 y Tabla 7). Para analizar estadísticamente las diferencias en el área y perímetro de las estructuras formadas en las distintas condiciones, se utilizó una Prueba T (2 colas, $\alpha = 0,05$) que compara poblaciones con distinto número de muestras, distribución normal y varianza diferente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Puesta a punto de los cultivos en 3D

En vista que los tejidos son estructuras en 3D embebidas en una matriz extracelular con propiedades estéricas y mecánicas particulares, el cultivo en 3D reduce la brecha entre lo real y un cultivo en monocapa, permitiendo un mejor acercamiento a la comprensión del funcionamiento de los órganos^{46,55,56}. Para cumplir con el primer objetivo del trabajo se generaron cultivos en 3D utilizando la línea celular HK-2 de epitelio tubular proximal renal (humano). Las células fueron cultivadas sobre MBr como se describe en los trabajos de Rodríguez-Teja y colaboradores^{41,52}. En un principio se sembraron 5.000 células durante 8 y 10 días, en medio KSFM suplementado con BPE, EGF y penicilina-estreptomicina siguiendo las indicaciones de ATCC y Ryan, M. J. y colaboradores⁵⁹.

En paralelo, se realizaron cultivos controles de células de epitelio glandular prostático RWPE-1 que en el laboratorio son empleadas para generar acinos en 3D^{41,52,57}. Al igual que con las HK-2, 5.000 células RWPE-1 se cultivaron sobre una MBr en medio KSFM suplementado con BPE, EGF y penicilina-estreptomicina. Luego de transcurridos 8 y 10 días, se tomaron fotografías de microscopía de contraste de los cultivos en 3D y se compararon las estructuras formadas en los cultivos con HK-2 versus RWPE-1. Como se puede observar en la Figura 3A en ambos cultivos se

generaron estructuras en 3D. Mientras que las células RWPE-1 formaron estructuras esferoides, las células HK-2 formaron estructuras poligonales, distinguiéndose aún células individuales en los cultivos de 8 y 10 días. Además, los cultivos de HK-2 fueron difíciles de mantener a lo largo del tiempo, ya que a medida que transcurrían los días se comenzaba a ver un aumento en la muerte celular (datos no mostrados).

Con el fin de mejorar las condiciones de cultivo de las HK-2, se realizaron cultivos en 3D de 5.000 células en DMEM suplementado con 5 % de FBS. Este medio de cultivo es recomendado por otros grupos de investigación^{58,61}. En el panel A de la Figura 3 se puede visualizar las imágenes de microscopia de contraste, observándose que los cultivos de las células HK-2 en medio DMEM suplementado con 5 % FBS mejoraron en comparación con los obtenidos en medio KSFM. En los cultivos en medio KSFM se formaron pocas estructuras y de tamaño pequeño; por el contrario, en los cultivos en medio DMEM con 5 % de FBS, las estructuras formadas fueron más grandes y los cultivos fueron mantenidos por 8 y 10 días sin inconvenientes. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal mostraron los distintos cortes transversales de las estructuras formadas en el eje de la Z (*Z- Stack*), y se pudo observar que tanto en los cultivos en 3D de las RWPE-1 como en los dos tipos de cultivos de HK-2 se forma una cavidad central tipo luminal (Figura 3B). Incluso, se pudo distinguir que la cavidad central es más grande y mejor definida en las estructuras encontradas en los cultivos de las HK-2 cultivadas en DMEM

con 5 % FBS en comparación con los cultivos en KSFM. Para obtener una mejor comparación de las dos condiciones de cultivo de las HK-2 (en DMEM con 5 % FBS o en KSFM) se llevaron a cabo cultivos en 3D de 14 días y se realizó una inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra α -tubulina. Las imágenes de microscopía confocal de los cultivos (Figura 3C) mostraron nuevamente que las estructuras formadas en los cultivos con DMEM y 5 % FBS fueron más grandes, con una cavidad central bien definida y presentaron una morfología más esférica que en los cultivos realizados con KSFM. Para cuantificar si el cambio en el tamaño de las estructuras formadas en ambas condiciones era significativo, se midió el área y el perímetro de las mismas a partir de imágenes de microscopía de contraste empleando el programa Image J (Figura 3D). Los resultados mostraron que el área promedio de las estructuras en los cultivos 3D con DMEM es mayor ($1,6510 \pm 0,4863 \mu\text{m}^2 \times 1000$) que el área promedio calculado en los cultivos con KSFM ($0,9271 \pm 0,3238 \mu\text{m}^2 \times 1000$), encontrándose una diferencia significativa mediante la prueba T ($p=0,006534$) (Figura 3D y Tabla 6). Al igual que con el área, el perímetro promedio de las estructuras formadas en los cultivos en 3D con DMEM ($0,1505 \pm 0,0220 \mu\text{m} \times 1000$) fue significativamente mayor que el perímetro promedio de los cultivos con KSFM ($0,1131 \pm 0,0194 \mu\text{m} \times 1000$) (Figura 3 y Tabla 6).

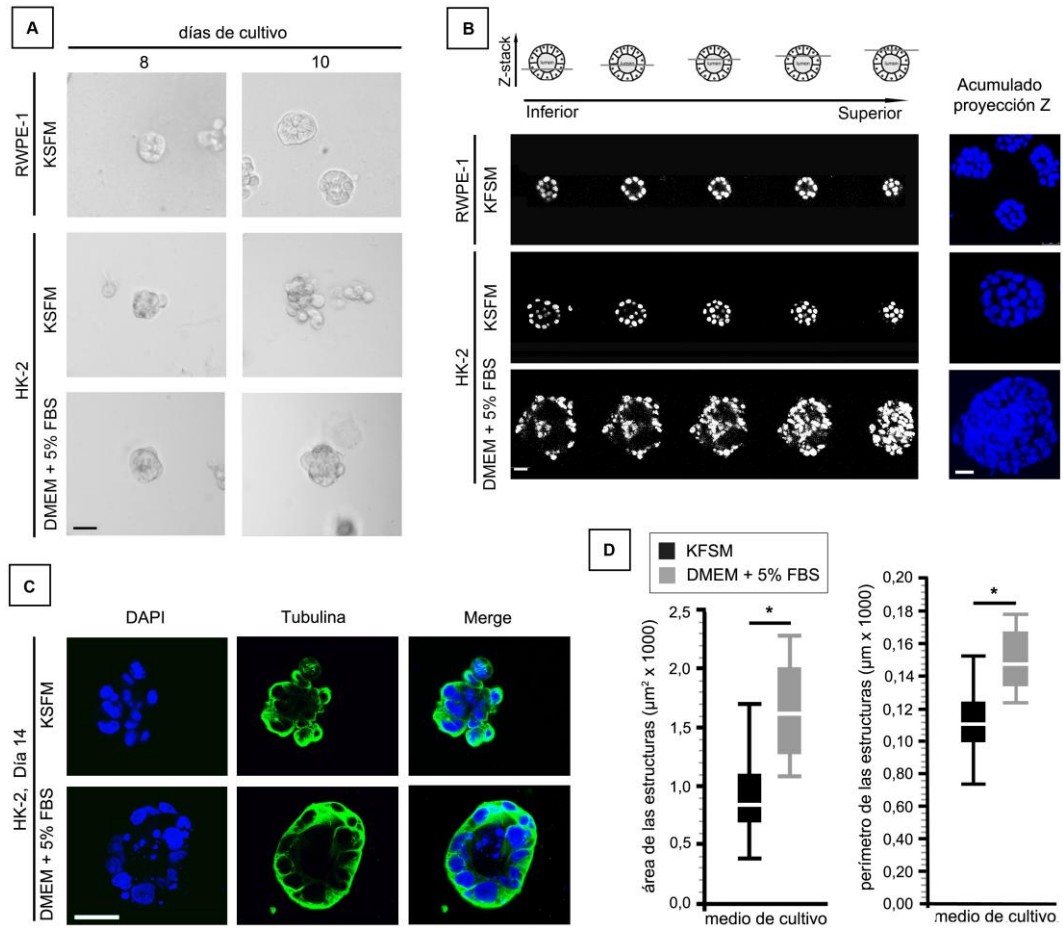


Figura 3 - Cultivos en 3D sobre Matrigel de células RWPE-1 y HK-2 en distintos medios: KFSM (suplementado con BPE y EGF) y DMEM (suplementado con 5 % FBS). (A) Imágenes de microscopía de contraste luego de cultivar las células 8 y 10 días. Magnificación X 20, barra de escala = 20 μm . (B) Microscopía confocal de secciones transversales seriadas de los cultivos en 3D de RWPE-1 y HK-2; en la parte superior se esquematiza la posición relativa de las secciones ópticas con respecto al eje Z. A la derecha se muestra una imagen de la acumulación de todos los planos Z obtenidos. Tinción con nuclear con DAPI, magnificación X 100, barra de escala = 25 μm . (C) Imágenes de microscopía confocal de Inmunofluorescencia realizada a los cultivos en 3D de 14 días de las células HK-2. Tinción nuclear con DAPI en azul y α -tubulina en verde. Magnificación X 63, barra de escala = 25 μm . (D) Representaciones gráficas *box-plot* del área y perímetro de las estructuras formadas (cuartil 25, 50 y 75) luego de cultivar las células HK-2 durante 5 días en medios KFSM y DMEM suplementado por 5% FBS. * $p < 0,05$.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las estructuras formadas en los cultivos en 3D de HK-2 con DMEM suplementado con 5 % FBS son más grandes, menos poligonales y presentan una cavidad central mejor definida que los cultivos con KFSM. De modo que de aquí en más

utilizamos DMEM con 5 % FBS como medio de cultivo para las células HK-2.

Tabla 6 - Área y el perímetro de las estructuras formadas en los cultivos en 3D de HK-2 en medios KSFM y DMEM con 5% FBS.

Células sembradas	Medio de cultivo	N	Perímetro		Área	
			Promedio \pm des. estándar ($\mu\text{m} \times 1000$)	p	Promedio \pm des. estándar ($\mu\text{m}^2 \times 1000$)	P
5000	KSFM + BPE + EGF	24	0,1131 \pm 0,0194	0,002897	0,9271 \pm 0,3238	0,006534
	DMEM + 5% FBS	7	0,1505 \pm 0,0220		1,6510 \pm 0,4863	

Los datos fueron obtenidos a partir de imágenes de microscopía de contraste de cultivos 5 días. El valor p se calculó utilizando la Prueba T; n = número de estructuras contadas en cada condición.

Si bien se vieron mejoras en cuanto a la morfología de las estructuras cuando se utilizaba DMEM con 5 % FBS, pasado los 10 días de cultivo se comenzaba a tener problemas con la sobrevida de las células; con el paso de los días había cada vez menos estructuras. Para mejorar este problema, suplementamos el medio de cultivo DMEM + 5 % FBS con la citoquina HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), la cual interviene en procesos tales como supervivencia, proliferación, locomoción y diferenciación celular, organogénesis, desarrollo y remodelación tisular⁶²⁻⁶⁴. Varios estudios sugieren que el HGF al unirse a su receptor c-met, contribuye con el desarrollo, el mantenimiento y la función del riñón; y en particular con la formación y regeneración del túbulo renal estimulando la proliferación de las células epiteliales y protegiéndolas de la apoptosis^{63,65-67}.

En una primera instancia se realizó una curva de sobrevida al suplementar cultivos en 2D con 10 ng/ml de HGF durante 144 horas,

contándose la cantidad de células vivas a las 24, 72 y 144 horas post sembrado. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica presentada en el panel A de la Figura 4; los mismos revelaron que la cantidad de células por cultivo aumenta rápidamente entre las 0 y 72 horas cuando se suplementa el medio con HGF, alcanzando luego de las 144 horas una meseta debida a la inhibición de la proliferación por contacto celular (confluencia 90 - 100 %). Con este resultado a la vista, se realizaron cultivos en 3D en DMEM con 5 % FBS suplementados con 10 ng/ml de HGF. Como se observa en las imágenes presentadas en la Figura 4B las estructuras formadas en los cultivos con HGF fueron de mayor tamaño que en los cultivos sin la citoquina, aumentando también la sobrevivencia de los cultivos.

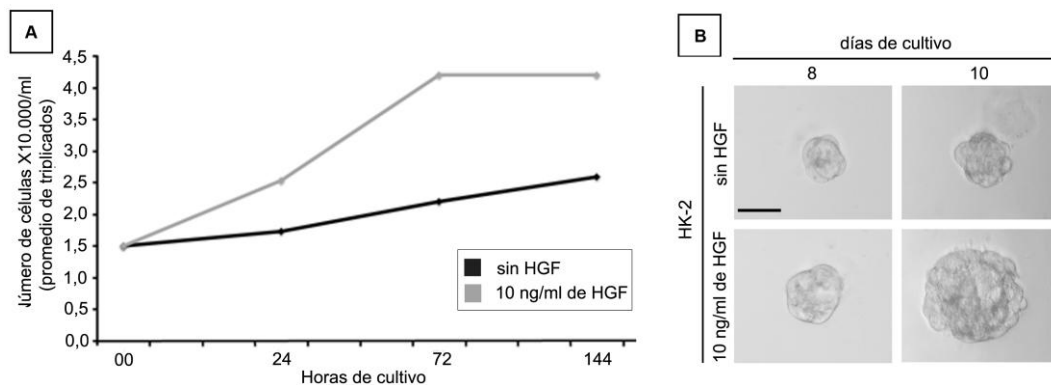


Figura 4- Cultivos en 2D y 3D de células HK-2 en medio DMEM suplementado con 5 % FBS con y sin HGF. (A) Representación gráfica de la sobrevivencia de cultivos en monocapa de células HK-2 de 24, 72 y 144 horas, en presencia o ausencia de 10 ng/ml de HGF. Número de células sembradas: $1,5 \times 10^4$ a una confluencia de 15%. (B) Imágenes de microscopía de contraste luego de cultivar las células 8 y 10 días. Magnificación X 20, barra de escala = 20 μ m.

Los resultados obtenidos concuerdan con las propiedades descritas del HGF sobre el epitelio tubular renal. Esta citoquina cumple un rol protector en las enfermedades renales, actuando como un factor

antifibrótico y favoreciendo de esta manera el mantenimiento de la estructura y función normal del riñón, y deteniendo el desarrollo de la enfermedad renal crónica^{62,63}. HGF antagoniza la acción de la citoquina profibrótica TGF- β 1, mediante la inducción de la expresión del co-represor SnoN en las células epiteliales del túbulo renal. El co-represor SnoN se une al factor de transcripción Smad 2/3 y bloquea su fosforilación, inhibiendo la vía canónica de TGF- β 1 y el programa de TEM⁶⁸. Como resultado de esta competencia, el HGF lleva a una mejora del daño tubular disminuyendo así la progresión de la ERC^{63,67 62,63}.

En estudios previos se demostró que el número de células sembradas afecta la morfología y el tiempo de formación de las estructuras⁵⁵. Para comprobar si un mayor número de células HK-2 mejora el tipo de estructuras formadas en nuestros cultivos 3D, se realizaron cultivos con 10.000, 15.000, 20.000 y 25.000 células en presencia o ausencia de HGF. La Figura 5A muestra imágenes de microscopía de contraste de los cultivos realizados en los ensayos con 5.000 células por 4, 6 y 8 días en presencia o ausencia de HGF; mientras que en panel B se muestran los cultivos realizados a partir de 10.000, 15.000, 20.000 y 25.000 células (5 días). De acuerdo a lo esperado, se pudo verificar que la presencia de HGF induce la formación de estructuras de mayor tamaño que los cultivos sin HGF independientemente del número de células sembradas. Además, a mayor número de células sembradas, mayores fueron las estructuras generadas (Figura 5B).

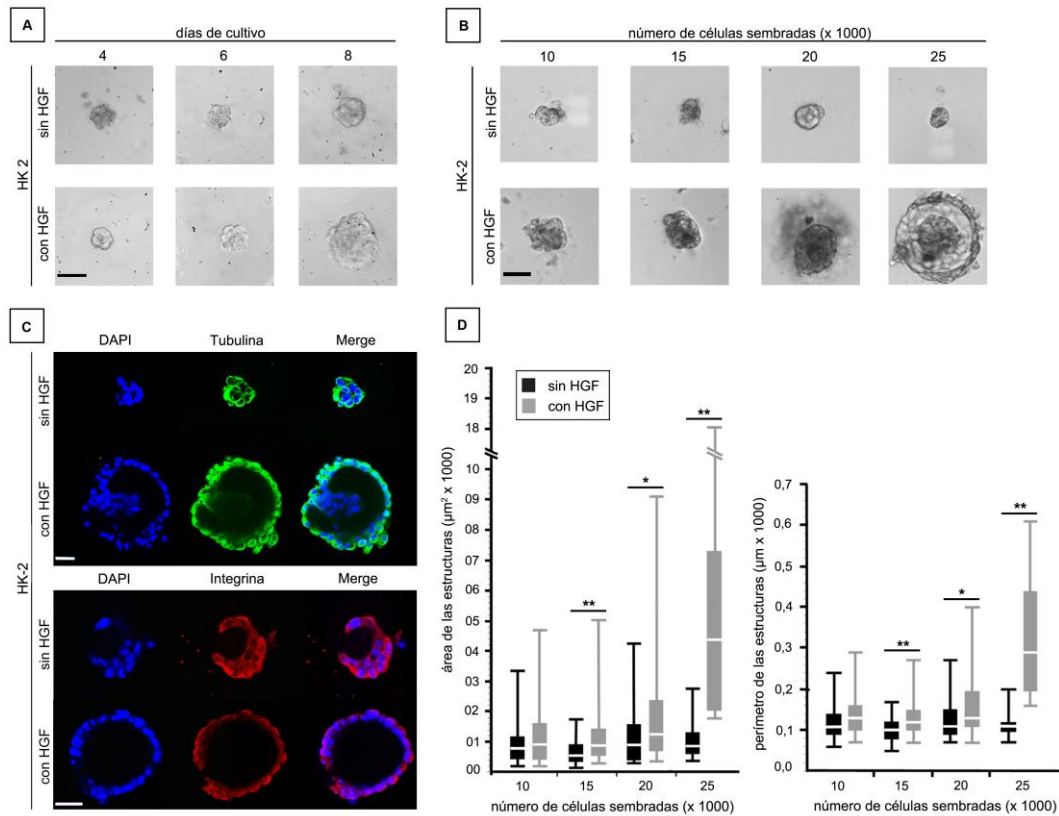


Figura 5- Cultivos en 3D sobre MBr de células HK-2 en medio DMEM suplementado con 5 % FBS con y sin HGF (10 ng/ml). (A) Imágenes de microscopía de contraste luego de cultivar 5 mil células 4, 6 y 8 días. Magnificación X 20, barra de escala = 20 μm . (B) Imágenes de microscopía de contraste luego de cultivar 10, 15, 20 y 25 mil células durante 5 días en presencia o ausencia de HGF. Magnificación X 10, barra de escala = 20 μm . (C) Imágenes de microscopía confocal de Inmunofluorescencia realizada a los cultivos en 3D generados a partir de 25000 células HK-2 (durante 5 días). Tinción nuclear con DAPI en azul, α -tubulina en verde y β 1-integrina en rojo. Magnificación X 63, barra de escala = 25 μm . (D) Representaciones gráficas *box-plot* del área y perímetro de las estructuras formadas (cuartil 25, 50 y 75) luego de cultivar 10, 15, 20 y 25 mil células durante 5 días en presencia o ausencia de HGF. *p<0,05; **p<0,001.

Para descartar la posibilidad de que las grandes estructuras generadas no formaran una cavidad central luminal, se realizó un cultivo en 3D a partir de 25.000 células en presencia o ausencia de HGF para visualizar las estructuras bajo el microscopio confocal. Luego de 5 días, los cultivos fueron fijados para realizar una inmunofluorescencia con los anticuerpos anti- α tubulina y anti- β 1 integrina. Los resultados (Figura 5C) mostraron

que las estructuras formadas en los cultivos con HGF son más grandes que en los cultivos sin HGF y presentan una cavidad central luminal. Nuevamente, para cuantificar las diferencias en el tamaño de las estructuras en cada cultivo se midió el área y el perímetro de cada una de ellas. Los resultados se presentan en las gráficas de la Figura 5D y en la Tabla 7; en ellos se pudo verificar que el valor promedio del perímetro y del área de las estructuras es mayor cuanto más células sean sembradas en un inicio; además, en los cultivos iniciados con más de 15.000 células la diferencia en el perímetro y en el área entre los cultivos con y sin HGF fue significativa.

Tabla 7 - Área y el perímetro de las estructuras formadas en los cultivos en 3D de HK-2 en medios DMEM suplementado con 5% FBS y en presencia o ausencia de HGF.

Células sembradas	HGF (10ng/ml)	n	Perímetro		Área	
			Promedio \pm des. Estándar ($\mu\text{m} \times 1000$)	p	Promedio \pm des. Estándar ($\mu\text{m}^2 \times 1000$)	p
10000	+	52	1,1788 \pm 0,8981	0,079609	0,1326 \pm 0,0475	0,121448
	-	43	0,9300 \pm 0,6100		0,1170 \pm 0,0360	
15000	+	46	1,2001 \pm 0,9591	0,000027	0,1315 \pm 0,0438	0,000115
	-	68	0,6819 \pm 0,3814		0,1020 \pm 0,0281	
20000	+	32	2,5158 \pm 2,7724	0,013856	0,1746 \pm 0,1001	0,020224
	-	33	1,1142 \pm 0,8836		0,1224 \pm 0,0484	
25000	+	36	8,4397 \pm 7,3543	0,000054	0,3253 \pm 0,1461	0,001298
	-	15	0,8307 \pm 0,3817		0,1108 \pm 0,0251	

Los datos fueron obtenidos a partir de imágenes de microscopía de contraste de cultivos 5 días. El valor p se calculó utilizando la Prueba T; n = número de estructuras contadas en cada condición.

Sin embargo, se pudo observar que a mayor número de células empleadas para comenzar los cultivos, se registraba un rango más amplio de valores del área y del perímetro de las estructuras, presentando una heterogeneidad de tamaños muy grande en el mismo cultivo. Este resultado nos lleva a pensar que las estructuras formadas por las HK-2 en los cultivos en 3D se originan como agregados de células individuales, y cuantas más células hay en el cultivo, más grandes son los acúmulos que pueden formarse. En futuros experimentos nos proponemos corroborar esta hipótesis mediante la tinción de las células sembradas con colorantes vitales y el seguimiento en el cultivo de cada una. Este fenómeno de agregación celular no se observa en los cultivos en 3D de las células de epitelio glandular prostático, RWPE-1, ya que independientemente del número de células sembradas, el tamaño de los acinos formados es siempre el mismo, generándose una estructura a partir de una célula.

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta el momento, el medio de cultivo seleccionado para continuar realizando los cultivos en 3D de las células HK-2 fue DMEM con 5 % de FBS suplementado con 10 ng/ml de HGF. Además para los subsecuentes experimentos se realizaron los cultivos en 3D a partir de 25.000 células, de modo de generar estructuras más grandes con una cavidad central predominante.

4.2 Cultivos en 3D de células epiteliales del túbulo proximal renal HK-2 sobre MBr nativa o rica en AGEs

Para poder cumplir con el objetivo de determinar los cambios fenotípicos en los túbulos proximales renales debido a la acumulación de AGEs, se produjo la reacción de Maillard sobre una MBr de acuerdo al protocolo presentado por Rodríguez-Teja y colaboradores⁵² (Figura 2). Luego de realizada la reacción, se cultivaron sobre la MBr rica en AGEs 25.000 células HK-2 en medio DMEM con 5 % de FBS suplementado con 10 ng/ml de HGF. En paralelo, se realizaron cultivos de la misma cantidad de HK-2 con igual medio sobre una MBr nativa para emplear como control negativo. Para poder visualizar la acumulación de AGEs sobre la MBr, se realizó una inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-AGE sobre los cultivos en 3D con MBr nativas versus tratadas con AGEs. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal se muestran en la Figura 6A; allí se observa que los AGEs se encuentran sólo en los cultivos sobre MBr rígida mientras que no se pueden visualizar sobre la MBr nativa. Además, se pueden apreciar AGEs no sólo sobre la MBr del cultivo rígido, sino también intercalados entre las células, posiblemente debido al reclutamiento de componentes de la MBr sobre la membrana celular (acumulación pericelular). En los cultivos realizados sobre MBr rica en AGEs no se observó una disminución del número de células (datos no mostrados), por el contrario se pudo apreciar células en división mitótica

(indicado con flechas blancas en la Figura 6A y C), lo que sugiere viabilidad de los cultivos a pesar de la acumulación de AGEs.

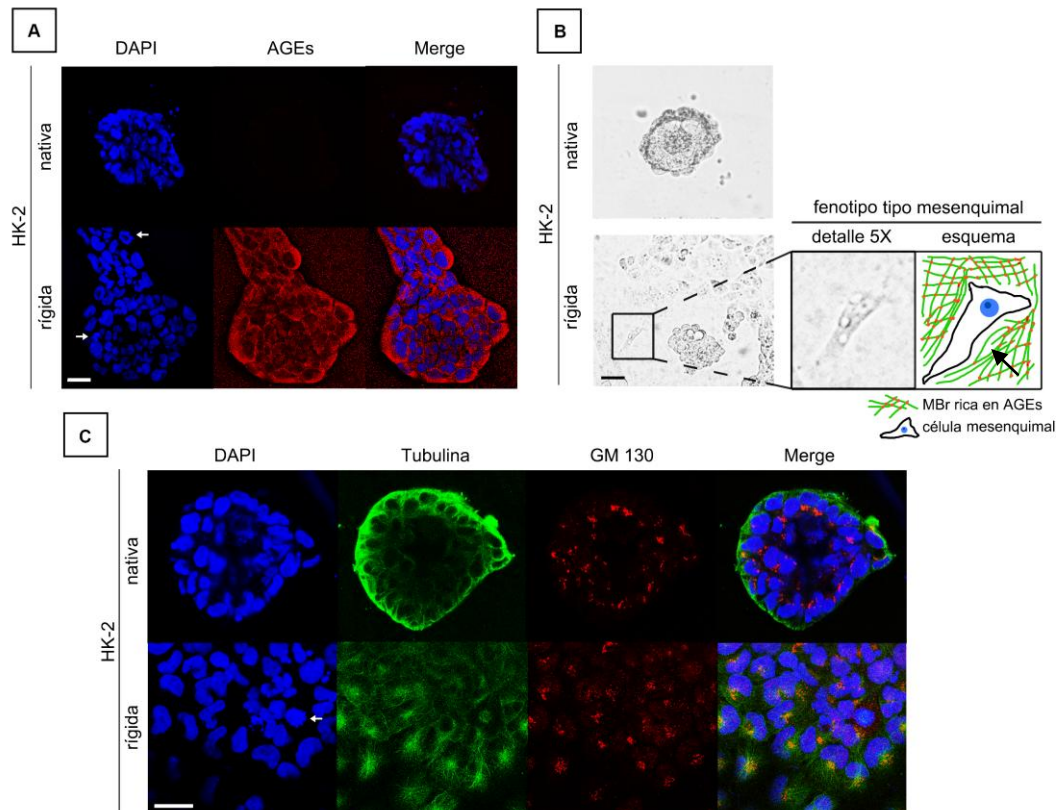


Figura 6 - Cultivos en 3D de células HK-2 sobre MBr nativa o rígida. (A) Imágenes de microscopía confocal de Inmunofluorescencia realizada a los cultivos en 3D de las células HK-2 sobre MBr nativa y tratada con AGEs. Tinción nuclear con DAPI en azul y AGEs en rojo. Magnificación X 63, barra de escala = 25 μ m. (B) Imágenes de microscopía de contraste luego de cultivar las células durante 5 días en MBr nativa y tratada con AGEs. Magnificación X 20, barra de escala = 20 μ m. El recuadro muestra en detalle (aumento 5X) una célula con fenotipo tipo mesenquimal; en verde se esquematiza la MBr, con puntos rojo los AGEs. (C) Imágenes de microscopía confocal de Inmunofluorescencia realizada a los cultivos en 3D de las células HK-2 sobre MBr nativa y rígida. Tinción nuclear con DAPI en azul, α -tubulina en verde y GM130 en rojo. Magnificación X 63, barra de escala = 25 μ m. Las flechas blancas indican las células en mitosis.

En el panel B de la Figura 6 se muestran las imágenes de contraste obtenidas luego de cultivar las células HK-2 durante 5 días sobre MBr nativas y rígidas debido al tratamiento con glicolaldehído. Se pudo apreciar que cuando la MBr está enriquecida con AGEs, se forman

cultivos mayormente en monocapa con pocas estructuras en 3D pequeñas e irregulares; y en concordancia con lo observado en los experimentos anteriores, las estructuras obtenidas en los cultivos controles sobre la MBr nativa fueron de mayor tamaño y de morfología esferoide. Se pudo apreciar un cambio en el fenotipo de las células HK-2 que crecieron sobre la MBr rígida, siendo las mismas más grandes y planas en comparación de las crecidas en condiciones nativas y observándose células con un fenotipo característico mesenquimal sobre la MBr rica en AGEs (recuadro de la Figura 6B). Además, cabe destacar que las pocas estructuras en 3D que se pudieron observar en los cultivos sobre MBr rígida fueron polimórficas y presentaron células que se escapan e invaden la matriz, sugiriendo un aumento de la migración celular. Estos resultados indican que la acumulación de AGEs en el microambiente que sostiene al epitelio tubular nefrítico podría contribuir con el proceso de TEM. Si bien escapa de los objetivos de este trabajo analizar la expresión de marcadores mesenquimales (por ejemplo: α -SMA), los resultados presentados concuerda con varios trabajos referidos en la introducción de esta tesis⁴²⁻⁴⁴. En particular, el trabajo de Oldfield y colaboradores mostró que la exposición de las células del epitelio tubular nefrítico a BSA-AGEs induce la expresión de α -SMA y disminuye la expresión del marcador epitelial E-cadherina; además el empleo de anticuerpos monoclonales anti-RAGE y de inhibidores del

entrecruzamiento (ALT 711) bloqueó el proceso la TEM observada en los cultivos⁴².

Con el fin de profundizar en el estudio del efecto de los AGEs sobre el fenotipo de la célula epitelial HK-2, se realizó una inmunofluorescencia con anticuerpos anti- α tubulina y anti- GM130 (*Cis Golgi-Matrix protein 130*), para visualizar el citoesqueleto y la polaridad apico-basal de las células. En el panel C de la Figura 6 se presentan las imágenes obtenidas en el microscopio confocal. En las mismas se puede observar que las estructuras formadas sobre la MBr nativa fueron esferoides con una cavidad luminal central, mientras que las pocas estructuras 3D formadas sobre la MBr rígida fueron poligonales y no presentaron ninguna cavidad luminal. La localización del aparato de Golgi revelada por el anticuerpo contra GM130 (hacia el lumen, polo apical) nos permitió determinar la existencia de una polaridad apico-basal en el cultivo sobre la MBr nativa; sin embargo, esta polaridad no fue observada en los cultivos ricos en AGEs donde el aparato de Golgi se localizaba en diferentes lugares en las distintas células del cultivo. La pérdida de la polaridad apico-basal es característico de la ganancia del fenotipo mesenquimal pro-fibrótico, sugiriendo una vez más que un microambiente rico en AGEs podría contribuir con el proceso de TEM.

Debido al suplemento de los cultivos con HGF y a las propiedades antifibróticas del mismo mencionadas anteriormente^{63,65}, se podía esperar

que esta citoquina revirtiera el fenotipo de las estructuras causado por los AGEs. Esta reversión no se observó por lo que suponemos que el fenotipo profibrótico debido a la cantidad de AGEs usada en estos experimentos domina a las capacidades anti-fibróticas del HGF. Para estudiar esta hipótesis en un futuro, nos proponemos realizar los experimentos en MBr con distintos grados de rigidez, este gradiente se realizará incubando las membranas con glicoladehído por diferente de tiempo.

En términos generales, los resultados presentados en este trabajo muestran que un ambiente rico en AGEs afecta la formación de estructuras en 3D con cavidad luminal central por parte de las células del epitelio tubular renal, induciendo a la pérdida de la polaridad apico-basal y del fenotipo epitelial (Figura 7, resumen de los resultados obtenidos). Además, la acumulación de AGEs en la MBr induce en algunas células del cultivo la ganancia de un fenotipo mesenquimal pro-fibrótico, apoyando la hipótesis de que un ambiente rico en AGEs contribuye con la TEM^{22,27,38,41,43}. Esta TEM lleva a la pérdida de las características epiteliales de las células tubulares, por lo que se genera una atrofia de los túbulos renales que junto con la fibrosis, inducida también por la acumulación de AGEs, son un sello característico de la ERC^{20,69}. Por último, si la acumulación de AGEs contribuye al proceso de TEM de las células epiteliales del túbulo proximal renal, no es disparatado pensar que un paciente diabético o un individuo adulto mayor, que presentan una

gran acumulación de AGEs en el organismo, sean propensos a sufrir la ERC.

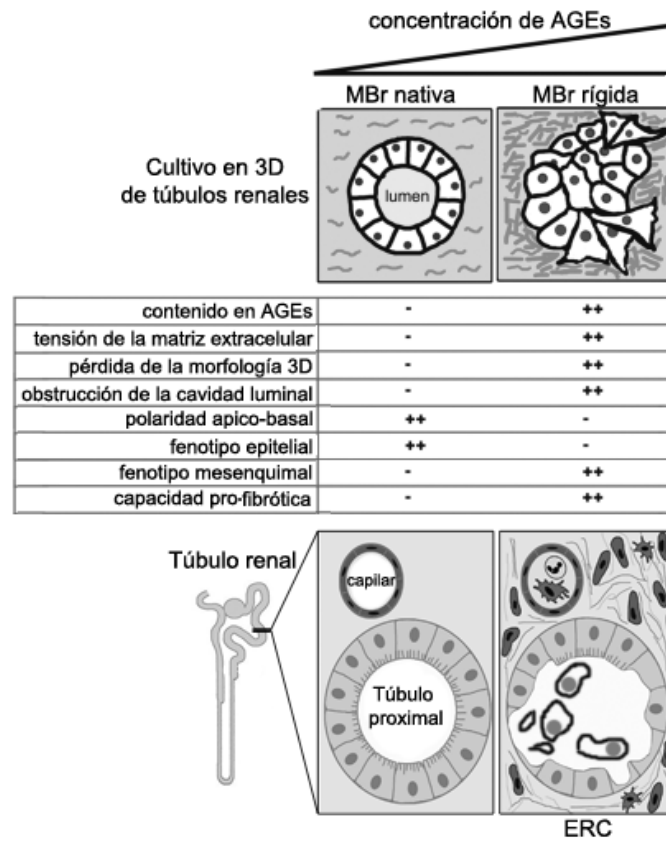


Figura 7 - Cambios fenotípicos en el túbulo proximal renal a causa de la acumulación de AGEs. Se detallan los cambios fenotípicos en el túbulo proximal renal debido a la acumulación de AGEs: aumento en la deposición y rigidez de la matriz extracelular, pérdida de la morfología en 3D, pérdida de la polaridad apico-basal de las células epiteliales y obstrucción de la cavidad luminal.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se logró implementar cultivos en 3D de células epiteliales humanas del túbulo proximal renal HK-2, y se observaron cambios en la arquitectura de las estructuras formadas y en el fenotipo de las células epiteliales debido a un ambiente rico en AGEs. La Figura 8 muestra un esquema de todas las metodologías empleadas y experimentos realizados durante este trabajo. Los cultivos en 3D se pusieron a punto luego de encontrar las condiciones óptimas para la obtención de estructuras en 3D: 25.000 células sembradas en placas de 8 pocillos cultivadas con DMEM y 5 % de FBS, suplementado con 10 ng/ml de HGF durante 5-10 días. Las estructuras obtenidas presentaron una morfología esferoide compuesta por células con una polaridad apico-basal capaces de formar una cavidad luminal central. Por otra parte se produjo la reacción de Maillard sobre MBr con el fin de obtener un microambiente rico en AGEs, acercándose a las condiciones en las cuales podría encontrarse una célula epitelial del túbulo renal de un individuo adulto y/o diabético. Pocas estructuras en 3D pudieron distinguirse en los cultivos sobre las MBr ricas en AGEs; las mismas fueron polimórficas sin cavidad luminal central, observándose una pérdida de la polaridad apico-basal de las células y una presencia en el cultivo de células con fenotipo mesenquimal pro-fibrótico, apoyando que la acumulación de AGEs podría contribuir con una TEM y la progresión de la ERC.

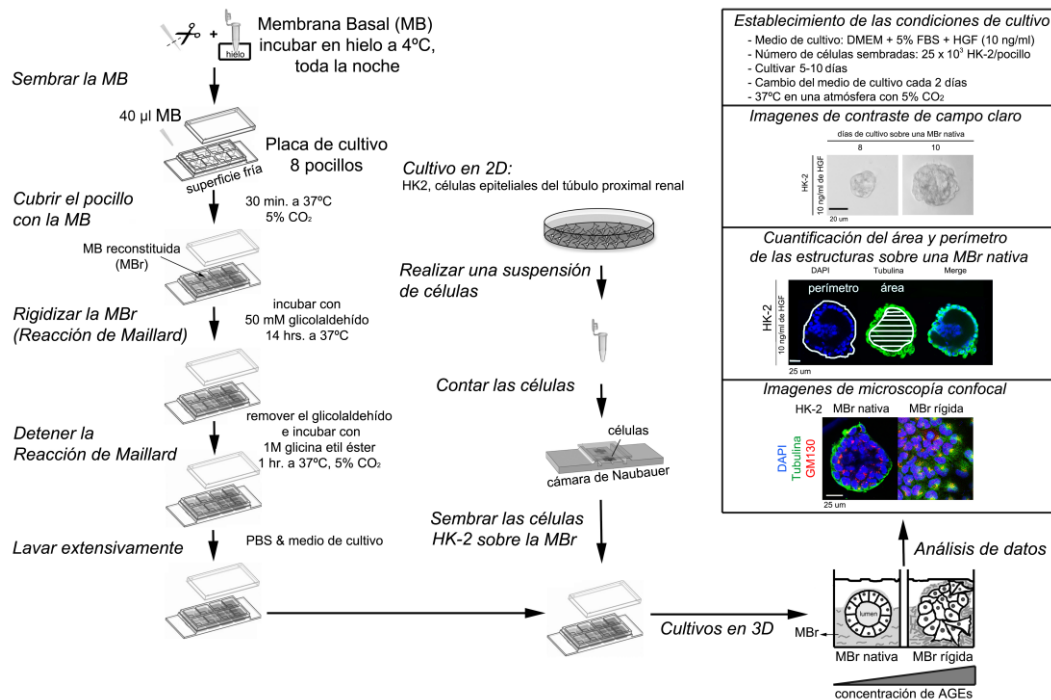


Figura 8 - Esquema de las metodologías empleadas y experimentos realizados durante este trabajo. En este trabajo se implementaron cultivos en 3D de células HK-2 sobre una MBr. Se produjo la reacción de Maillard sobre dicha membrana y se estudiaron los cambios en el fenotipo de los cultivos en 3D causados por una matriz rígida a causa de la acumulación de AGEs

A futuro nos proponemos estudiar la forma en que se generan las estructuras en 3D mediante la tinción con colorantes vitales y seguimiento de las células en el cultivo, de esta manera podremos aceptar o refutar la hipótesis de que las estructuras en 3D generan mediante agregados de células adyacentes y no a partir de la proliferación de una única célula como sucede en el caso de los acinos glandulares prostáticos de células RWPE-1. Además, para realizar una mejor caracterización de las células con fenotipo mesenquimal observadas en los cultivos ricos en AGEs, nos proponemos determinar mediante inmunofluorescencia y/o western blot

la presencia de proteínas marcadoras del fenotipo mesenquimal (como ser: α -SMA y N-caderina), así como la ausencia de marcadores epiteliales (como ser: E-caderina). Mediante una retro-transcripción seguida de una reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa (RT-qPCR) analizaremos posibles cambios en la expresión de genes implicados en la TEM, por ejemplo los factores de transcripción *SNAIL 1/2* y *Twist*. Estos futuros experimentos, conjuntamente con los presentados en este trabajo, nos permitirán profundizar en el conocimiento de cómo los AGEs contribuyen con la TEM y la progresión de la ERC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Liu, Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int.* **69**, 213–217 (2006).
2. Lopez-Guisa, J. M. *et al.* Mannose Receptor 2 Attenuates Renal Fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **23**, 236–251 (2012).
3. Liu, Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* **7**, 684–96 (2011).
4. Chung, A. C. K. & Lan, H. Y. Chemokines in renal injury. *J Am Soc Nephrol* **22**, 802–809 (2011).
5. Han, H. *et al.* Renal Recruitment of B Lymphocytes Exacerbates Tubulointerstitial Fibrosis by Promoting Monocyte mobilisation and infiltration after unilateral ureteral obstruction. *J. Pathol.* (2016). doi:10.1002/path.4831
6. Tapmeier, T. T. *et al.* Pivotal role of CD4+ T cells in renal fibrosis following ureteric obstruction. *Kidney Int.* **78**, 351–362 (2010).
7. Alaga, M., Carzoglio, P., Décima, R., Funes, R. & Spiess, C. Cambios morfológicos , celulares y moleculares en la fibrosis renal debido al envejecimiento. *AnFaMed* **2**, 71–83 (2015).
8. Lovisa, S., Zeisberg, M. & Kalluri, R. Partial Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Other New Mechanisms of Kidney Fibrosis. *Trends Endocrinol. Metab.* **27**, 681–695 (2016).
9. Lebleu, V. S. *et al.* Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat. Med.* (2013). doi:10.1038/nm.3218
10. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428 (2009).
11. Grande, M. T. *et al.* Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat. Med.* (2015). doi:10.1038/nm.3901
12. Lovisa, S. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat. Med.* **21**, 998–1009 (2015).
13. Litke, R., Tessier, J., Boulanger, E. & Frimat, M. Kidney , heart and brain : three organs targeted by ageing and glycation. *Clin. Sci.* **131**, 1069–1092 (2017).
14. Yamagishi, S. & Matsui, T. Pathological role of dietary advanced glycation end products in cardiometabolic disorders and the therapeutic intervention. *Nutrition* (2015). doi:10.1016/j.nut.2015.08.001
15. Thornalley, P. J. *et al.* Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem. J.* **592**, 581–592 (2003).
16. Rahbar, S. Hemoglobin H Disease In Two Iranian Families. *Clin. Chim. Acta* **20**, 381–385 (1968).

17. Rahbar, S., Blumenfeld, O., Ranney, H. M. Studies of an unusual Hemoglobin in patients with Diabetes Mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 838–843 (1969).
18. Jaramillo, R. *et al.* DNA Advanced Glycation End Products (DNA-AGEs) Are Elevated in Urine and Tissue in an Animal Model of Type 2 Diabetes. *Chem. Res. Toxicol.* **30**, 689–698 (2017).
19. Aragno, M. & Mastrocola, R. Dietary Sugars and Endogenous Formation of Advanced Glycation Endproducts: Emerging Mechanisms of Disease. *Nutrients* **9**, 385 (2017).
20. Stinghen, A. E. M., Massy, Z. A., Vlassara, H., Striker, G. E. & Boullier, A. Uremic Toxicity of Advanced Glycation End Products in CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 354–370 (2016).
21. Tanji, N. *et al.* Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 1656–1666 (2000).
22. Ott, C. *et al.* Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.* **2**, 411–429 (2014).
23. Luevano-Contreras, C. & Chapman-Novakofski, K. Dietary advanced glycation end products and aging. *Nutrients* **2**, 1247–1265 (2010).
24. Uribarri, J. *et al.* Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet. *J. Am. Diet. Assoc.* **110**, 911–916.e12 (2010).
25. Peng, X., Ma, J., Chen, F., Wang, M. Food & Function Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation. *Food Funct.* **2**, 289–301 (2011).
26. Zhuang, A. & Forbes, J. M. Diabetic kidney disease: a role for advanced glycation end-product receptor 1 (AGE-R1)? *Glycoconj. J.* **33**, 645–652 (2016).
27. Bohlender, J. & Franke, S. Advanced glycation end products and the kidney. *Am. J. ...* **289**, F645–F659 (2005).
28. Mallipattu, S. K. & Uribarri, J. Advanced glycation end product accumulation : a new enemy to target in chronic kidney disease ? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **23**, 547–554 (2014).
29. Vlassara, H. *et al.* Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 11704–8 (1994).
30. Bierhaus, A. & Nawroth, P. P. Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia* **52**, 2251–2263 (2009).
31. Betjes, M. G. H. Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease. *Nat. Publ. Gr.* **9**, 255–26544 (2013).
32. Shanmugam, N., Reddy, M. A. & Natarajan, R. Distinct roles of heterogeneous nuclear ribonuclear protein K and microRNA-16 in cyclooxygenase-2 RNA stability induced by S100b, a ligand of the receptor for advanced glycation end products. *J. Biol. Chem.* **283**, 36221–36233 (2008).

33. Li, L.-M. *et al.* Role of microRNA-214-targeting phosphatase and tensin homolog in advanced glycation end product-induced apoptosis delay in monocytes. *J. Immunol.* **186**, 2552–2560 (2011).
34. Hagiwara, S., McClelland, A. & Kantharidis, P. MicroRNA in Diabetic Nephropathy: Renin Angiotensin, AGE / RAGE, and Oxidative Stress Pathway. *J. Diabetes Res.* **2013**, 1–11 (2013).
35. Kim, K. M., Kim, Y. S., Jung, D. H., Lee, J. & Kim, J. S. Increased glyoxalase I levels inhibit accumulation of oxidative stress and an advanced glycation end product in mouse mesangial cells cultured in high glucose. *Exp. Cell Res.* **318**, 152–159 (2012).
36. Uribarri, J. *et al.* Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation endproducts: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **62**, 427–33 (2007).
37. Feng, J. X. *et al.* Restricted intake of dietary advanced glycation end products retards renal progression in the remnant kidney model. *Kidney Int.* **71**, 901–911 (2007).
38. Poulsen, M. W. *et al.* Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food Chem. Toxicol.* **60**, 10–37 (2013).
39. Candiello, J., Cole, G. J. & Halfter, W. Age-dependent changes in the structure, composition and biophysical properties of a human basement membrane. *Matrix Biol.* **29**, 402–410 (2010).
40. Halfter, W. *et al.* Protein composition and biomechanical properties of in vivo-derived basement membranes. *Cell Adhes. Migr.* **7**, 64–71 (2013).
41. Rodriguez-Teja, M. *et al.* AGE-modified basement membrane cooperates with Endo180 to promote epithelial cell invasiveness and decrease prostate cancer survival. *J. Pathol.* **235**, 581–592 (2015).
42. Oldfield, M. D. *et al.* Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J. Clin. Invest.* **108**, 1853–1863 (2001).
43. Li, J. H. *et al.* Advanced glycation end products induce tubular epithelial-myofibroblast transition through the RAGE-ERK1/2 MAP kinase signaling pathway. *Am. J. Pathol.* **164**, 1389–1397 (2004).
44. Kumar, P. A. *et al.* Carboxymethyl lysine induces EMT in podocytes through transcription factor ZEB2: Implications for podocyte depletion and proteinuria in diabetes mellitus. *Arch. Biochem. Biophys.* **590**, 10–19 (2016).
45. Kim, J. Bin. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 365–377 (2005).
46. MacQueen, H., Loughlin, J. & Daya, S. Three-dimensional cell culture. *Methods* **370**, 203–211 (2007).
47. Pampaloni, F., Reynaud, E. G. & Stelzer, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 839–845 (2007).

48. Baker, B. M. & Chen, C. S. Deconstructing the third dimension - how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J. Cell Sci.* **125**, 3015–3024 (2012).
49. Cukierman, E. Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science (80-.)*. **294**, 1708–1712 (2001).
50. Rahman, A. *et al.* Vinculin regulates directionality and cell polarity in two- and three-dimensional matrix and three-dimensional microtrack migration. *Mol. Biol. Cell* **27**, 1431–1441 (2016).
51. Joaquin, D. *et al.* Cell migration and organization in three-dimensional in vitro culture driven by stiffness gradient. *Biotechnol. Bioeng.* **113**, 2496–2506 (2016).
52. Rodriguez-Teja, M. *et al.* How to Study Basement Membrane Stiffness as a Biophysical Trigger in Prostate Cancer and Other Age-related Pathologies or Metabolic Diseases. *J. Vis. Exp.* **115**, 1–10 (2016).
53. Raghavan, S. *et al.* Decoupling diffusional from dimensional control of signaling in 3D culture reveals a role for myosin in tubulogenesis. *J. Cell Sci.* **123**, 2877–2883 (2010).
54. Kunz-Schughart, L., Freyer, J., Hofstaedter, F. & Ebner, R. The Use of 3-D Cultures for High-Throughput Screening : *J. Biomol. Screen.* **9**, 273–285 (2004).
55. Prange, J. A. *et al.* Human proximal tubule cells form functional microtissues. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **468**, 739–750 (2016).
56. Brien, L. E. O., Zegers, M. M. P. & Mostov, K. E. Culture Models. *Cell* **3**, 1–7 (2002).
57. Rodriguez-Teja, M. *et al.* Survival Outcome and EMT Suppression Mediated by a Lectin Domain Interaction of Endo180 and CD147. *Mol. Cancer Res.* **13**, 538–547 (2015).
58. Kher, R. *et al.* Ectopic expression of cadherin 8 is sufficient to cause cyst formation in a novel 3D collagen matrix renal tubule culture. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **301**, C99–C105 (2011).
59. Ryan, M. J. *et al.* HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int.* **45**, 48–57 (1994).
60. Bello, D., Webber, M. M., Kleinman, H. K., Waringer, D. D. & Rhim, J. S. Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18. *Carcinogenesis* **18**, 1215–1223 (1997).
61. Tian, Y.-C. *et al.* Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta1 enhance HK-2 cell migration through a synergistic increase of matrix metalloproteinase and sustained activation of ERK signaling pathway. *Exp. Cell Res.* **313**, 2367–77 (2007).
62. Mao, S. & Zhang, J. The emerging role of hepatocyte growth factor in renal diseases. *J. Recept. Signal Transduct.* **36**, 303–309 (2016).
63. Liu, Y. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **287**, F7–F16 (2004).
64. Esposito, C. *et al.* The antifibrogenic effect of hepatocyte growth factor (HGF) on renal tubular (HK-2) cells is dependent on cell growth. *Growth factors* **27**, 173–

- 180 (2009).
65. Liu, Y. Hepatocyte growth factor and the kidney. *Curr. Opin. Nephrol Hypertens.* **11**, 23–30 (2002).
 66. Liu, Y., Centracchio, J. N., Lin, L., Sun, A. M. & Dworkin, L. D. Constitutive expression of HGF modulates renal epithelial cell phenotype and induces c-met and fibronectin expression. *Exp. Cell Res.* **242**, 174–185 (1998).
 67. Yang, J. & Liu, Y. Blockage of Tubular Epithelial to Myofibroblast Transition by Hepatocyte Growth Factor Prevents Renal Interstitial Fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **13**, 96–107 (2002).
 68. Yang, J., Zhang, X., Li, Y. & Liu, Y. Downregulation of Smad Transcriptional Corepressors SnoN and Ski in the Fibrotic Kidney : An Amplification Mechanism for TGF- β 1 Signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 3167–3177 (2003).
 69. Schelling, J. R. Tubular atrophy in the pathogenesis of chronic kidney disease progression. *Pediatr. Nephrol.* **31**, 693–706 (2016).

ANEXO 1- Soluciones

Inmunofluorescencia	
PBS+ (volumen final: 200 ml)	CaCl ₂ 0,1 mM
	MgCl ₂ 0,5 mM
	Llevar a volumen final con H ₂ O _{dd}
0,5% Triton X-100 (volumen final: 50 ml)	Triton X-100 250 µl
	Llevar a volumen final con PBS+
Solución de desactivación (volumen final: 50 ml)	NH ₄ Cl 75 mM
	Glicina 20 mM
	Llevar a volumen final con PBS+
Solución de bloqueo 10x (volumen final: 500 ml)	NaCl 38 g
	Na ₂ HPO ₄ 9,38 g
	NaH ₂ PO ₄ 2,07 g
	BSA 5,0 g
	Triton X-100 25 ml (0,5% final)
	Tween-20 2,05 ml
	Llevar a volumen final con H ₂ O _{dd} y ajustar pH=7,4
Reacción de Maillard	
PBS	1 tableta cada 100 ml de H ₂ O _{dd}
	Autoclavar
Glicolaldehído 50 mM (volumen final: 50 ml)	Glicolaldehído 0,3 g
	Llevar a volumen final con Buffer fosfato 0,2 M, pH=7,8
	Esterilizar por filtración con filtro de 0,22 µm
Buffer fosfato (volumen final: 50 ml)	Na ₂ HPO ₄ 0,4 M 4,25 ml
	NaH ₂ PO ₄ 0,4 M 45,75 ml
Glicina etil éster 1 M (volumen final: 50 ml)	Glicina etil éster 6,98 g
	Llevar a volumen final con PBS autoclavado
	Esterilizar por filtración con filtro de 0,22 µm

ANEXO 2- Reactivos y fungibles

	Nombre	Compañía	Número de catálogo	Comentarios
Cultivo en 2D	Crioviales	Greiner Bio-one International	126263	
	DMEM	ThermoFisher Scientific	10566-016	
	DMSO	Sigma-Aldrich	D2438	
	FBS	ThermoFisher Scientific	10437-028	Mantener en alícuotas a -20°C
	KSFM kit	ThermoFisher Scientific	10724-011	No calentar a 37°C
	PBS (Dulbecco A) - tabletas	Oxoid	BR0014G	
	Penicilina – Estreptomina	ThermoFisher Scientific	15140-148	Mantener a -20°C
	Placas de cultivo	Greiner bio-one International	664-160	
	Tripsina – EDTA (0,05%)	ThermoFisher Scientific	25300-054	Mantener en alícuotas a -20°C
Cultivo en 3D	Cámara de cultivo – 8 pocillos	Merck Millipore	PEZGS0816	
	Filtros de jeringa 0,22µm	Appleton Woods	BC680	
	Glicina etil éster	Sigma-Aldrich	50060	Irritante para los ojos.
	Glicolaldehído	Sigma-Aldrich	G6805	Mantener a 4°C
	HGF	ThermoFisher Scientific	PHG0254	Mantener en alícuotas entre -20°C y -80°C
	Membrana basal reconstituida	Trevigen	3445-005-01	Mantener: a largo plazo a -80°C, a corto plazo en alícuotas a -20°C
Inmunofluorescencia	Ac. α-AGE	Abcam	ab23722	Mantener a -20°C
	Ac. α-GM130	Abcam	ab52649	Mantener a -20°C
	Ac. α-Integrina β1	Abcam	ab52971	Mantener a -20°C
	Ac. α-Tubulina	Sigma-Aldrich	T5168	Mantener a -20°C
	Anti IgG de ratón, conjugado a Alexa Fluor 488	ThermoFisher Scientific	A11001	Sensible a la luz. Mantener a 4°C
	Anti IgG de conejo, conjugado a Alexa Fluor 594	ThermoFisher Scientific	A11012	Sensible a la luz. Mantener a 4°C
	BSA	Sigma-Aldrich	A7906	Mantener a 4°C
	Cloruro de Amonio (NH ₄ Cl)	Mallinckrodt Inc.	3384	
	Cloruro de Calcio (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich	C3306	
	Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich	M8266	
Cloruro de Sodio (NaCl)	Dorwil	D2190-03-21		

Inmunofluorescencia	DAPI	ThermoFisher Scientific	D3571	Sensible a la luz. Mantener en alícuotas a -20°C
	Glicina	Sigma-Aldrich	G8790	
	Paraformaldehído	Sigma-Aldrich	158127	Mantener en alícuotas a -20°C
	Sodio Fosfato dibásico (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich	S7907	
	Sodio Fosfato monobásico (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich	S8282	
	Suero de cabra	Abcam	ab7481	Mantener en alícuotas a -20°C
	Tritón X-100	Sigma-Aldrich	T8787	
	Tween - 20	Sigma-Aldrich	P9416	