

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN SOPORTE CELULAR A
BASE DE QUITOSANO, ALCOHOL POLIVINILICO Y PROTEÍNAS DE ADHESIÓN
DE LA MEMBRANA BASAL GLOMERULAR PARA EL CULTIVO DE PODOCITOS

POR
Q.F.B SARA PAOLA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

ENERO, 2016

APROBACIÓN DE TESIS POR EL COMITÉ

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN SOPORTE CELULAR A
BASE DE QUITOSANO, ALCOHOL POLIVINILICO Y PROTEÍNAS DE ADHESIÓN DE
LA MEMBRANA BASAL GLOMERULAR PARA EL CULTIVO DE PODOCITOS

Comité de Tesis

Dra. Diana Ginette Zárate Triviño
Presidente

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario

Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal

Dr. Moisés Armides Franco Molina
Vocal

Dr. Juan José Bollain y Goytia de la Rosa
Vocal

I. AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las doctoras Cristina Rodríguez Padilla y a la doctora Diana Ginette Zárate Triviño por sus grandes contribuciones en la realización de esta tesis.

A los doctores Pablo Zapata Benavides, Moisés Franco Molina y Juan José Bollain y Goytia de la Rosa por la revisión y recomendaciones realizadas en el presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Al personal académico, técnico y administrativo de los laboratorios de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y de los laboratorios de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Zacatecas por su ayuda en el desarrollo de este estudio

II. DEDICATORIA

A mi madre, hermanos y sobrinos por ser mi principal apoyo e inspiración para llevar a cabo y concluir esta etapa en mi vida.

A mis profesores por ser una parte integral en mi vida.

III. ÍNDICE DE CONTENIDO

Sección	Página
I. AGRADECIMIENTOS _____	I
II. DEDICATORIA _____	II
III. ÍNDICE DE CONTENIDO _____	III
IV. ÍNDICE DE TABLAS _____	VI
V. ÍNDICE DE FIGURAS _____	VII
VI. ÍNDICE DE GRÁFICAS _____	VIII
VII. NOMENCLATURA _____	IX
VIII. RESUMEN _____	XI
1. INTRODUCCIÓN _____	1
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN _____	4
3. ANTECEDENTES _____	5
3.1 Ingeniería de tejidos _____	5
3.2 Uso de biomateriales en la ingeniería de tejidos _____	7
3.2.1 Alcohol polivinílico (PVA): características y aplicaciones_	8
3.2.2 Quitosano (CS): características y aplicaciones_____	8
3.2.3 Soportes a base de CS_____	9
3.3 Hinchamiento de soportes_____	10
3.4 Degradación de soportes_____	11
3.5 Espectroscopia de infrarrojo_____	11
3.6 Aplicación de la ingeniería de tejidos en el riñón_____	12
3.7 Estructura y función del riñón_____	13
3.8 Estructura y función de los podocitos_____	14
3.8.1 Dominios de superficie del podocito_____	16
3.8.1.1 Dominio apical_____	16

3.8.1.2	Dominio del diafragma de filtración_____	17
3.8.1.3	Dominio de anclaje_____	19
3.9	Barrera de filtración glomerular_____	20
3.10	Papel de los podocitos en enfermedades glomerulares_____	21
3.11	Importancia del estudio de los podocitos_____	22
3.12	Síndrome Nefrótico _____	23
3.13	Clasificación del SN_____	24
3.14	Fisiopatología del Síndrome Nefrótico Idiopático (SN-I)____	24
4.	HIPÓTESIS_____	27
5.	OBJETIVOS_____	28
5.1	OBJETIVO GENERAL_____	28
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS_____	28
6.	MATERIAL Y MÉTODOS_____	29
6.1	Obtención del soporte celular_____	29
6.2	Ensayo de hinchamiento y degradación_____	29
6.3	Evaluación de las interacciones físico-químicas por espectroscopia de infrarrojo (FTIR _____)	30
6.4	Material biológico_____	30
6.5	Cultivo celular_____	31
6.5.1	Cultivo primario de podocitos a partir de tejido renal murino por selección positiva_____	31
6.5.2	Cultivo primario de podocitos a partir de SU por selección positiva_____	32
6.6	Co-localización de CD80/Podocalixina y Podocina/Podocalixina _____	33
6.7	Viabilidad celular por cuantificación de L-lactato deshidrogenasa (LDH)_____	34
6.8	Análisis estadístico _____	35
7.	RESULTADOS_____	36
7.1	Obtención de soportes celulares_____	36
7.2	Ensayo de hinchamiento_____	37

7.3 Ensayo de degradación	38
7.4 Espectroscopia de infrarrojo (FTIR)	39
7.5 Obtención de podocitos por selección positiva	41
7.6 Co-localización de CD80/Podocalixina y Podocina/Podocalixina	43
7.7 Viabilidad de podocitos cultivados	49
8. DISCUSIÓN	51
9. CONCLUSIONES	55
10. PERSPECTIVAS	56
11. ANEXOS	57
12. LITERATURA CITADA	58
13. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO	65

IV. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Criterios de clasificación del ISKDC_____	23
2. Material biológico_____	30
3. Condiciones de preparación de soportes celulares _____	36
4. Porcentaje de hinchamiento de soportes celulares_____	37
5. Porcentaje de degradación de soportes celulares_____	38
6. Grupos funcionales característicos del CS y PVA_____	39
7. Determinación del número de podocitos viables obtenidos por selección positiva de tejido renal murino y SU de SS y pacientes de SN-I_____	41
8. Coeficientes de correlación de Pearson_____	46

V. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estrategia acelular_____	6
2. Estrategia celular_____	6
3. Estructura molecular del alcohol polivinílico_____	8
4. Estructura molecular de quitina y quitosano_____	9
5. Composición del glomerulo_____	14
6. Componentes de la barrera de filtración glomerular_____	15
7. Dominio apical de los podocitos_____	17
8. Dominio del diafragma de filtración_____	18
9. Dominio de anclaje_____	20
10. Barrera de filtración glomerular_____	21
11. Mecanismos fisiopatológicos del SN-I_____	26
12. Soportes _____	36
13. Determinación de la expresión de CD80 y Podocalixina en podocitos_	43
14. Determinación de la expresión de Podocina y Podocalixina en podocitos	44
15. Co-localización de la expresión de CD80/Podocalixina y Podocina/Podocalixina _____	47
16. Modelo representativo del cultivo primario en soporte celular y cultivo control _____	50

VI. ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1. Porcentaje de hinchamiento_____	37
2. Porcentaje de degradación _____	38
3. Espectros de infrarrojo _____	40
4. Número de podocitos obtenidos por selección positiva de tejido renal murino y SU de SS y pacientes de SN-I_____	42
5. Determinación del número de podocitos adheridos al cultivo control y al soporte mediante espectroscopia de fluorescencia_____	42
6. Determinación de la expresión de CD80 en podocitos_____	44
7. Determinación de la expresión de Podocina en podocitos_____	45
8. Determinación de la expresión de Podocalixina en podocitos_____	45
9. Determinación de la co-localización de la expresión de CD80/Podocalixina_____	48
10. Determinación de la co-localización de la expresión de Podocina/Podocalixina_____	48
11. Cuantificación de la concentración de L-lactato deshidrogenasa en sobrenadantes de cultivo de podocitos en cultivo control_____	49
12. Cuantificación de la concentración de L-lactato deshidrogenasa en sobrenadantes de cultivo de podocitos en soporte_____	50

VII. NOMENCLATURA

Abreviatura	Significado
%	Porcentaje
C°	Grado centígrado
cm ²	Centímetro cuadrado
dl	Decilitro
g	Gramo
hrs	Horas
µg	Microgramos
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mmol	Milimol
m ³	Metros cúbicos
pH	Logaritmo negativo de base 10 de la actividad de los iones hidrógeno
ATR	Reflectancia total atenuada
BSA	Albumina sérica bovina
CD	Corticodependiente
CD2AP	Proteína asociada a CD2
Col IV	Colágena tipo IV
CS	Quitosano
CS	Corticosensible
CR	Corticorresistente
CrU	Creatinina en orina

ECM	Matriz extracelular
FSGS	Glomeruloesclerosis focal segmentaria
FTIR	Espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier
GFB	Barrera de filtración glomerular
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IgE	Inmunoglobulina tipo E
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
kDa	Kilodalton
kGy	Kilogray
ISKDC	International Study of Kidney Disease in Children
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPS	Lipopolisacárido
MBG	Membrana Basal Glomerular
MCD	Cambios mínimos
NHERFA2	Proteína ligada al citoesqueleto de actina a través de un factor 2
PrU	Proteína en orina
PVA	Alcohol polivinílico
SBF	Suero fetal bovino
SD	Diafragma de filtración
SS	Sujetos sanos
SU	Sedimento urinario
VEGF	Crecimiento endotelial vascular
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

VIII. RESUMEN

El principio fundamental de la ingeniería tisular es recuperar y reparar tejidos u órganos dañados a partir del uso de estructuras de soporte a base de biomateriales que estimulan la supervivencia celular, diferenciación y síntesis de matriz extracelular en cultivos celulares. Las enfermedades renales se han convertido en un problema de salud pública y los avances clínicos han identificado al podocito como la célula predominante de daño en dichas enfermedades. Sin embargo existen diversos inconvenientes para establecer un modelo de estudio de estas células debido a que presentan un tiempo corto de vida, por lo que lograr mantener la viabilidad celular del podocito por más tiempo mediante el uso de un soporte celular a base de CS y PVA en combinación con colágena tipo IV y $\alpha_3\beta_1$ integrina ayudara al entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en estas patologías. Se sintetizaron cinco soportes celulares (CS, PVA, CS/PVA, CS/PVA/Col IV y CS/PVA/Col IV/ $\alpha_3\beta_1$ integrina) mediante química aditiva a los cuales se les determino el porcentaje de hinchamiento y degradación, y posteriormente las interacciones químicas entre los componentes de los soportes por la técnica de espectroscopia de infrarrojo (FTIR). Una vez identificado el soporte más estable e ideal para cultivo celular se realizó la obtención de podocitos por selección positiva y se determinó la expresión de Podocina, Podocalixina y CD80 por Inmunofluorecencia indirecta (IFI) y la viabilidad de los podocitos cultivados por cuantificación de L-lactato deshidrogenasa con la técnica de ELISA. La química aditiva permitió la co-polimerización de los componentes disminuyendo el porcentaje de hinchamiento y degradación del soporte CS/PVA/Col IV/ $\alpha_3\beta_1$ integrina en contraste con los otros y se observó que las interacciones químicas tienen afinidad con los grupos amino (NH_2) del CS. La expresión de Podocina y Podocalixina no se ve afectada en contraste con la expresión de CD80 que se incrementa en podocitos cultivados sobre el soporte y la viabilidad del podocito se mantiene sobre el soporte.

1. INTRODUCCIÓN

El principio fundamental de la ingeniería tisular es recuperar y reparar tejidos u órganos dañados a partir de diferentes alternativas que involucran el uso de estructuras de soporte a base de biomateriales que imitan el ambiente fisiológico, por lo que el estudio de los factores comprometidos en esta área, cultivos celulares y moléculas o grupos bioactivos han sido motivo de interés para el avance de la tecnología médica (Colorado *et al.*, 2010; Dvir *et al.*, 2011; Tamayo *et al.*, 2013). La Segunda Guerra Mundial fue el escenario que marcó el inicio a la era de los biomateriales, ya que la necesidad inmediata de tratar diversas lesiones dio lugar a la búsqueda de tratamientos que mejoraran la calidad de vida de los heridos en combate. Sin embargo este proceso se llevó a cabo bajo una mínima regulación, desencadenando respuestas adversas por lo que una gran cantidad de materiales fueron descartados, dando paso a una investigación más profunda y detallada de las características y propiedades de aquellos que habían dado resultados exitosos. Estos procedimientos determinaron que gran cantidad de materiales quedarán descartados en ese momento y se investigara a fondo aquellos que habían dado resultados exitosos (Grimaldo *et al.*, 2010). Los biomateriales se pueden obtener a partir de polímeros naturales y polímeros sintéticos por medio de procesos físicos o químicos (Peluffo 2012; Ino *et al.*, 2013; Sumrita *et al.*, 2013).

El alcohol polivinílico (PVA) es un polímero sintético obtenido a partir de hidrólisis ácida o básica del acetato de polivinilo, los soportes a base de este material se han estudiado con la finalidad de sustituir injertos artificiales para cultivos celulares. El quitosano (CS) es un polímero natural que se obtiene a partir de la quitina, un polisacárido derivado del exoesqueleto de cangrejos, camarones y langostas (Raftery *et al.*, 2013).

El CS además de ser biocompatible, biodegradable y no tóxico; presenta propiedades antimicrobianas y tiene poca resistencia mecánica por lo que con frecuencia es mezclado con otros polímeros como el PVA con el fin de mejorar estas características (Pereira *et al.*, 2014).

En las afecciones renales la ingeniería de tejidos presenta una formidable tarea, debido a que un riñón maduro es una estructura muy compleja que contiene más de 60 tipos de células (Hammerman 2003; Rosines *et al.*, 2010) y a pesar de eso se ha demostrado que las células renales (epiteliales y endoteliales) pueden ser cultivadas exitosamente proliferando, formando y organizando las estructuras renales (Park *et al.*, 2000).

Los podocitos son células epiteliales especializadas, constan de un cuerpo celular grande (soma) en el espacio urinario y se conectan a la membrana basal glomerular (MBG) por medio de sus extensiones celulares (pedicelos). Las $\alpha_3\beta_1$ integrinas y los distroglicanos α y β desarrollan la función de mantener la integridad de la MBG y la del diafragma de filtración, una estructura altamente permeable al agua y solutos pequeños pero que limita el paso de proteínas de gran tamaño como la albumina (Jefferson *et al.*, 2011). Los avances clínicos han identificado al podocito como la célula predominante de daño en enfermedades glomerulares debido a alteraciones en la composición de los pedicelos (fusión y eliminación) y en el diafragma de filtración, resultando en proteinuria e interrupción del filtrado glomerular (Jefferson *et al.*, 2011, Gigante *et al.*, 2011).

Debido a que las enfermedades glomerulares están dentro de las 10 primeras causas de mortalidad en México es de gran importancia conocer los mecanismos fisiopatológicos que afectan principalmente a los podocitos.

Sin embargo existen diversos inconvenientes para establecer un modelo de estudio de estas células debido a que presentan un tiempo corto de vida cuando son extraídos para cultivo *in vitro* (10 días). Por lo que lograr mantener la viabilidad celular del podocito por más tiempo ayudara al entendimiento de enfermedades relacionadas con estas células.

El objetivo de este trabajo experimental de tesis fue sintetizar un soporte celular a base de CS y PVA en combinación con colágena tipo-IV y $\alpha_3\beta_1$ integrina con el fin de simular el microambiente de la MBG para establecer cultivos primarios de podocitos. Dando respuesta a las siguientes preguntas: 1) Analizar si el soporte celular mantiene la viabilidad de los podocitos por más tiempo. 2) Determinar la expresión de proteínas estructurales de los podocitos. 3) Cuantificar la citotoxicidad del soporte en el cultivo de podocitos.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades renales se han convertido en un problema de salud pública a nivel nacional, su incidencia y prevalencia van en aumento y los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan el daño renal aún no están bien establecidos. Estos mecanismos afectan principalmente a los podocitos que forman parte de la barrera de filtración glomerular, y el daño directo o indirecto ocasiona proteinuria una de las principales características clínicas de las afecciones renales; por lo que el estudio de los podocitos es de gran importancia para esclarecer las posibles causas involucradas en estas patologías. En la actualidad el estándar de oro para estudios *in vitro* es el uso de líneas celulares de podocitos inmortalizados, sin embargo la manipulación genética de estas células altera el ciclo celular y la expresión de proteínas específicas de los podocitos. No obstante, los cultivos primarios de podocitos se caracterizan por presentar un tiempo corto de vida, lo que motiva a establecer cultivos primarios de podocitos que incrementen la viabilidad y prolonguen el mantenimiento de las células *in vitro*. Por estos motivos, la generación de un soporte celular que simule el microambiente de la MBG contribuirá a prolongar el cultivo primario de podocitos para realizar estudios que permitan aumentar el conocimiento a nivel celular de los procesos fisiopatológicos y contribuir para el diseño de nuevas estrategias de tratamiento.

3. ANTECEDENTES

3.1 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es una rama de la biomedicina que ha crecido en los últimos 30 años, esta surge de la necesidad de recuperar y reparar tejidos u órganos dañados; esto se ha mejorado gracias a los avances en la tecnología médica la cual involucra el uso de estructuras de soporte a base de biomateriales que imitan el ambiente fisiológico, cultivos celulares y moléculas o grupos bioactivos (péptidos de adhesión celular y factores de crecimiento). Estas estructuras reproducen el ambiente fisiológico, promueven adherencia a las células, proliferación y diferenciación (Colorado *et al.*, 2010; Dvir *et al.*, 2011; Tamayo *et al.*, 2013).

Los biomateriales, son materiales destinados a hacer una interface con sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función en el cuerpo; estos juegan un papel muy importante en la creación del ambiente celular ya que deben ser capaces de proporcionar un soporte mecánico, degradarse gradualmente en componentes no tóxicos y presentar una estructura porosa para dar cavidad a la infiltración de células y promover la síntesis de matriz extracelular (ECM) (Deng *et al.*, 2011).

La ingeniería de tejidos utiliza dos tipos de estrategias, celular y acelular. La primera implica la siembra de células sobre el soporte que posteriormente es implantado en el tejido lesionado para estimular el crecimiento de nuevo tejido, mientras que el material de soporte es degradado gradualmente y sólo el tejido recién generado permanece funcional (figura 1).

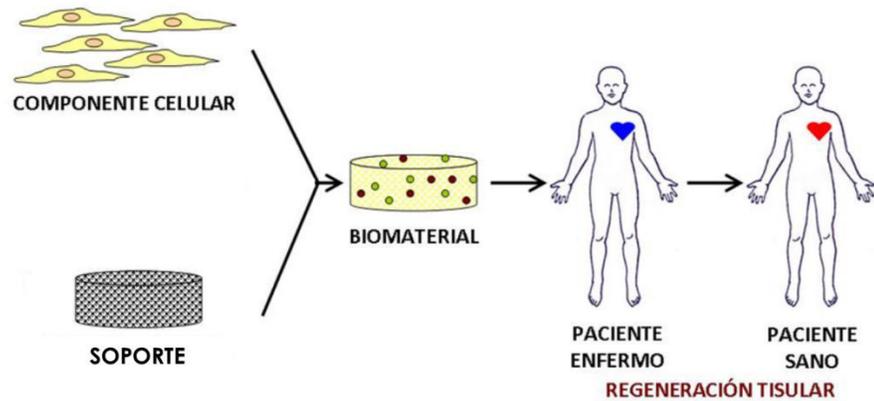


Figura 1. Estrategia celular (modificado de Colorado *et al.*, 2010)

En la segunda se busca el mismo resultado, con la diferencia de que al soporte se le incorporan moléculas de señalización como péptidos de adhesión celular y factores de crecimiento que ayudan, controlan y estimulan la infiltración de células sintetizando ECM (figura 2) (Colorado *et al.*, 2010).

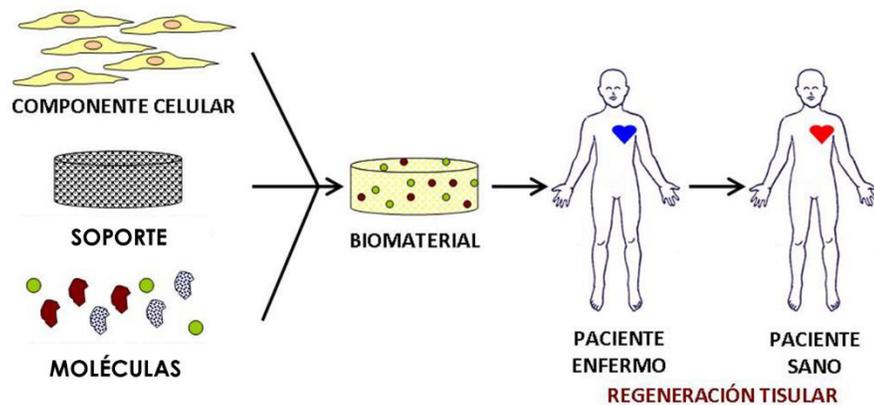


Figura 2. Estrategia acelular (modificado de Colorado *et al.*, 2010)

3.2 Uso de biomateriales en la ingeniería de tejidos

La Segunda Guerra Mundial marco el inicio de la era de los biomateriales, bajo una mínima regulación los médicos diseñaron materiales y dispositivos ante la necesidad de tratar diversas lesiones y proporcionar una mejor calidad de vida de los heridos en combate.

Estos procedimientos determinaron que muchos materiales quedaran descartados en ese momento y se investigara a fondo aquellos que habían dado buenos resultados (Grimaldo *et al.*, 2010).

Durante los años 1960 y 1970 tuvo lugar la primera generación de biomateriales, en este periodo la meta era obtener materiales cuyas propiedades físicas se adaptaran lo mejor posible a las del tejido a reemplazar y que reaccionaran mínimamente con el tejido circundante, es decir, materiales inertes. A partir del año 1980 surge una segunda generación, con el objetivo de crear materiales que provocaran una reacción controlada por parte del tejido vivo, es decir, materiales bioactivos y a la vez biodegradables.

En la actualidad nos encontramos en la tercera generación, donde se busca que los materiales interaccionen con el tejido de forma específica, mediante estímulos a nivel celular y molecular combinando las propiedades de bioabsorbibles y bioactivos (Blanco *et al.*, 2005). Estos biomateriales se pueden obtener a partir de polímeros naturales y polímeros sintéticos por medio de procesos físicos o químicos (Peluffo 2012; Ino *et al.*, 2013; Sumrita *et al.*, 2013).

En el sistema genitourinario se han utilizado biomateriales de origen natural como la colágena, el quitosano y el alginato; y de origen sintético el ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA) y alcohol polivinílico (PVA). Esta clase de biomateriales han sido probados con respecto a su biocompatibilidad con células musculares humanas y células uroteliales de la vejiga (Atala, 2004)

3.2.1 Alcohol polivinílico (PVA): Características y aplicaciones

El PVA es un polímero sintético (figura 3) obtenido por hidrólisis ácida o básica del acetato de polivinilo, a pesar de su origen sintético es un polímero biodegradable y biocompatible, debido a esto es muy utilizado en la preparación de biomateriales (Carhuapoma y Santiago 2005).

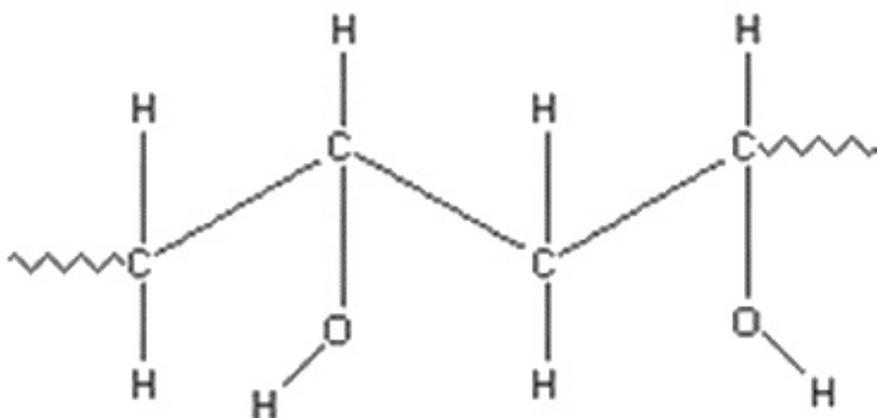


Figura 3. Estructura química del alcohol polivinílico

Los soportes a base de PVA han sido ampliamente estudiados con la finalidad de sustituir injertos artificiales utilizados para cultivos de células, aunque su naturaleza hidrofílica dificulta la adhesión y propagación celular al mezclarlo con biomateriales tales como fibronectina, quitosano y heparina aumenta su humectabilidad y por consiguiente la adhesión y proliferación celular (Karimi *et al.*, 2014; Londoño *et al.*, 2012).

3.2.2 Quitosano: Características y aplicaciones

La quitina es un polisacárido nitrogenado compuesto de β -(1,4)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucosa, derivado del exoesqueleto de animales marinos como cangrejos, camarones y langostas. La N-acetilación de la quitina lleva a su derivado principal el quitosano (CS) (Raftery *et al.*, 2013).

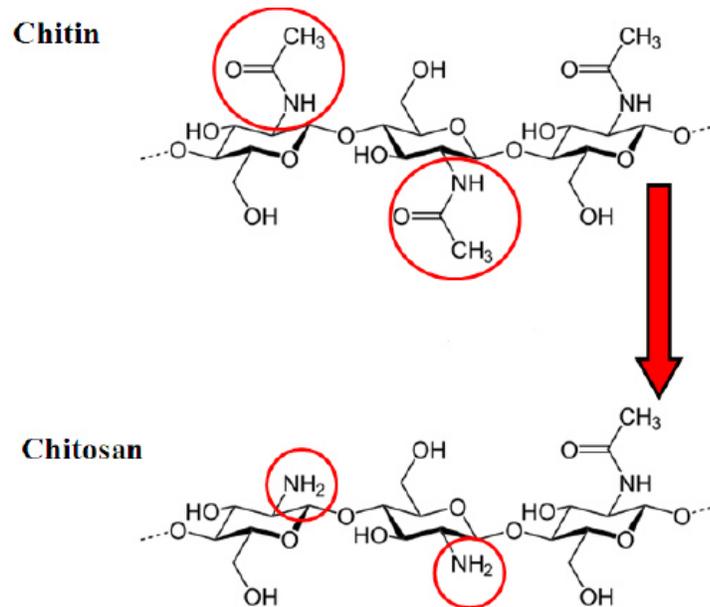


Figura 4. Estructura molecular de quitina y quitosano (Raftery *et al.*, 2013).

El CS es un polisacárido natural y se compone de dos subunidades, una D-glucosamina y una N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces glucosídicos (1-4). Cada grupo desacetilado posee tres grupos funcionales reactivos, un grupo amino primario y grupos hidroxilos secundarios. Es un material biocompatible y biodegradable, ya que las quitinasas, quitosanasas y lisozimas lo degradan en oligómeros y monómeros, y finalmente en una azúcar común la N-acetil-glucosamina que entra al ciclo de las glicoproteínas para ser excretada en forma de dióxido de carbono. Se ha demostrado que interactúa con las células vivas sin ser citotóxico y que mantiene su funcionalidad *in vitro* o *in vivo* (Raftery *et al.*, 2013).

3.2.3 Soportes a base de CS

El carácter filmogénico dio lugar a una de las primeras aplicaciones investigadas de este polímero, ya que es posible formar películas de CS con buenas propiedades físicas y mecánicas a partir de disoluciones en medio ácido.

Las propiedades filmogénicas del CS se deben a la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los grupos amino e hidroxilo de sus cadenas. A pH ácido estos enlaces de hidrógeno se disocian debido a la protonación de los grupos amino y se produce un rápido hinchamiento del soporte (Expósito, 2009).

Muzzarelli planteó por primera vez en 1974 la metodología para obtener soportes de CS, mediante la evaporación del ácido empleado en la solución de quitosano, comúnmente conocida como método evaporación de solvente (Expósito, 2009); también se ha empleado la técnica de radiación gamma, esta tiene algunas desventajas debido a que se utilizan altas dosis de radiación y dificulta la remoción de oxígeno que promueve sitios de reacción.

El CS con frecuencia es mezclado con otros polímeros como el PVA con el objetivo de mejorar las propiedades mecánicas, por lo tanto los soportes resultantes de la mezcla de CS y PVA tienden a ser mejores cuando se compara con soportes sólo de CS o PVA (Pereira *et al.*, 2014).

Para incrementar las propiedades biológicas de los soportes de CS-PVA se han introducido diferentes grupos bioactivos como factores de crecimiento, péptidos de adhesión celular, extractos de plantas y partículas metálicas orgánicas (León *et al.*, 2007).

3.3 Hinchamiento de soportes

La hidrofiliidad en los polímeros está dada por el grado de hinchamiento, el cual se determina a partir de la relación entre el volumen del soporte hinchado y el volumen del soporte seco. Durante el proceso de hinchamiento se produce la incorporación de líquidos en el interior de la matriz, producto de la diferencia de potencial químico del disolvente dentro y fuera de ella, provocando una dilatación de la misma. Al proceso de dilatación se opone una fuerza elástica-retráctil, la cual se opone a la penetración del solvente. El equilibrio de hinchamiento se alcanza cuando se igualan la fuerza de hinchamiento y la fuerza elástica-retráctil.

La estructura de la red polimérica es un parámetro determinante cuando se describe el transporte a través de los soportes, ya que la magnitud del espacio entre las cadenas poliméricas va a determinar cómo se produce dicho transporte (Expósito, 2009).

3.4 Degradación de soportes

Por degradación de un material se entiende todo tipo de transformaciones que afectan a su composición original y repercuten en sus propiedades y prestaciones iniciales. Cuando se trata de materiales constituidos por polímeros estas transformaciones pueden ser de tipo físico, tal es el caso de la pérdida de algún aditivo, o bien de tipo químico en donde el polímero experimenta cambios en su composición química y estos, a su vez, provocan variaciones en sus propiedades físicas iniciales (resistencia, solubilidad, etc.) (San Andrés *et al.*, 2010).

3.5 Espectroscopia de Infrarrojo

El uso de la espectroscopia de infrarrojo en el estudio de los biomateriales permite conocer los principales grupos funcionales de la estructura molecular del compuesto. Esta información se obtiene a partir del espectro de absorción de dicho compuesto al ser sometido a la acción de la radiación infrarroja.

La interacción de la radiación infrarroja con la materia provoca en ésta alguna alteración, esta alteración guarda relación con cambios en el estado vibracional de las moléculas. El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de ésta molécula. Así, entre otras aplicaciones, el espectro IR se puede usar como “huella dactilar” en la identificación de muestras (Serrano, 2004). El grado de orientación de las moléculas en los polímeros tiene una importancia significativa en sus propiedades mecánicas, por lo que la espectroscopia infrarroja ha probado ser una técnica muy poderosa en la determinación de

este grado de orientación en polímeros, resultando ser particularmente sensible en el estudio de la conformación.

Las medidas de intensidad de las absorciones con radiación polarizada paralela o perpendicular a la dirección de orientación de la muestra, permiten determinar los momentos de transición de los diferentes grupos cromóforos y obtener información sobre la conformación del polímero (López, 2003).

3.6 Aplicaciones de la ingeniería de tejidos en el riñón

En el caso de un tejido epitelial como lo es el riñón la ingeniería de tejidos tiene una formidable tarea, debido a que un riñón maduro es una estructura muy compleja que contiene más de 60 tipos de células y posee una arquitectura tridimensional que incluye glomérulo, túbulo distal y proximal; así como una compleja microvasculatura primordial para múltiples funciones (Hammerman 2003; Rosines *et al.*, 2010).

En los últimos años estructuras como el glomérulo han sido cultivados sobre soportes poliméricos y reconstituidos *in vitro*, y se ha demostrado que las células renales tanto epiteliales como endoteliales pueden ser cultivadas exitosamente proliferando, formando y organizando las estructuras renales (Park *et al.*, 2000).

Song y colaboradores en 2013 realizaron el primer trasplante ortotópico experimental de riñón en ratas usando la bioingeniería, repoblando riñones acelulares de ratas con células epiteliales y endoteliales a través de la arteria renal y el uréter respectivamente. Reportaron que las células epiteliales adquirirían una organización semejante a una estructura tubular y que expresaban acuaporina, semejante al epitelio nativo del túbulo contorneado proximal. La microscopia electrónica de barrido de estos riñones regenerados mostró capilares glomerulares con podocitos injertados, así como la formación de pedicelos.

Sin embargo, ellos sugieren que antes de implementar esta tecnología se requiere la optimización de protocolos para el aislamiento, diferenciación y proliferación de los tipos de células requeridas (Zambon *et al.*; 2014).

3.7 Estructura y función del riñón

El riñón es un órgano importante con un conjunto de roles fisiológicos esenciales para la vida, está compuesto de unidades funcionales llamadas nefronas que se encargan de filtrar la sangre y drenar la orina (Miceli *et al.*, 2014). Cada nefrona consiste de un glomérulo y un túbulo renal, el glomérulo es responsable de filtrar agua y pequeñas moléculas de la circulación sanguínea generando un remarcable filtrado de 180 litros al día, mientras que el túbulo regula la reabsorción y secreción de solutos dictando la composición final de la orina (figura 5) (Kumar *et al.*, 2014; Lennon *et al.*, 2014).

En el humano existen aproximadamente un millón de glomérulos en cada riñón, cada glomérulo está compuesto de asas de vasos sanguíneos sostenidos por el mesangio y encerrado en una estructura en forma de bolsa, una extensión del túbulo renal de la nefrona conocida como capsula de Bowman.

Los glomérulos se componen de cuatro tipos de células: células mesangiales, células endoteliales glomerulares, células epiteliales viscerales (podocitos) y células epiteliales parietales de revestimiento de la membrana basal de la capsula de Bowman. Los avances clínicos han identificado al podocito como la célula predominante de daño en enfermedades glomerulares caracterizadas por proteinuria (Jefferson *et al.*, 2011).

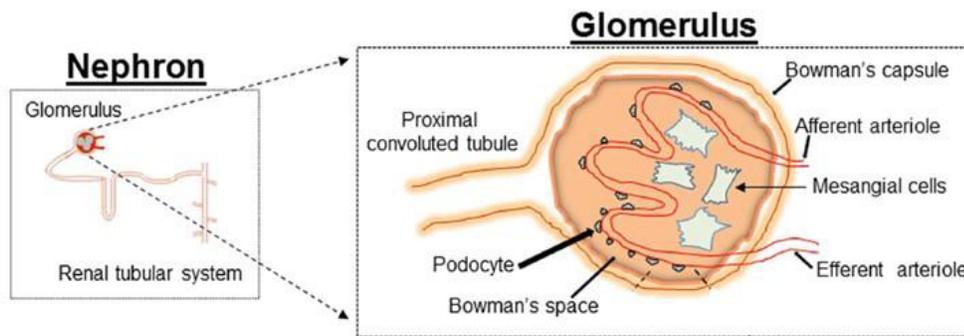


Figura 5. Composición del glomérulo (Kumar *et al.*, 2014)

3.8 Estructura y función de los podocitos

Los podocitos son células epiteliales altamente diferenciadas sentadas en el exterior del asa capilar glomerular, consta de un cuerpo celular (soma) en el espacio urinario y se conecta a la membrana basal glomerular (MBG) por medio de sus extensiones celulares (pedicelos) así como a podocitos adyacentes. Los pedicelos están anclados a MBG por las $\alpha_3\beta_1$ integrinas y los distroglicanos α y β . Entre los pedicelos y la hendidura de filtración existe una ranura de 40 nm de ancho que es altamente permeable al agua y solutos pequeños; el tamaño del diafragma de filtración oscila entre los 5-15 nm y limita el paso de proteínas, incluyendo la albumina (figura 6).

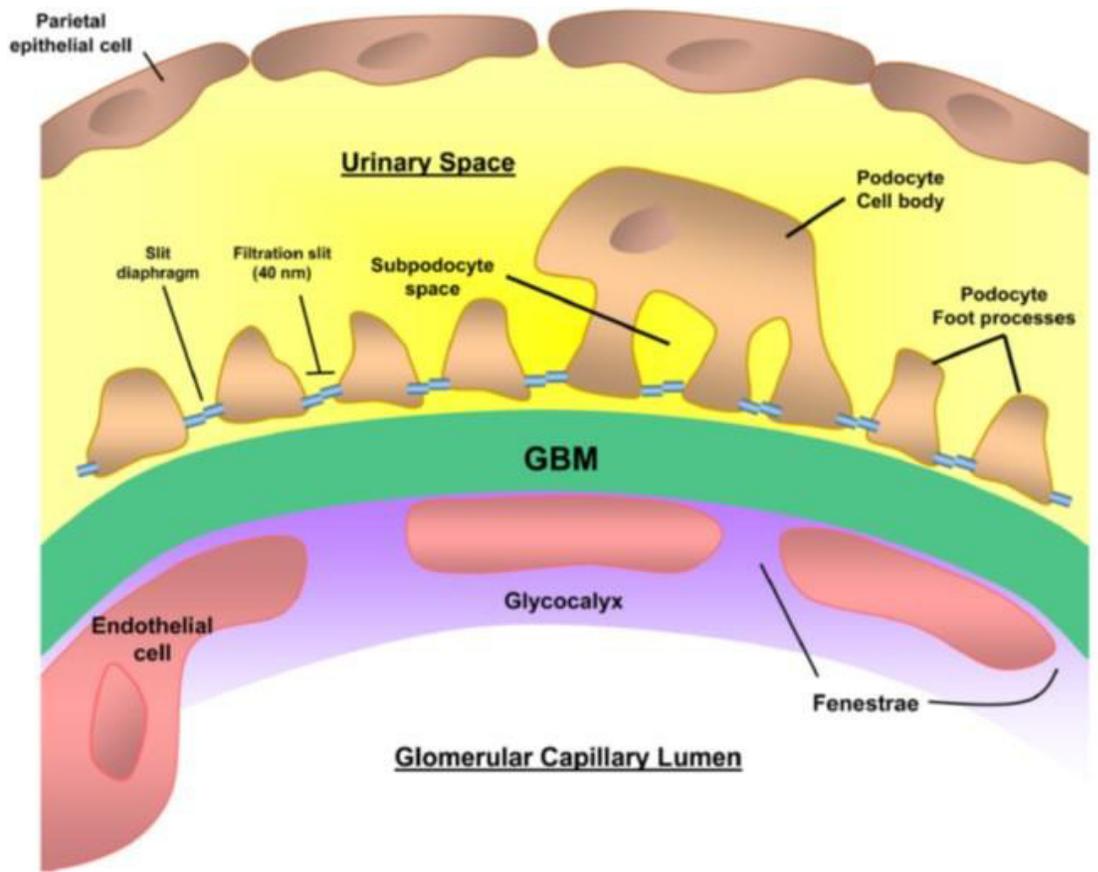


Figura 6. Componentes de la barrera de filtración glomerular

En un riñón humano adulto existen aproximadamente de 500 a 600 podocitos por ovillo glomerular, tienen una capacidad muy limitada de proliferar y poseen un extenso citoesqueleto de actina. Las principales funciones de los podocitos son mantener la integridad de la MBG, producir factores de crecimiento como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que atraviesa la MBG en contra de su gradiente de filtración para actuar sobre receptores VEGF en células endoteliales glomerulares y mantener el endotelio fenestrado, así como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que es indispensable para el desarrollo y migración de células endoteliales.

También pueden ser componentes del sistema inmune innato desempeñando un papel de vigilancia contra patógenos o proteínas anormales en el espacio de la capsula de Bowman (Jefferson *et al.*, 2011).

3.8.1 Dominios de superficie del podocito

La superficie del podocito se divide en tres partes: dominio apical, dominio del diafragma de filtración y dominio de anclaje (Kumar *et al.*, 2014; Neal C. 2015).

3.8.1.1 Dominio apical

La superficie de los podocitos está cubierta en su mayoría por carga eléctrica negativa, siendo la podocalixina la mayor sialoproteína con estas características. Esta es una proteína de membrana polianiónica importante en el establecimiento de la carga negativa glomerular en el mantenimiento de la arquitectura celular y de la distancia intercelular. La podocalixina está unida al cofactor regulador 2 de la proteína activadora de la tirosina quinasa de intercambio de Na⁺/H⁺ (NHERF-2) y a la ezrina una proteína intracelular miembro de la familia ERM. Esto sugiere que la podocalixina puede estar asociada con la extensa red de filamentos de actina y de esta forma participa en el mantenimiento de la estructura del podocito y del espacio intercelular. Si las interacciones podocalixina/NHERF2/ezrina/actina se modifican aparecen cambios en los pedicelos y esto se asocia a patología glomerular (figura 7) (Diéguez S. 2003; Neal C. 2015).

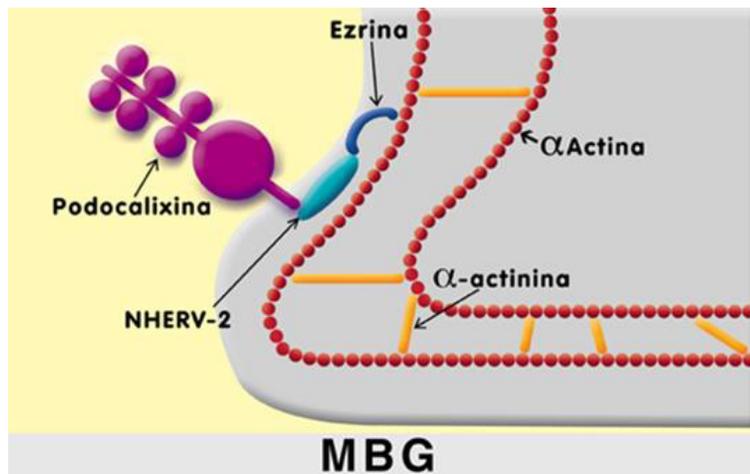


Figura 7. Dominio apical de los podocitos

3.8.1.2 Dominio del diafragma de filtración

El diafragma de filtración (DF) son uniones célula-célula especializadas ubicadas entre los podocitos maduros, estos complejos de unión migran hasta la base de la célula dando como resultado los pedicelos. El DF (figura 8) es una estructura rígida con un diámetro relativamente constante que oscila entre los 20 y 50 nm y está compuesta por múltiples complejos de proteínas (Fukasawa *et al.*, 2007).

La nefrina fue la primera molécula encontrada en el DF, es una proteína transmembranal codificada por el gen NPHS1 que pertenece a las moléculas de adhesión de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). Está compuesta por 1,241 aminoácidos, su región amino terminal extracelular tiene ocho secuencias Ig repetitivas, una región de intervalo y una similar a la fibronectina tipo-III. La nefrina tiene tres moléculas libres de cisteína (Cys) que participan en la formación de puentes disulfuro que potencializan la integridad del DF.

Interactúa principalmente con la P-cadherina la cual tiene un dominio extracelular que forma el andamio del diafragma de filtración, el dominio intracelular está conectado con la β -catenina y γ -catenina estas interactúan con la cadherina intracitoplásmica que las une al citoesqueleto de actina y traducen señales intercelulares. A través de ellas la nefrina regula el tamaño del poro y la selectividad del diafragma (Zhang y Huang 2012).

La podocina es una proteína integral de membrana codificada por el gen NPHS2, es miembro de la familia de las proteínas de la estomatina asociada a lípidos y consta de 383 aminoácidos con un peso molecular de 42 kDa. Interactúa con la nefrina y con la proteína CD2AP (proteína asociada al CD2) a través de su C-terminal y tiene un papel importante en mantener la estructura y función del SD como proteína de soporte (Zhang y Huang 2012).

La proteína CD2AP es una proteína transmembranal que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, está compuesta de 639 aminoácidos y tiene un peso molecular de 80 kDa.

Se localiza en la pared lateral del podocito anclada a las balsas lipídicas del espacio subpodocitario, interactúa con nefrina y podocina a través de su C-terminal con el fin de preservar el citoesqueleto y las funciones del SD (Zhang y Huang 2012).

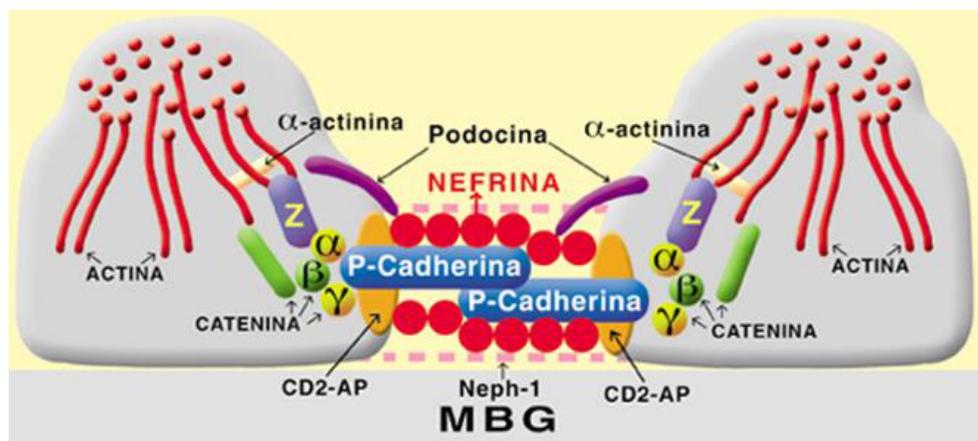


Figura 8. Dominio del diafragma de filtración

3.8.1.3 Dominio de anclaje

Está formado por una red gruesa de actina y posee proteínas de adhesión que une a los podocitos a la matriz extracelular, estas proteínas son: $\alpha_3\beta_1$ integrina, distroglicano y megalina (Neal C. 2015).

Las integrinas son receptores de adhesión compuestos por dos subunidades, una cadena alfa y una cadena beta que unen la matriz extracelular al citoesqueleto de actina por proteínas intracelulares como la paxilina, talina y vinculina. La $\alpha_3\beta_1$ integrina es esencial para el desarrollo y función del podocito y su montaje a la MBG.

Deleciones de α_3 causan anomalías en el riñón, específicamente disminuyendo las ramificaciones de los capilares glomerulares, alterando la organización de la MBG y la formación de los pedicelos; causando proteinuria masiva. Por otro lado las deleciones de β_1 causan proteinuria al nacer, la cual está asociada con la pérdida de podocitos, degeneración capilar y mesangial que culmina en insuficiencia renal (Veron *et al.*, 2012).

El distroglicano posee dos subunidades (α y β), la subunidad α contiene un sitio rico en ácido siálico que se une con regiones catiónicas de la membrana extracelular como laminina y agrina, la subunidad β se une a las proteínas específicas ligadoras de actina, como la utrofina.

La megalina es un receptor endocítico transmembranal que enlaza actina, sinaptopodina y al complejo de integrinas (figura 9) (Diéguez S. 2003). Pertenece a la familia de receptores LDL y sus ligando incluyen apoE rico en β -VLDL, lipoproteína, lactoferrina, oproteín lipasa, aprotinina, plasminógeno y otros. En condiciones normales la megalina unida a los podocitos puede unirse a proteínas filtradas de la MBG y degradarlas a través de endocitosis (Zhang y Huang 2012).

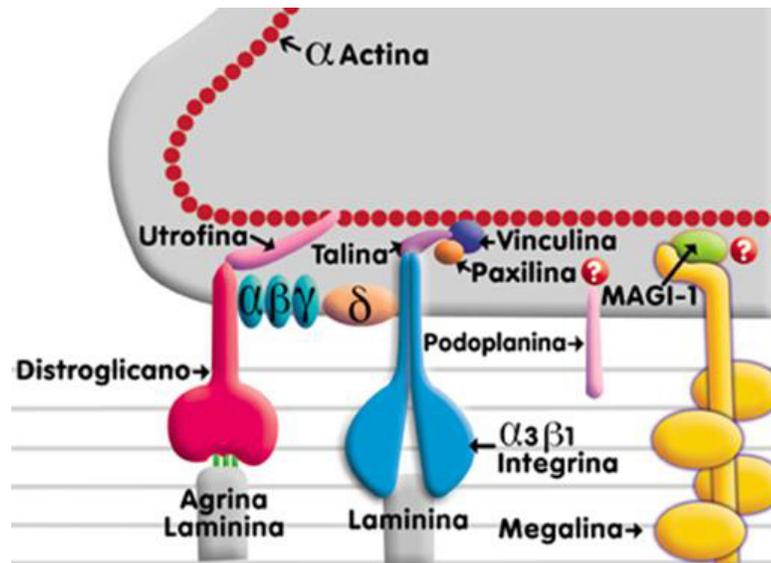


Figura 9. Dominio de anclaje

3.9 Barrera de filtración glomerular

La barrera de filtración glomerular es responsable del filtrado renal a través de la pared capilar glomerular dentro del espacio urinario (cápsula de Bowman) que restringe el paso de moléculas de diversos tamaños, formas y cargas. Es poco permeable a lípidos insolubles o aniónicos y altamente permeable al agua, en condiciones normales pequeñas cantidades de proteínas (~4g/día) son eliminadas en la orina debido a que la mayoría son reabsorbidas en el túbulo proximal (Jefferson *et al.*, 2011).

Se conforma por 3 capas (figura 10):

- **Capa cercana al lumen: endotelio fenestrado.** Está compuesta por células endoteliales fenestradas que facilitan la permeabilidad del agua, estas células cubiertas por glucocalix limita el paso de albumina y moléculas de gran tamaño.
- **Capa intermedia: membrana basal glomerular.** Su componente principal es la colágena tipo IV, durante el desarrollo fetal las células endoteliales glomerulares secretan una red de colágena $\alpha_1\alpha_2\alpha_1$ que es

reemplazada por una red más robusta de colágena $\alpha_3\alpha_4\alpha_5$ secretada por el podocito. Otros componentes importantes son fibronectina, laminina-1, nidogen/enactina y proteoglicanos de heparansulfato.

La laminina sirve como ligando de anclaje para los podocitos y las integrinas endoteliales, mientras que los proteoglicanos de heparansulfato confieren una carga aniónica total.

- **Capa más cercana al espacio urinario: podocitos.** Los podocitos sufren de múltiples lesiones, ya sean heredadas o adquiridas, estas lesiones afectan principalmente a las proteínas que comprenden el diafragma de filtración (Jefferson *et al.*, 2011).

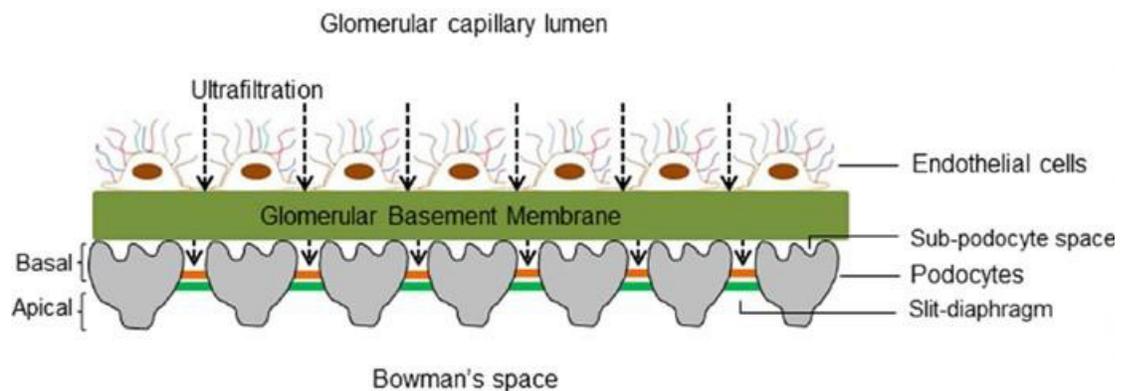


Figura 10. Barrera de filtración glomerular (Kumar *et al.*, 2014)

Debido a que la barrera de filtración glomerular es una estructura sujeta a modificaciones la lesión en cualquiera de sus tres capas puede desencadenar proteinuria, la cual en un rango nefrótico se debe a lesiones en los podocitos (Harper *et al.*, 2010).

3.10 Papel de los podocitos en enfermedades glomerulares

Los podocitos representan un papel clave en las enfermedades glomerulares ya que la mayoría de estas se caracterizan por alteraciones en la composición de los pedicelos (fusión y eliminación) y el diafragma de filtración. Las principales causas que conducen a la eliminación de los

pedicelos son: anomalías en la MBG o en las interacciones podocito-MBG, mala formación del diafragma de filtración y alteraciones en el citoesqueleto de actina y proteínas asociadas; también mutaciones en diferentes proteínas de los podocitos pueden ser blancos de distintos mecanismos patológicos alterando la estructura del diafragma de filtración, afectando directa o indirectamente el citoesqueleto al romper interacciones célula-matriz o mediante el bloqueo de importantes vías de señalización. Todos estos mecanismos resultan en una vía final común caracterizada por la eliminación de los pedicelos, proteinuria e interrupción del filtrado glomerular. De ahí surge la importancia del estudio de estas células (Gigante *et al.*, 2011).

3.11 Importancia del estudio de los podocitos

Los podocitos son células únicas que a pesar de tener muchas características típicas de las células epiteliales su organización, ubicación y función son singulares. La unión de los pedicelos a la MBG hace que el aislamiento directo sea difícil, por lo que los estudios *in vitro* dependen en gran medida de la optimización de los sistemas de aislamiento. Los primeros trabajos de cultivo celular se basaron en aislados de podocitos primarios pero una de sus principales limitaciones fue la baja viabilidad, por lo que Mundel y Saleem realizaron un avance importante al crear podocitos inmortalizados de humano y ratón mediante la expresión del antígeno T grande del virus SV40 (Simian Vacuolating Virus TAg) sensible a la temperatura. Sin embargo estas células presentan alteraciones en el ciclo celular y diferencias dramáticas en el fenotipo al no expresar proteínas características de los podocitos (Da Sacco *et al.*, 2013). Tal como lo reportaron Java y colaboradores en 2015 donde al determinar la relación de la pérdida de la expresión del receptor 1 del Complemento (CR1) con daño renal, este no fue detectado en líneas celulares inmortalizadas de podocitos en contraste con líneas celulares epiteliales de riñón humano.

Por lo que esto sugiere la necesidad de desarrollar nuevos sistemas de cultivo *in vitro* de podocitos primarios con la finalidad de esclarecer los mecanismos fisiopatológicos por los cuales se ven afectados.

3.12 Síndrome Nefrótico (SN)

El SN es una entidad clínica que se caracteriza por pérdida masiva de proteína en orina (1-3.5 g en orina de 24 horas) y por un aumento de la permeabilidad de la pared capilar glomerular, y su diagnóstico se basa de acuerdo a los criterios del International Study of Kidney Disease in Children (ISKDC) (Ríos and Patiño 2011). Ver tabla 1

Tabla 1. Criterios de clasificación del ISKDC

Criterios	Valores
Edema	Retención de líquidos en el espacio intersticial $\geq 10\%$ del peso corporal
Proteinuria masiva en orina	3-4 + en tiras reactivas $\geq 40\text{mg}$ en orina de 24 hrs Relación proteínas/creatinina en una muestra de orina: $>200 \text{ mg/mmol}$
Hipoalbuminemia sérica	$\leq 2.5 \text{ g/dl}$
Hiperlipidemia sérica	Colesterol: $>200 \text{ mg/dl}$ Triglicéridos: $>200 \text{ mg/dl}$

La proteinuria es una característica de la disfunción glomerular del riñón y es un factor de riesgo para las enfermedades renales, afectando 100 millones de personas a nivel mundial (Wei *et al.*, 2008; Jinchao *et al.*, 2013). La proteinuria nefrótica (valores $\geq 0.5 \text{ g}/24 \text{ horas}$ en adultos o $40 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{h}$ en niños) se asocia con hipoalbuminemia, hipercolesterolemia, edemas e hipercoagulabilidad (Arrizabalaga 2005; Segarra *et al.*, 2012).

La incidencia anual en México de SN en niños se estima de 2-7/100,000 habitantes, en tanto que la prevalencia es de 16 casos/100,000 predominando el género masculino en proporción 1.5:1.4 (Academia Mexicana de Pediatría 2000; Gipson *et al.*, 2009).

5.13 Clasificación del SN

De acuerdo al ISKDC el SN se clasifica en: Síndrome Nefrótico Congénito, Síndrome Nefrótico Secundario o enfermedad sistémica y Síndrome Nefrótico Primario o Idiopático (SN-I).

El Síndrome Nefrótico Congénito de tipo Finlandés es una enfermedad autosómica recesiva que se caracteriza por presentar mutaciones en el gen NPHS1 que codifica la Nefrina, dando como resultado una enfermedad progresiva que conduce a proteinuria masiva y muerte durante los dos primeros años de vida (Kandasamy *et al.*, 2014). El secundario es consecuencia de una glomerulopatía primaria o manifestación de una variedad de trastornos sistémicos como son: Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Diabetes Mellitus, infecciones, tumores, drogas y toxinas (Davin y Rutjes, 2011; Azocar, 2011; Segarra *et al.*, 2012). Mientras que el SN-I es comúnmente diagnosticado en infantes y se produce por un incremento en la permeabilidad selectiva de la barrera de filtración glomerular, este incremento conduce a una incapacidad para restringir la pérdida de proteínas (Hussain *et al.*, 2013; Lorenzen y Thum, 2013).

El SN-I puede estar asociado con al menos 3 anormalidades histológicas diferentes: cambios mínimos (MCD), glomeruloesclerosis focal segmentaria (FSGS) y nefropatía membranosa (Lorenzen y Thum 2013).

5.14 Fisiopatología del Síndrome Nefrótico Idiopático (SN-I)

La fisiopatología del SN-I aún permanece de forma incompleta a pesar de la fuerte evidencia que existe de la desregulación del sistema inmune, que implica principalmente la inmunidad mediada por células. Esta hipótesis se apoya en la manifestación de recaídas después de infecciones virales o episodios atópicos, a la asociación de antígenos HLA y a la respuesta terapéutica a esteroides (Uwaezuoke, 2015).

Algunos estudios sugieren un importante rol del sistema inmune en el desencadenamiento y mantenimiento del SN-I, tales como una respuesta anormal de los linfocitos T y el aumento de la liberación local de citocinas (Pereira *et al.*, 2015). La presentación de antígenos a los linfocitos T conduce a una respuesta inmune polarizada llamada de tipo 1 (dominada por interleucina 2) y tipo 2 (dominada por interleucina 4, 10 y 13). La tipo 1 predomina en inmunidad mediada por células y la tipo 2 en el cambio de clase de células B para la producción de IgG₄ e IgE (Uwaezuoke, 2015). Otra hipótesis involucra el rol de factores sistémicos circulantes como son los factores de la permeabilidad vascular, que incluyen factor de crecimiento endotelial, heparanasa y hemopexina. Sin embargo evidencias recientes sugieren que el defecto primario en SN-I podría ser a nivel de los podocitos, debido a que agentes inmunosupresores como los glucocorticoides afectan directamente la función y estructura de ellos (figura 11) (Segarra *et al.*, 2012, Uwaezuoke, 2015). No obstante se ha demostrado en estudios *in vitro* que los podocitos expresan receptores para interleucina 4 y 13, y se ha descrito que la estimulación de IL-13 induce cambios funcionales consistentes en la disminución de la resistencia eléctrica transepitelial y una fosforilación de STAT6 (Segarra *et al.*, 2012, Uwaezuoke, 2015).

Existen estudios que indican que las células podocitarias en determinadas circunstancias pueden adquirir fenotipo y función de células dendríticas y pueden ser inducidas a expresar CD80 (B7.1). CD80 es una proteína transmembranal expresada en células con capacidad presentadora de antígenos que tras unirse a su ligando (CD28) presente en linfocitos T proporciona una señal de coestimulación imprescindible para la activación linfocitaria. Los podocitos normales no expresan CD80 y la expresión de este se asocia a aparición de proteinuria nefrótica. Se ignora cuál es el significado funcional de la neoexpresión de CD80 por parte del podocito y no se ha podido demostrar su posible relación con las alteraciones del diafragma de filtración.

La expresión de CD80 puede ser inducida por estrés oxidativo o tras estimulación con lipopolisacaridos (LPS), a través de señalización mediada por receptores Toll-like-3 e interleucina 13, y no es dependiente de linfocitos. Se ha generado una amplia evidencia experimental que relaciona IL-13 con la inducción de alteraciones estructurales en el podocito, capaces de alterar la selectividad de filtración y de causar SN. Recientemente, se ha demostrado que la expresión del gen IL-13 está aumentada tanto en linfocitos CD4 como en CD8 en niños con SN corticosensible durante las recaídas (Segarra *et al.*, 2012). Tanto los estudios de expresión génica como la inmunofluorescencia demostraron una reducción en la expresión de nefrina, podocina y distroglicanos, y un incremento en la expresión podocitaria de CD80. La evidencia de que IL-13 puede inducir expresión de CD80 en podocitos y que ésta se asocia a la aparición de SN establece un vínculo de gran interés, ya que abre la posibilidad de considerar que la proteinuria podría ser causada por efectos directos de IL-13 en la estructura del podocito, y a la vez, genera la hipótesis sobre la posible utilidad clínica del estudio de la vía IL-13-CD80 en relación con el curso clínico, respuesta al tratamiento y pronóstico (Segarra *et al.*, 2012).

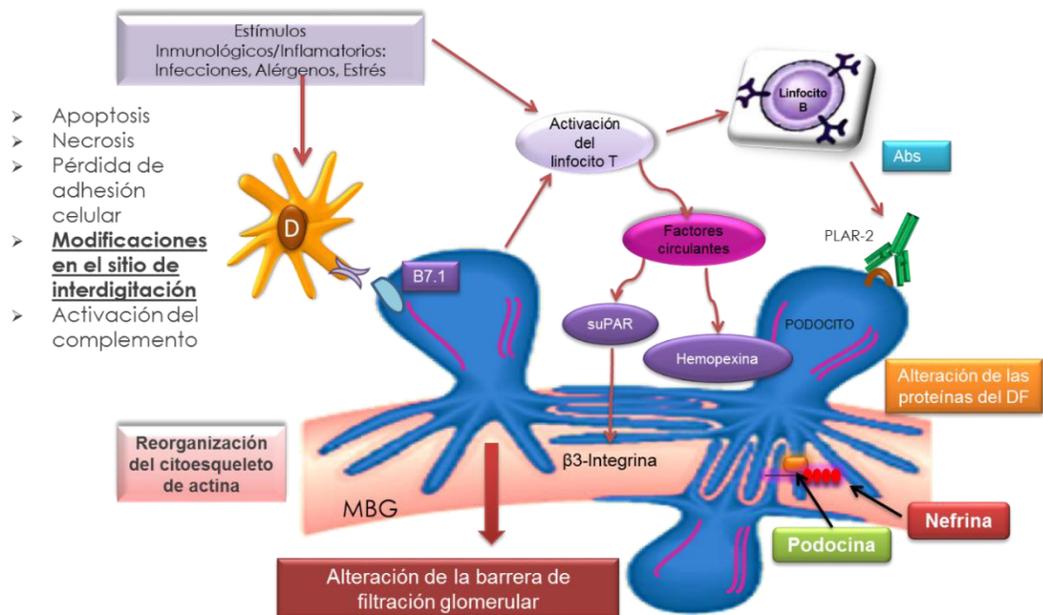


Figura 11. Mecanismos fisiopatológicos del SN-I (modelo modificado de Audard *et al.*, 2008; Sagarra *et al.*, 2011)

4. HIPÓTESIS

El soporte celular a base de CS y PVA en combinación con colágena tipo IV y $\alpha_3\beta_1$ integrina incrementa la viabilidad y mantiene la expresión de proteínas de podocitos en cultivo primario.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un soporte celular base de CS y PVA en combinación con colágena tipo IV y $\alpha_3\beta_1$ integrina que incremente la viabilidad y mantenga la expresión de proteínas en cultivos primarios de podocitos.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar soportes mediante química aditiva que promueva la interacción y estabilidad química entre el CS, PVA, colágena tipo IV y $\alpha_3\beta_1$ integrina.
2. Determinar porcentaje de hinchamiento y degradación de los soportes celulares obtenidos.
3. Evaluar las interacciones físico-químicas formadas entre los elementos de los soportes celulares por espectroscopia de infrarrojo (IR).
4. Obtener podocitos por selección positiva a partir de tejido renal de ratón y de sedimento urinario (SU) de sujetos sanos y pacientes de Síndrome Nefrótico Idiopático (SN-I).
5. Determinar la expresión de proteínas estructurales de los podocitos por inmunofluorescencia indirecta (IFI).
6. Cuantificar la citotoxicidad del soporte celular mediante la liberación de la enzima L-lactato deshidrogenasa (LDH) en los cultivos de podocitos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención de soporte celular

Los soportes se obtuvieron mediante química aditiva por la técnica de evaporación de solvente a partir de una solución de CS al 2% (p/v) en medio ácido y una solución de PVA al 1% (p/v) en medio acuoso, se añadió la colágena tipo IV en un 7% (p/v) y la $\alpha_3\beta_1$ integrina 0.03% (p/v) respecto al polímero. Se vertió una cantidad determinada de la solución en caja Petri y se dejó secar a 30°C durante 48 horas quedando como resultado 5 soportes los cuales fueron evaluados.

6.2 Ensayo de hinchamiento y degradación

Para determinar el porcentaje de hinchamiento y degradación los soportes se cortaron en fragmentos de 2 cm² y se pesaron en caja Petri para determinar su peso exacto, se añadieron 10 mL de medio RPMI 1640 a un pH 7.8, atemperado a 37°C y se incubó a intervalos de 3, 7, 15 y 30 minutos para el porcentaje de hinchamiento y a intervalos de 3, 7, 15 y 30 días para el porcentaje de degradación. Posteriormente la extracción de los soportes se realizó de forma rápida y cuidadosa, se secaron ligeramente con un papel filtro para eliminar el exceso de líquido, se pesaron y se volvió a introducir en la placa. El porcentaje de hinchamiento y degradación (W) se determinó mediante la siguiente expresión:

$$W = \frac{M - M_0}{M_0} \times 100 (\%)$$

Donde M es el peso a tiempo t y M₀ el peso a tiempo cero.

6.3 Evaluación de interacciones físico-químicas por espectroscopia de infrarrojo (FTIR)

Para determinar las interacciones físico-químicas se obtuvieron los espectros de infrarrojo de los 5 soportes celulares empleando un espectrofotómetro mediante las técnicas de reflectancia total atenuada (ATR) y transmisión, en un intervalo de 4,000 a 450 cm^{-1} y de 100 a 50 respectivamente, con una resolución de 4 cm^{-1} y 16 barridos.

Esta técnica permitió determinar los modos de vibración de los grupos químicos y su modificación por interacciones químicas y/o electrostáticas del CS, PVA, colágena tipo IV y $\alpha_3\beta_1$ integrina.

6.4 Material biológico

Se estudiaron 12 muestras de sedimento urinario de pacientes de SN-I de los cuales el 58.33% (7) pertenecían al sexo masculino y el 41.66% (5) al femenino. Con un promedio de edad de 4.8 años y un rango entre los 2 y 8 años, con una evolución promedio de la enfermedad de 2.73 años y un rango de 1 a 5 años. Un grupo de 10 muestras de sujetos sanos (SS) de los cuales el 100% pertenecía al sexo masculino, con un promedio de edad de 7.8 años y un rango entre los 3 y 11 años (Tabla 2).

Tabla 2. Material biológico

GRUPOS DE ESTUDIO										
Grupos	Género	Edad (años)	pH	PTU EGO (mg/dl)	PTU (mg/m ² /h)	Colesterol Total (CT) (mg/dl)	Triglicéridos (TG) (mg/dl)	Albumina sérica (AlbS) (mg/dl)	Creatinina sérica (CrS) (mg/dl)	Tasa de Filtración Glomerular (TFG) (ml/min)
SNI	M=58.33% F=41.66%	4.8	5.75	208.75	9.43	227.83	165.58	3.2	0.327	232.5
SS	M=62.5% F=37.5%	7.8	5.4	12.18	-----	-----	-----	-----	-----	-----

---- Valor no determinado, M = Masculino, F = Femenino, PTU = Proteinuria, EGO = Examen general de orina.

6.5 Cultivo celular

6.5.1 Cultivo primario de podocitos a partir de tejido renal murino por selección positiva

Se utilizaron ratones de la cepa Balb/c de 6 semanas de edad los cuales fueron sacrificados por decapitación y después de extraer los riñones estos se lavaron con PBS 1X estéril para eliminar residuos de tejido adiposo, luego de cortar los riñones en trozos de aproximadamente 0.5 cm² se procesaron por digestión enzimática con tripsina durante 10 minutos a 37°C en agitación, una vez transcurrido el tiempo se inactivó la acción de la tripsina con suero fetal bovino (SBF) al 15% (Cellgro Corning), seguido del filtrado del sobrenadante este se recolecto para ser centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos, luego de obtener el botón de células se lavó con medio RPMI 1640 (SIGMA ALDRICH) y el botón celular se incubó con mAbs anti-Podocalixina (Podocalixyn-like 1 (3D3) mAbs-IgG₁ de ratón SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) por 30 minutos, posteriormente se incubó con un anticuerpo anti-IgG₁ de ratón (Rat anti-mouse IgG₁ MicroBeads MiltenyiBiotec) durante 30 minutos. Después del lavado con medio RPMI 1640 (SIGMA ALDRICH) la selección positiva se realizó por medio de una columna de separación MACS (MiltenyiBiotec) y un separador MiniMACS (MiltenyiBiotec), posteriormente se determinó el número y viabilidad de los podocitos mediante el uso de la placa Quick-Prep TM Urinalysis kit donde se agregó 10µL del botón celular y se incubo por 30 minutos con un anticuerpo secundario anti-IgG₁ de ratón (Goat anti-mouse IgG₁ conjugado con rojo Texas SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY), después del lavado se incubó con DAPI (4',6-Diamidine-2'phenylindole dihydrochloride, ROCHE) por 30 minutos para distinguir células de fragmentos celulares y se observó al microscopio de fluorescencia para contabilizar las células marcadas con rojo y determinar el número de células por mL; un total de 1000 podocitos se cultivaron sobre el soporte celular y el cultivo control (placa de poliestireno)

con medio RPMI 1640 (SIGMA ALDRICH) suplementado con 20% de SBF (Cellgro Corning), 100 µg/mL de penicilina (SIGMA ALDRICH) y 100 µg/mL de estreptomicina (SIGMA ALDRICH) en presencia de 5% de CO₂ a 37°C.

6.5.2 Cultivo primario de podocitos a partir de SU por selección positiva

De pacientes de SN-I y SS se recolectaron 50 mL de la primer orina de la mañana de medio chorro en un recipiente estéril y se procesaron en un lapso no mayor a 30 minutos., el examen general de orina (EGO) se realizó utilizando tiras reactivas (Siemens Multistix 10 SG), después de homogenizar la muestra se sumergió la tira reactiva por 10 segundos y posteriormente se comparó cada almohadilla de la tira con la correspondiente en la etiqueta del envase. Después de centrifugar la orina a 1000 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el botón celular se lavó dos veces con medio RPMI 1640 (SIGMA ALDRICH) bajo las mismas condiciones de centrifugación, el botón celular se incubó con mAbs anti-Podocalixina (Podocalixyn-like 1 (3D3) mAbs-IgG₁ de ratón SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) por 30 minutos, posteriormente se incubó con un anticuerpo anti-IgG₁ de ratón (Rat anti-mouse IgG₁ MicroBeads MiltenyiBiotec) durante 30 minutos. Después del lavado con medio RPMI 1640 (SIGMA ALDRICH) la selección positiva se realizó por medio de una columna de separación MACS (MiltenyiBiotec) y un separador MiniMACS (MiltenyiBiotec) posteriormente se determinó el número y viabilidad de los podocitos mediante el uso de la placa Quick-Prep™ Urinalysis kit donde se agregó 10µL del botón celular y se incubó por 30 minutos con un anticuerpo secundario anti-IgG₁ de ratón (Goat anti-mouse IgG₁ conjugado con rojo Texas SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY), después del lavado se incubó con DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindole dihidrochloride, ROCHE) por 30 minutos para distinguir células de fragmentos celulares y se observó al microscopio de fluorescencia para contabilizar las células marcadas con rojo y determinar el número de células

por mL; un total de 1000 podocitos se cultivaron sobre el soporte celular y el cultivo control (placa de poliestireno) con medio RPMI 1640 (SIGMA ALDRICH) suplementado con 20% de SBF (Cellgro Corning), 100 µg/mL de penicilina (SIGMA ALDRICH) y 100 µg/mL de estreptomicina (SIGMA ALDRICH) en presencia de 5% de CO₂ a 37°C.

6.6 Co-localización de CD80/Podocalixina y Podocina/Podocalixina

La expresión de CD80, Podocina y Podocalixina se determinó por inmunofluorescencia indirecta (IFI) en cultivo de podocitos de tejido renal murino y de SU de pacientes de SN-I y SS. Después de lavar por 5 minutos en PBS 1X se fijaron las células con paraformaldehído al 4% a 4°C por 5 minutos, se permeabilizaron con Tritón X-100 (Tritón al 0.1% con citrato de sodio al 0.1% en PBS 1X) por 2 minutos. Luego del lavado se bloquearon sitios inespecíficos con Tris-HCl 0.1M pH 7.5, BSA 3% y 20% de suero fetal bovino por 10 minutos.

Para la co-localización de CD80/Podocalixina, se incubó por 1 hora con un anticuerpo CD80 (B7.1) (Goat anti-human polyclonal IgG) seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra (Donkey anti-goat IgG conjugado con FITC SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) durante 1 hora. Posteriormente se incubó con mAbs anti-Podocalixina (Podocalixyn-like 1 (3D3) mAbs-IgG₁ de ratón SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) por 1 hora seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG₁ de ratón (Goat anti-mouse IgG₁ conjugado con rojo Texas SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) durante 30 minutos.

Para la co-localización de Podocina/Podocalixina se incubó por 1 hora con un anticuerpo Podocina (Rabbit anti-human polyclonal IgG) seguido de un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (Goat anti-rabbit IgG conjugado con FITC SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) durante 1 hora. Posteriormente se incubó con mAbs anti-Podocalixina (Podocalixyn-like 1 (3D3) mAbs-IgG₁ de ratón SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) por 1 hora seguido de un

anticuerpo secundario anti-IgG₁ de ratón (Goat anti-mouse IgG₁ conjugado con rojo Texas SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) durante 30 minutos.

Todos los anticuerpos fueron diluidos 1:100 en PBS y las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después del lavado se incubó por 30 minutos con DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidrocloride ROCHE), posteriormente del lavado con metanol y metanol-PBS se montaron en PBS/Glicerol (3:7) para ser fotografiadas a 40X en un microscopio Olympus DP-71. Las imágenes fueron analizadas en el programa Image-Pro Plus Version 7.0.

La expresión de CD80 y Podocina se identificó por emitir fluorescencia en color verde y la Podocalixina en color rojo, con el contraste de DAPI se determinó la localización celular. El análisis se realizó de manera independiente por 2 investigadores.

6.7 Viabilidad celular por cuantificación de L-lactato deshidrogenasa (LDH)

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima citoplasmática presente en las células, cuando estas sufren algún daño se produce la liberación de LDH por lo que la cuantificación en los sobrenadantes del cultivo celular se puede utilizar como indicador de muerte celular.

Se sembraron los podocitos obtenidos por selección positiva en placas de 6 pozos y se incubaron durante 3, 7, 15 y 30 días antes del ensayo. Se obtuvo el sobrenadante y se trabajó de acuerdo a las especificaciones del kit L-Lactate Assay Kit (Cayman Chemical), proporcionando la medición colorimétrica de la actividad de la LDH donde cataliza la reacción de reducción de NAD⁺ a NADH en presencia de L-lactato, mientras que la formación de NADH se midió a 585-595 nm en el espectro en un lector de placa Biotek Synergy HT.

6.8 Análisis estadístico

Los resultados son presentados como la media \pm desviación estándar y se analizaron por la prueba ANOVA de una vía seguido de una prueba de contraste *post-hoc* Tukey en el programa estadístico GraphPad Prism versión 5, y la significancia estadística se definió como $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Obtención de soportes celulares

La química aditiva y la técnica de evaporación de solvente permitieron la co-polymerización (combinación de 2 o más monómeros con diferente hidrofilia para formar una estructura polimérica) de cada uno de los elementos que conforman los soportes. La tabla 3 muestra las condiciones de preparación de los soportes y la figura 12 ilustra los soportes obtenidos: CS, PVA, CS/PVA, CS/PVA/Col IV y CS/PVA/Col IV/ $\alpha_3\beta_1$ Integrina.

Tabla 3. Condiciones de preparación de soportes celulares

Soporte	CS (% p/v)	PVA (% p/v)	Colágena IV (% p/v)	$\alpha_3\beta_1$ Integrina (% p/v)
CS	2	---	---	---
PVA	---	1	---	---
CS/PVA	2	1	---	---
CS/PVA/Col IV	2	1	7	---
CS/PVA/Col IV/$\alpha_3\beta_1$ Integrina	2	1	7	0.03

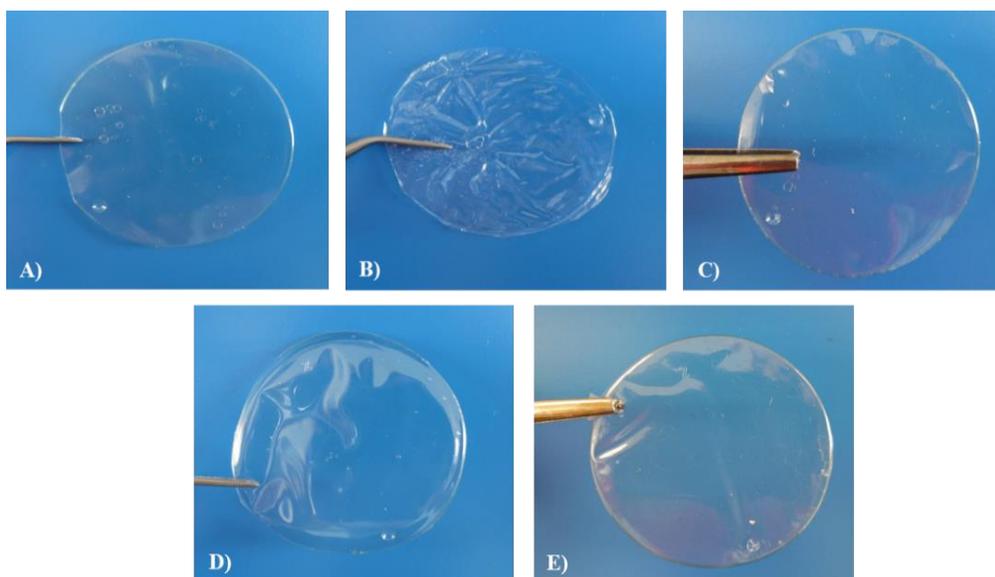


Figura 12. Soportes: A) CS, B) PVA, C) CS/PVA, D) CS/PVA/Col IV y E) CS/PVA/Col IV/ $\alpha_3\beta_1$ Integrina

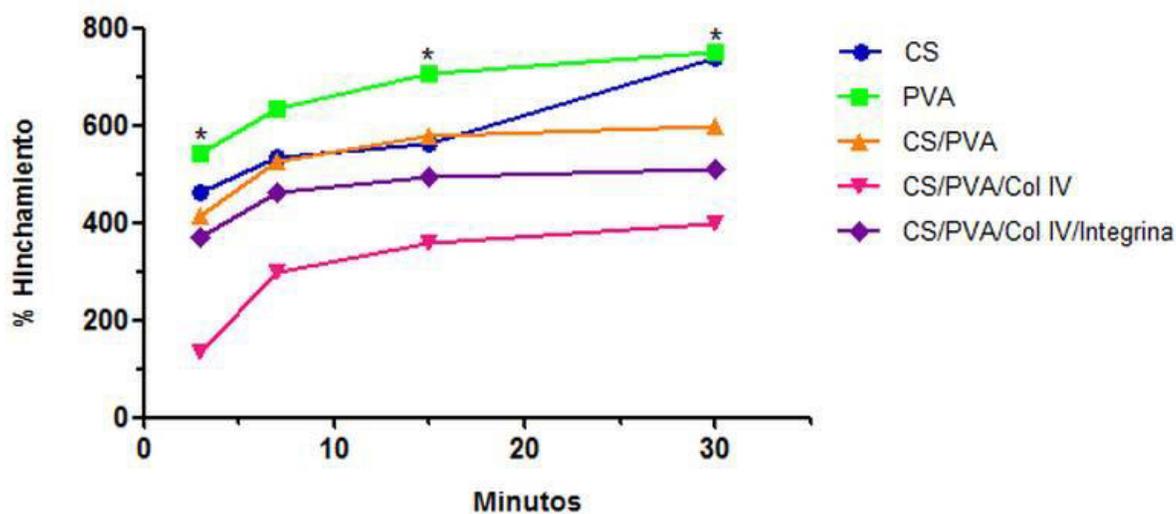
7.2 Ensayo de hinchamiento

El porcentaje de hinchamiento de los soportes celulares es de gran importancia debido a que se relaciona con la absorción de fluido, el cual influye en el transporte de nutrientes entre las células y en las características físico-químicas de los soportes. También es atribuido a la formación de una red más rígida por las reacciones inter e intra que se han producido en las cadenas poliméricas, lo que reduce la flexibilidad y el número de grupos hidrófilos del soporte, los cuales son desfavorables para la velocidad de hinchamiento.

Los soportes de CS y PVA presentan porcentajes de hinchamiento alrededor del 600%, en contraste con los soportes de CS/PVA, CS/PVA/Col IV y CS/PVA/Col IV/ $\alpha_3\beta_1$ Integrina que es de 530%, 300% y 460% respectivamente (tabla 4 y gráfica 1) existiendo diferencias significativas entre PVA y CS/PVA/Col IV ($p < 0.01$).

Tabla 4. Porcentaje de hinchamiento de soportes celulares

Soporte	Absorción (%)
CS	575.6 \pm 58.99
PVA	657.6 \pm 45.42
CS/PVA	529.9 \pm 41.99
CS/PVA/Col IV	296.5 \pm 58.88
CS/PVA/Col IV/ $\alpha_3\beta_1$ Integrina	459.5 \pm 31.07



Gráfica 1. Porcentaje de hinchamiento de los soportes

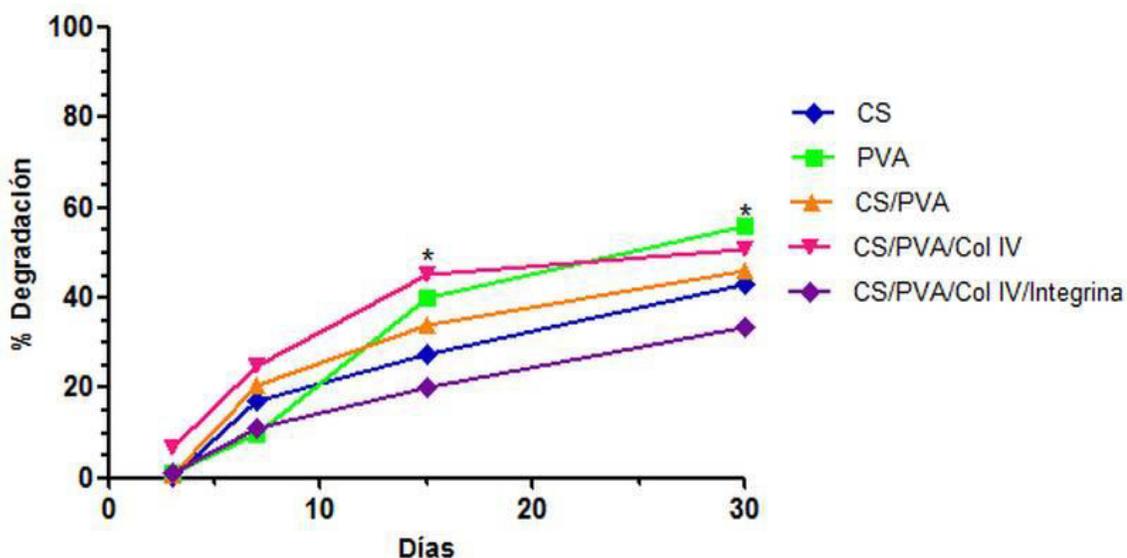
7.3 Ensayo de degradación

El porcentaje de degradación permite conocer si las propiedades fisicoquímicas de los soportes celulares se ven alteradas con el transcurso del tiempo, esto puede incluir pérdida de masa del polímero a través de mecanismos como son la solvatación y la despolimerización.

Los soporte celulares de PVA y CS/PVA/Col IV presentan un porcentaje de degradación mayor en contraste con los de CS/PVA/Col IV/ $\alpha_3\beta_1$ Integrina, CS/PVA y CS (tabla 5 y gráfica 2) existiendo diferencias significativas entre CS/PVA/Col IV/ $\alpha_3\beta_1$ Integrina con PVA y CS/PVA/Col IV ($p < 0.01$), lo que indica una mayor despolimerización debido a que la interacción química de las cadenas poliméricas en estos soportes es muy bajo.

Tabla 5. Porcentaje de degradación de soportes celulares

Días	CS (%)	PVA (%)	CS/PVA (%)	CS/PVA/Col IV (%)	CS/PVA/Col IV/ $\alpha_3\beta_1$ Integrina (%)
3	0.5±0.01	1.2±0.01	0.59±0.01	6.64±0.01	1.20±0.01
7	17.01±0.1	10.0±0.01	20.56±0.01	25.07±0.009	11.04±0.01
15	27.62±0.009	40.0±0.01	33.90±0.009	45.22±0.009	20.32±0.009
30	42.99±0.01	56.0±1	46.07±0.01	50.82±0.009	33.37±0.1
Promedio	22.03±17.88	26.80±25.59	25.28±19.48	31.94±20.17	16.48±13.7



Gráfica 2. Porcentaje de degradación de los soporte

7.4 Espectroscopia de infrarrojo (FTIR)

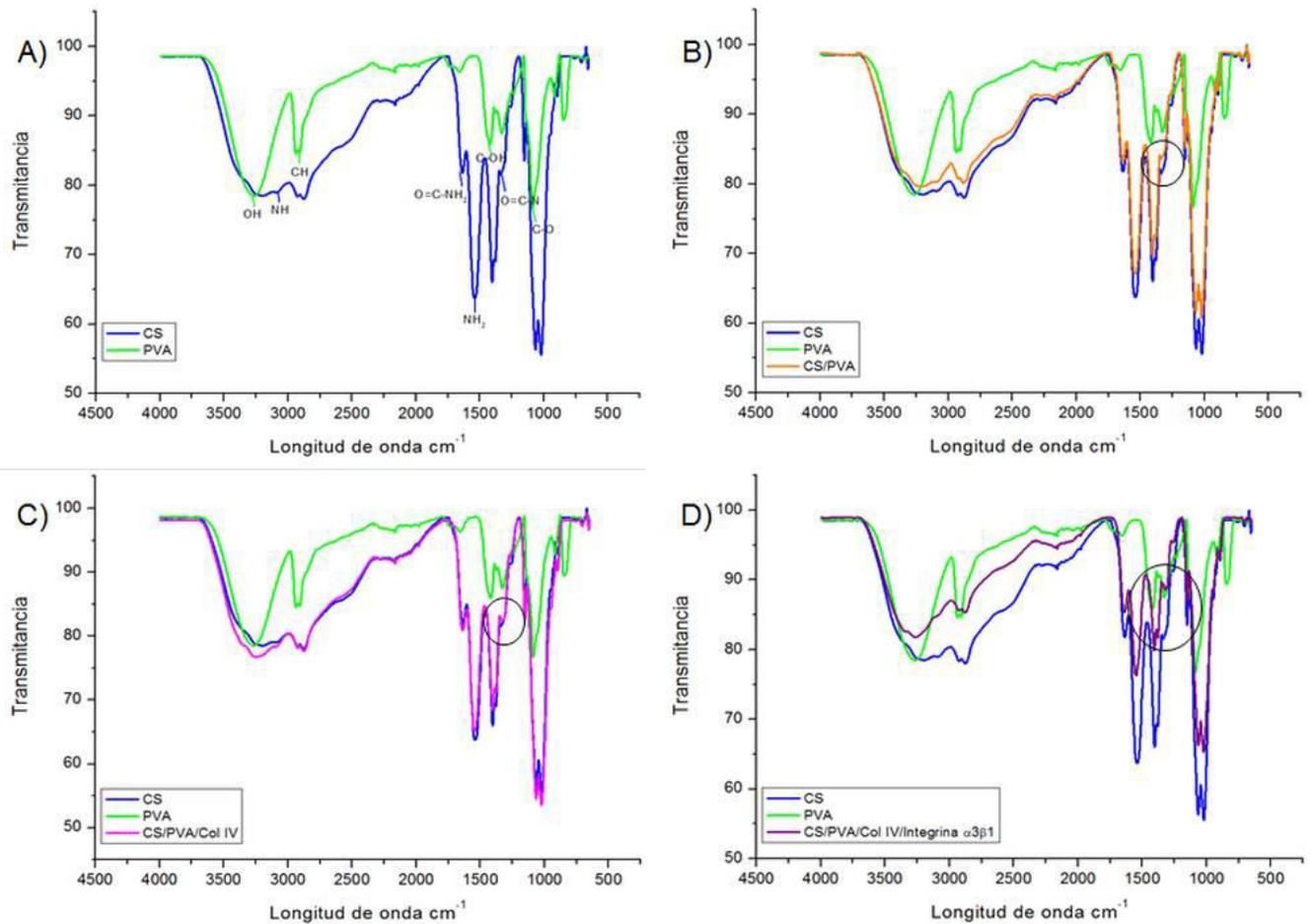
El análisis de los espectros de infrarrojo FTIR se realizó para confirmar las interacciones presentes en cada uno de los elementos de los soportes celulares por lo que se obtuvieron los espectros de CS, PVA, CS/PVA, CS/PVA/Col IV y CS/PVA/Col IV/ $\alpha_3\beta_1$ Integrina (gráfica 3). El CS presento bandas de absorción a 3100 cm^{-1} que corresponde a NH_2 , sus picos característicos a 1640 cm^{-1} y 1540 cm^{-1} que se atribuyen a la amida I ($\text{O}=\text{C}-\text{NH}$) y la amida II (NH_2) respectivamente; y a 1336 cm^{-1} la vibración de tención de $\text{O}=\text{C}-\text{N}$ (gráfica 3A).

En el caso del PVA se observa una banda de absorción en 3280 cm^{-1} indicando la fuerza de los enlaces de hidrogeno en las cadenas poliméricas, a 2850 cm^{-1} una banda de estiramiento correspondiente al grupo alquilo ($\text{C}-\text{H}$) y conformaciones del grupo $\text{C}-\text{OH}$ en 1232 cm^{-1} y 1417 cm^{-1} (gráfica 3A). La tabla 6 resume las bandas de absorción infrarrojas observadas con el respectivo grupo funcional que representan.

En los espectros para los soportes CS/PVA, CS/PVA/Col IV y CS/PVA/Col IV/ $\alpha_3\beta_1$ Integrina se observa un patrón que es claramente semejante al del CS, pero se hace evidente la disminución de la transmitancia a 1336 cm^{-1} correspondiente a la extensión de $\text{O}=\text{C}-\text{N}$, lo que sugiere un interacción química de todos los componentes (gráfica 3B, 3C y 3D).

Tabla 6. Grupos funcionales característicos del CS y PVA

CS		PVA	
Región del espectro (cm^{-1})	Grupo funcional	Región del espectro (cm^{-1})	Grupo funcional
3215	NH_2	3280	OH
1664	$\text{C}=\text{O}$	2850	$\text{C}-\text{H}$
1574	NH_2	1417	$\text{C}-\text{OH}$
1336	$\text{C}-\text{N}$	1232	$\text{C}-\text{OH}$



Gráfica 3. Espectros de infrarrojo de: A) CS y PVA (blancos), B) CS, PVA y CS/PVA, C) CS, PVA y CS/PVA/Col IV y D) CS, PVA y CS/PVA/Col IV/ $\alpha_3\beta_1$ Integrina

En base a estos resultados se optó por el uso del soporte celular CS/PVA/Col IV/ $\alpha_3\beta_1$ Integrina para el cultivo primario de podocitos, debido a que la interacción química de los componentes disminuye el porcentaje de hinchamiento y degradación, y tomando en cuenta que la colágena tipo IV y la $\alpha_3\beta_1$ integrina son las principales proteínas de anclaje para estas células en la MBG.

7.5 Obtención de podocitos por selección positiva

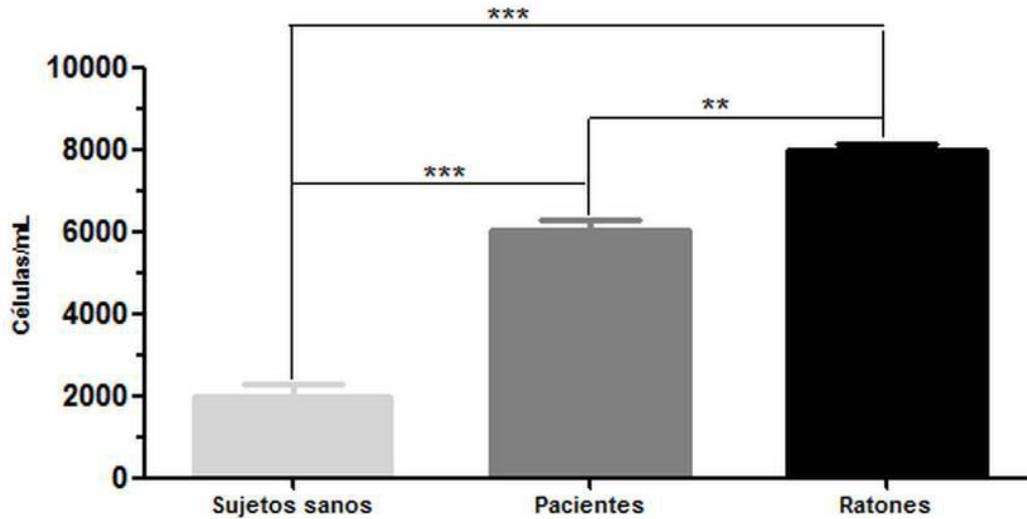
Para obtener podocitos de tejido murino así como de SU de pacientes y SS se utilizó la técnica de selección positiva empleando una columna de separación MACS (MiltenyiBiotec) y un separador MiniMACS (MiltenyiBiotec). El número y viabilidad de los podocitos obtenidos de tejido murino y SU de pacientes de SN-I y SS se determinó mediante el uso de la placa Quick-Prep™ Urinalysis kit. Se contabilizaron las células marcadas con rojo y se determinó el número de células por mL (tabla 7) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Células}/\mu\text{L} = \text{Células por campo} \times 2 \text{ (factor de dilución)}$$

Tabla 7. Determinación del número de podocitos viables obtenidos por selección positiva (podocalixina) de tejido renal murino y SU de SS y pacientes de SN-I

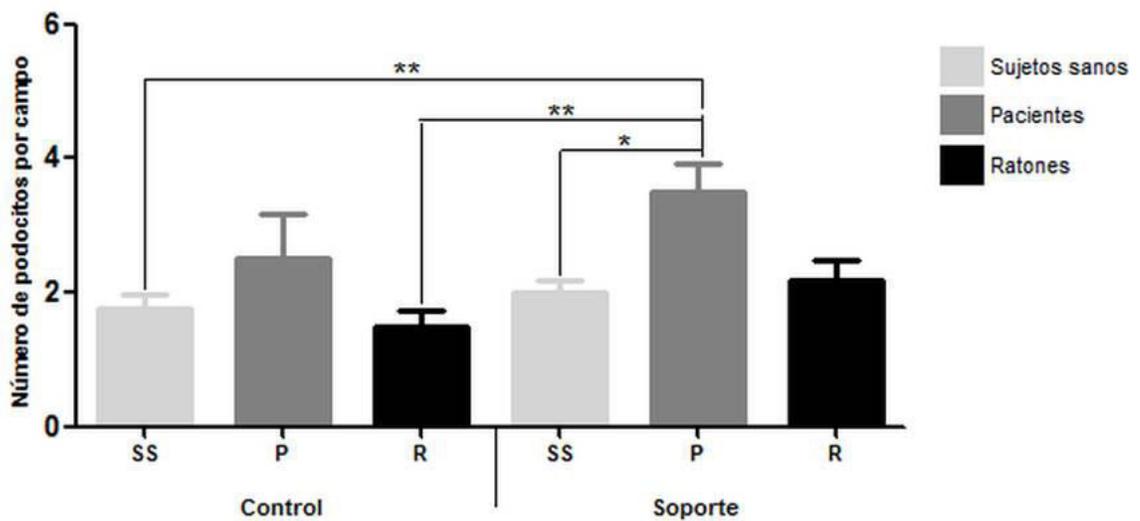
Grupos	Células/campo (#)	Factor de dilución	Células/ μL (#)	Células/mL (#)
SS	1	2	2	2000
SN-I	3	2	6	6000
Ratón	4	2	8	8000

Los resultados indican la obtención de un mayor número de podocitos viables a partir de tejido renal murino=8000 células, en contraste con los obtenidos de SU de pacientes=6000 células y SS=2000 células (gráfica 4), existiendo diferencias significativas ($p < 0.0001$)



Gráfica 4. Número de podocitos obtenidos por selección positiva (podocalixina) de tejido renal murino y SU de SS y pacientes de SN-I

Una vez obtenidos los podocitos por selección positiva se prosiguió a realizar el cultivo sembrando 1000 células por pozo, posteriormente se determinó el número de podocitos mantenidos en el cultivo observándose una mayor cantidad de ellos en el soporte en contraste con el cultivo control, lo que sugiere que el soporte celular favorece las condiciones del cultivo. La gráfica 5 muestra las medias de los podocitos adheridos por campo.



Gráfica 5. Determinación del número de podocitos adheridos al cultivo control y al soporte mediante microscopía de fluorescencia (podocalixina).

7.6 Co-localización de CD80/Podocalixina y Podocina/Podocalixina

Para determinar la expresión de CD80, Podocina y Podocalixina en los cultivos se utilizó la técnica de IFI, donde la expresión de Podocalixina se identificó con fluorescencia en color rojo y la expresión de Podocina y CD80 con fluorescencia en color verde, contrastándose con DAPI para teñir el DNA de las células. La expresión de CD80 se incrementa en podocitos cultivados sobre el soporte (figura 13D), en contraste con podocitos del cultivo control donde dicha expresión se observa disminuida (figura 13A), mientras que la expresión de Podocalixina y Podocina se mantiene constante tanto en podocitos cultivados sobre el soporte como en podocitos del cultivo control (figura 13B y 13E, y figura 14A, 14B, 14D y 14E). Los resultados en promedio de la expresión de CD80, Podocina y Podocalixina se muestran en las gráficas 6, 7 y 8 respectivamente, existiendo diferencia significativa en la expresión de CD80 en cultivo control con respecto al cultivo en el soporte ($p < 0.0001$).

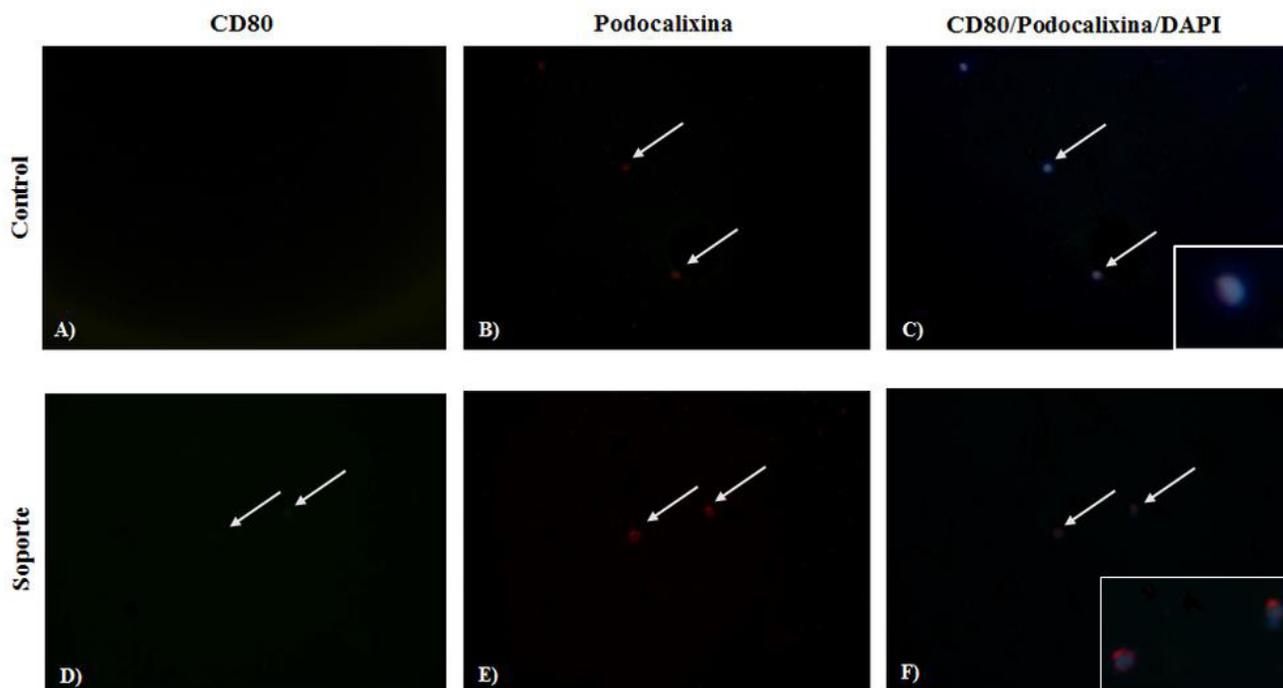


Figura 13. Determinación de la expresión de CD80 (verde) y Podocalixina (rojo) en podocitos cultivados sobre el soporte y cultivo control, empleando DAPI (azul) para la detección del núcleo celular mediante microscopia de fluorescencia.

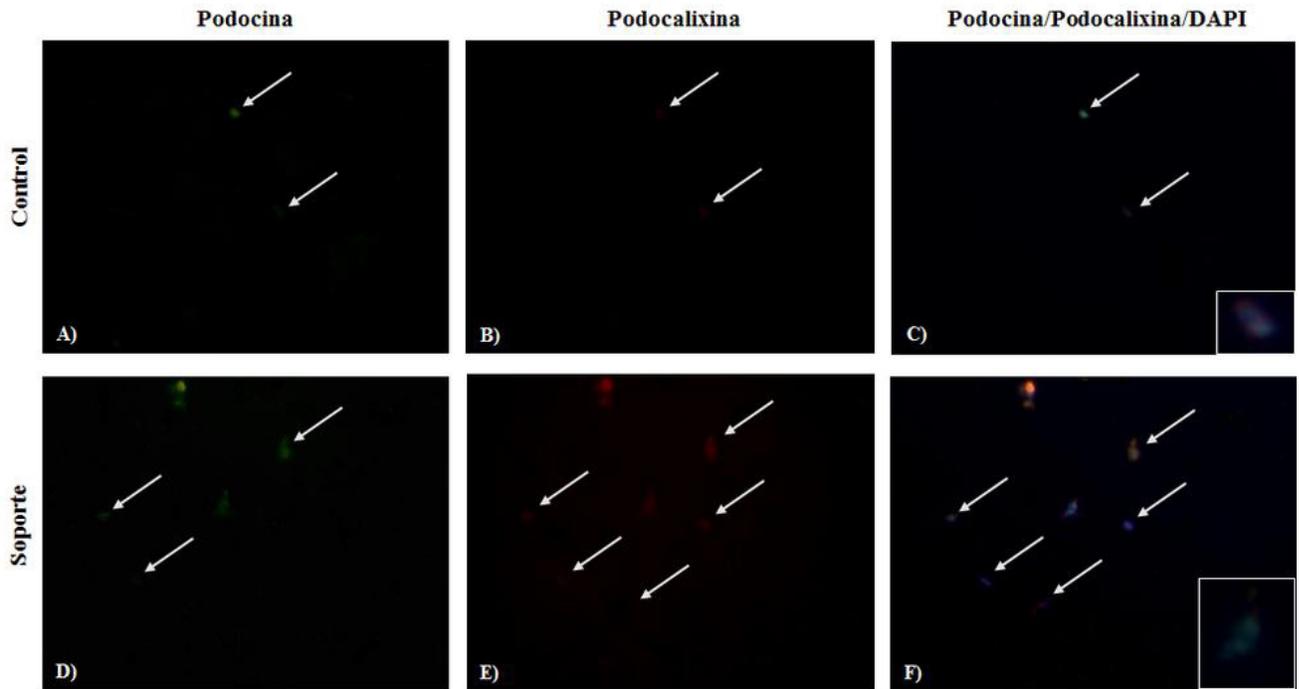
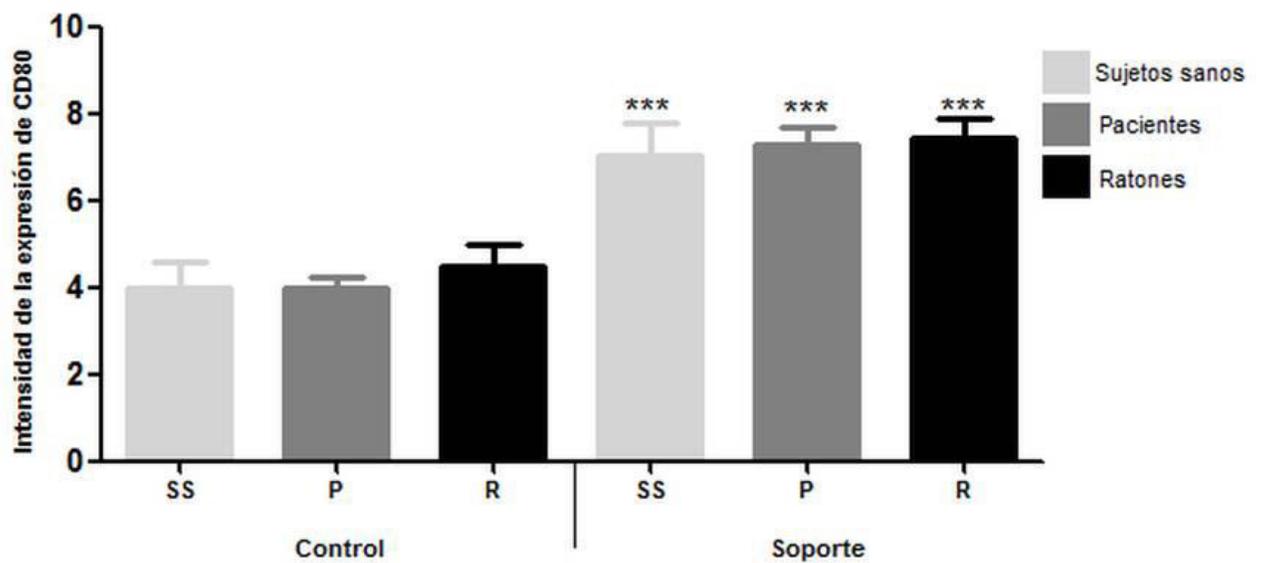
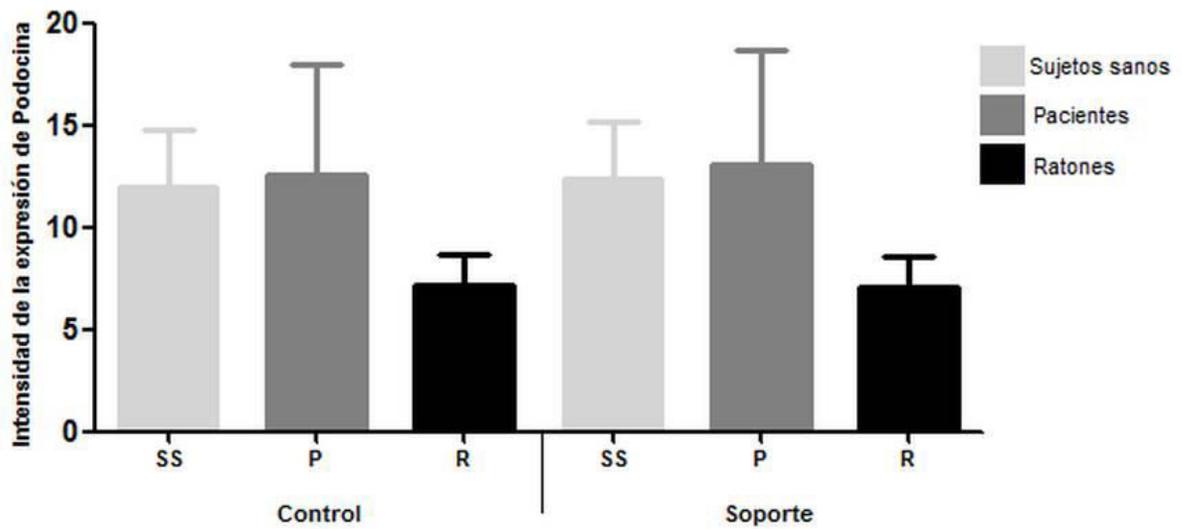


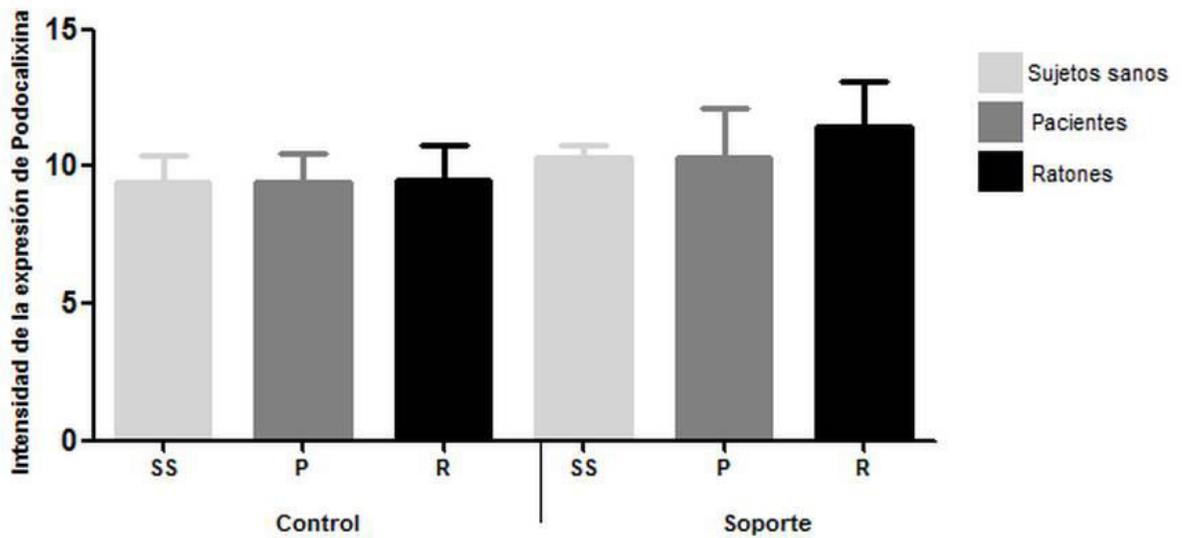
Figura 14. Determinación de la expresión de Podocina (verde) y Podocalixina (rojo) en podocitos sobre el soporte y cultivo control, empleando DAPI (azul) para la detección del núcleo celular mediante microscopía de fluorescencia.



Gráfica 6. Determinación de la expresión de CD80 en podocitos mediante microscopía de fluorescencia. Derivados de SS, pacientes de SN-I y ratón en cultivo control y soporte.



Gráfica 7. Determinación de la expresión de Podocina en podocitos derivados de SS, pacientes de SN-I y ratón en cultivo control y soporte. Mediante microscopia de fluorescencia.



Gráfica 8. Determinación de la expresión de Podocalixina en podocitos derivados de SS, pacientes de SN-I y ratón en cultivo control y soporte. Mediante microscopia de fluorescencia.

Para determinar la co-localización de la expresión de CD80/Podocalixina y Podocina/Podocalixina se obtuvieron los coeficientes de correlación de Pearson (r^2) en el programa Image-Pro Plus Versión 7.0, dichos valores de correlación varían en un intervalo de (-1, 1) (tabla 8).

Tabla 8. Coeficientes de correlación de Pearson

VALOR	TIPO DE CORRELACIÓN
-1.00	Correlación negativa perfecta
-0.90 a -0.99	Correlación negativa muy fuerte
-0.75 a -0.89	Correlación negativa considerable
-0.5 a -0.74	Correlación negativa media
-0.25 a -0.49	Correlación negativa débil
-0.10 a -0.24	Correlación negativa muy débil
0.00	No existe correlación
0.10 a 0.24	Correlación positiva muy débil
0.25 a 0.49	Correlación positiva débil
0.5 a 0.74	Correlación positiva media
0.75 a 0.89	Correlación positiva considerable
0.90 a 0.99	Correlación positiva muy fuerte
1.00	Correlación positiva perfecta

La expresión de Podocalixina se identificó por fluorescencia en color rojo y la expresión de CD80 y Podocina en fluorescencia color verde, la co-localización de ambas expresiones al contrastarse con DAPI se identificó por medio del traslape dando un color turquesa (figura 15).

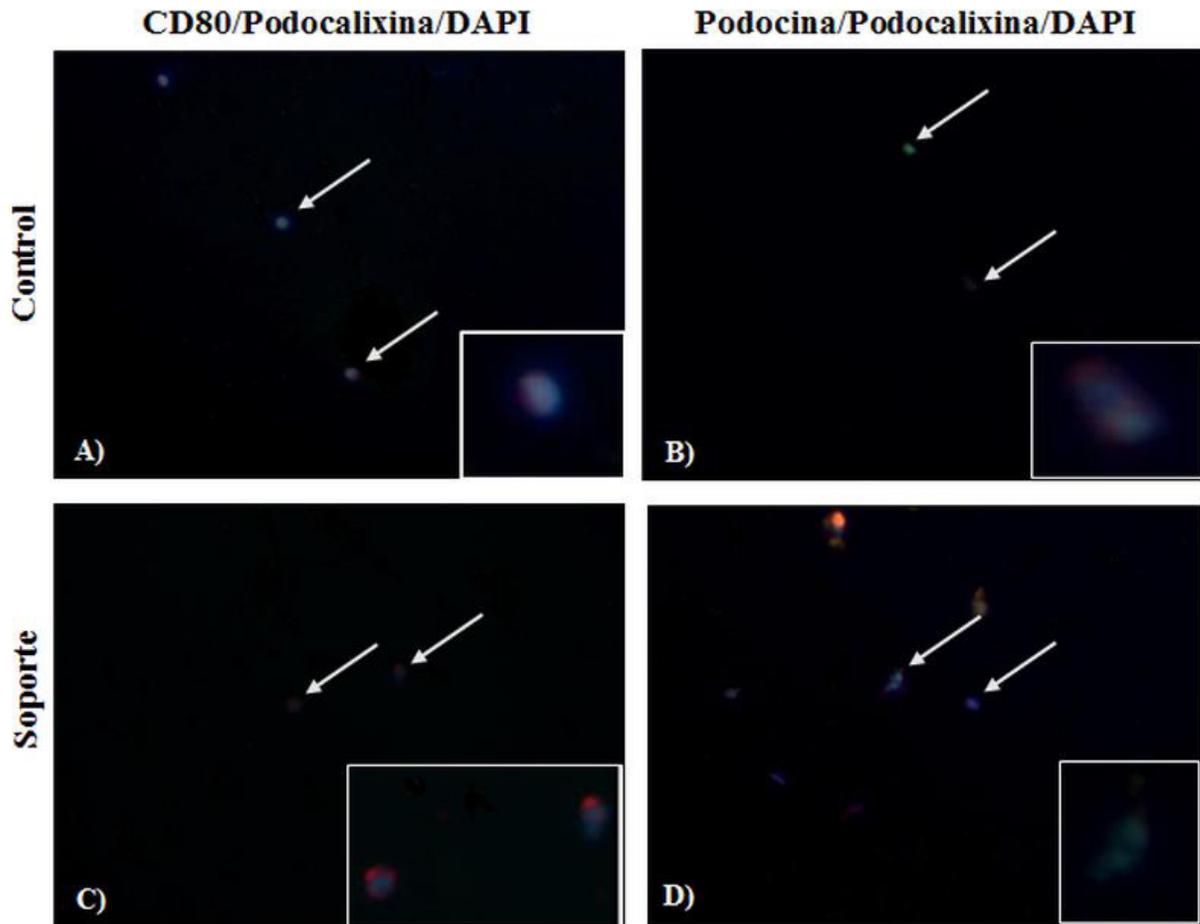
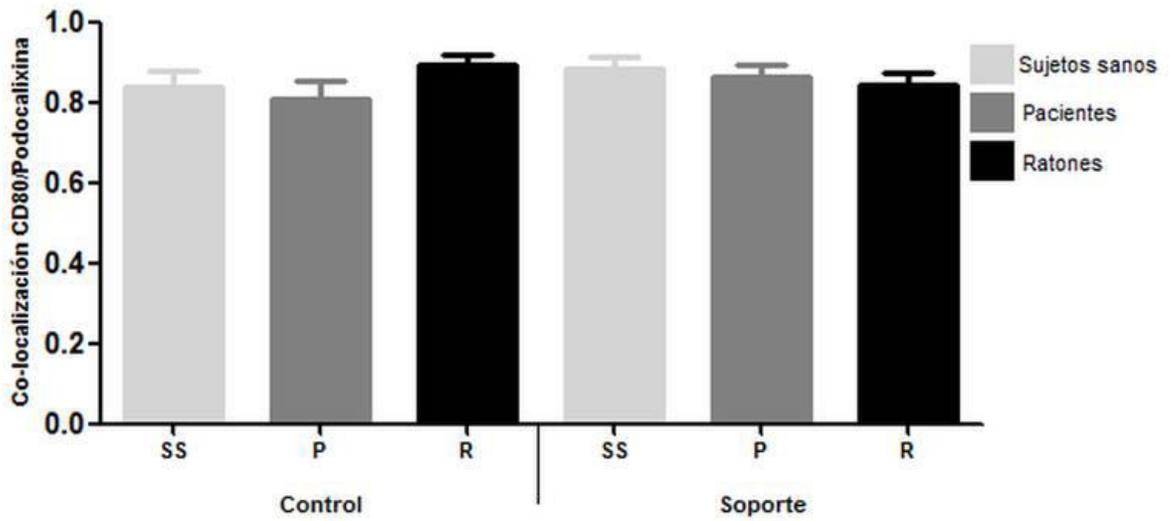
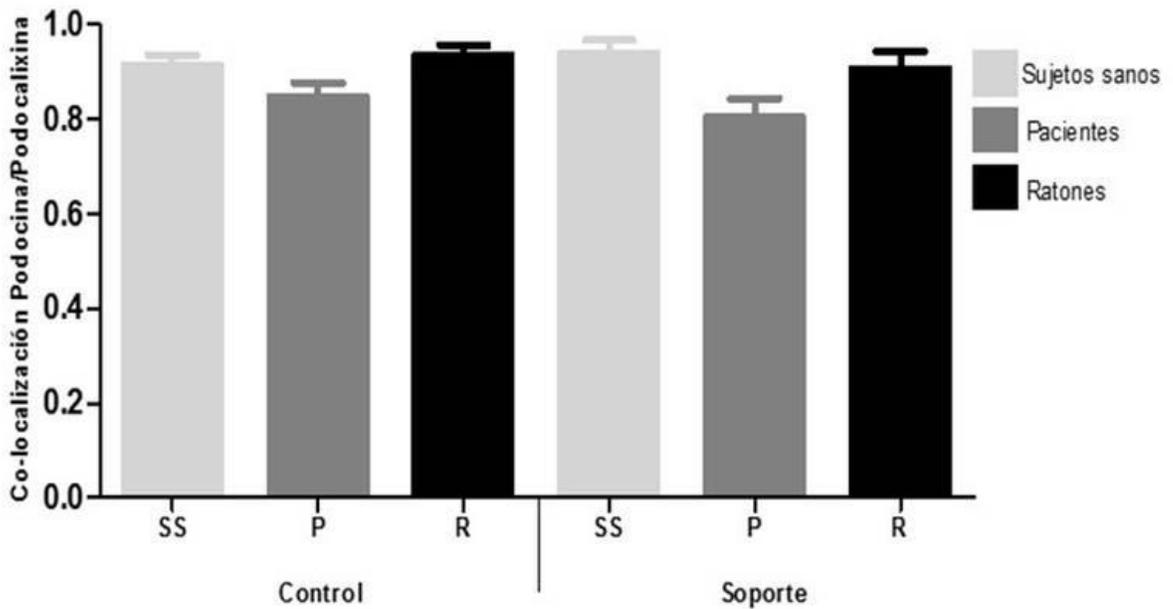


Figura 15. Co-localización de la expresión de CD80/Podocalixina y Podocina/Podocalixina en podocitos cultivados. A-B cultivo control, A) Traslape de CD80/Podocalixina/DAPI y B) Traslape Podocina/Podocalixina/DAPI. C-D cultivo en soporte, C) Traslape de CD80/Podocalixina/DAPI y D) Traslape Podocina/Podocalixina/DAPI.

De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó que la expresión de CD80 y Podocina co-localiza con la expresión de Podocalixina, presentando valores de correlación entre 0.80 a 0.95, demostrando que la expresión de CD80 se observa a nivel del cuerpo del podocito y que la expresión de proteínas estructurales como Podocina y Podocalixina no se ven afectadas. Estos valores se observaron en todos los grupos tanto en podocitos cultivados en el soporte como en el cultivo control. Los resultados en promedio de la co-localización de CD80/Podocalixina y Podocina/Podocalixina se muestran en las gráficas 9 y 10 respectivamente.



Gráfica 9. Determinación de la co-localización de la expresión de CD80/Podocalixina en podocitos derivados de SS, pacientes de SN-I y ratón en cultivo control y soporte. Mediante microscopia de fluorescencia.

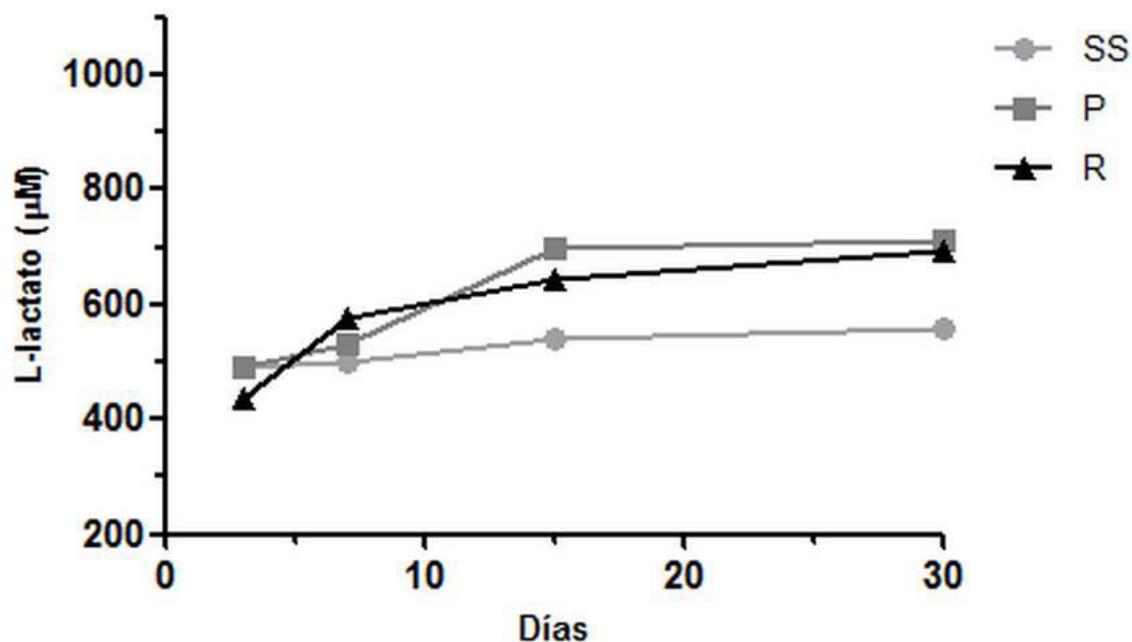


Gráfica 10. Determinación de la co-localización de la expresión de Podocina/Podocalixina en podocitos derivados de SS, pacientes de SN-I y ratón en cultivo control y soporte. Mediante microscopia de fluorescencia.

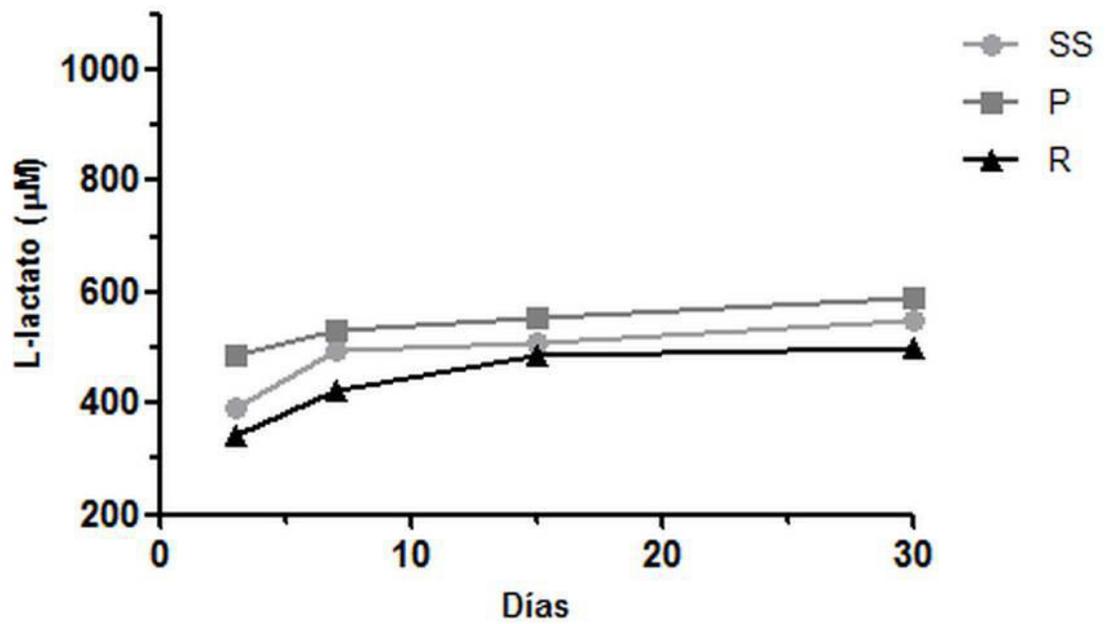
7.7 Viabilidad de podocitos cultivados

Para determinar la viabilidad de los podocitos se cuantifico en el sobrenadante de los cultivos la concentración de LDH por la técnica de ELISA, de acuerdo al kit utilizado se reporta que valores por encima de 1 mM se toman como daño a nivel de membrana celular y de 6 a 10 mM como altas tasas de mortalidad.

Las concentraciones de LDH (μM) obtenidas en promedio fueron de 521.8 en SS, 608.1 en SN-I y 588.2 en ratón en el cultivo control (gráfica 11), en contraste con el soporte que fue de 485.3 en SS, 540.2 SN-I y 439 en ratón (gráfica 12). No existiendo diferencias significativas.



Gráfica 11. Cuantificación de la concentración de L-lactato deshidrogenasa en sobrenadantes de cultivos de podocitos derivados de SS, pacientes de SN-I y ratón (cultivo control).



Gráfica 12. Cuantificación de la concentración de L-lactato deshidrogenasa en sobrenadantes de cultivos de podocitos derivados de SS, pacientes de SN-I y ratón en soporte.

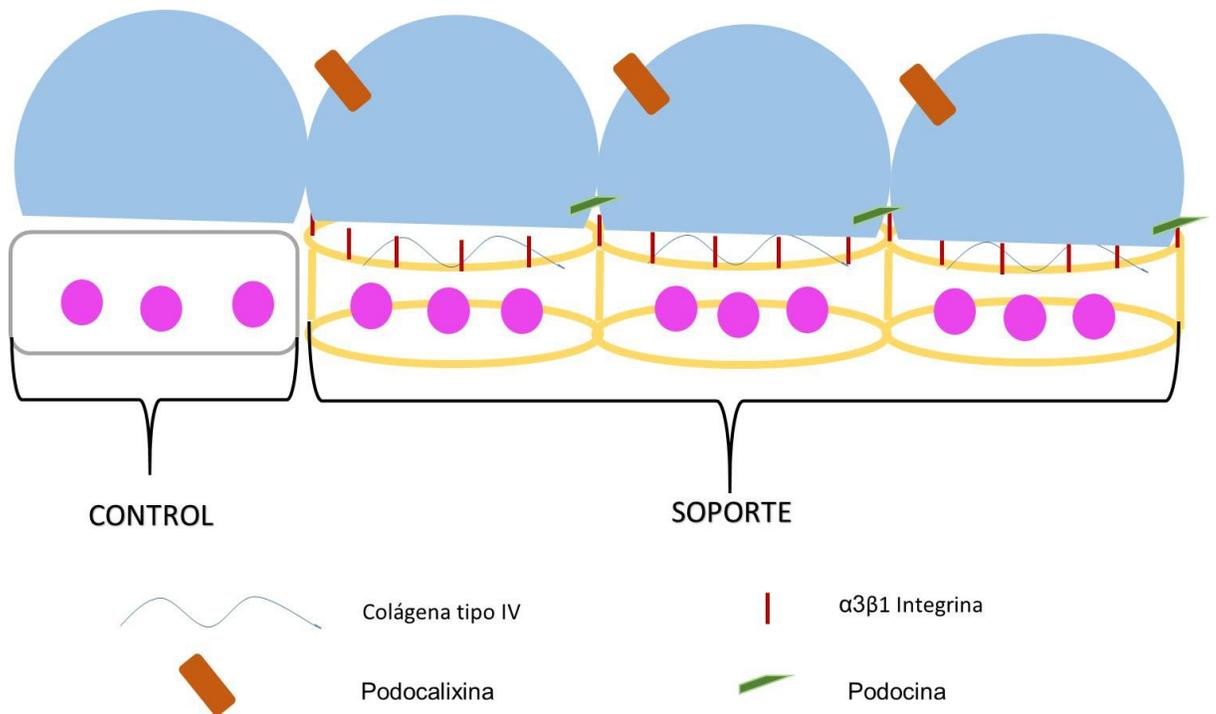


Figura 16. Modelo representativo del cultivo primario de podocitos en cultivo control y en soporte celular.

8. DISCUSIÓN

Debido a que las enfermedades renales se han convertido en un problema de salud pública a nivel mundial y su incidencia y prevalencia va en aumento, estas se han catalogado dentro de las 10 primeras causas de muerte en México. Los mecanismos fisiopatológicos que desencadenan el daño renal aún no están bien establecidos pero se han identificado que afectan principalmente a los podocitos, resultando en una vía común caracterizada por la eliminación de los pedicelos, proteinuria e interrupción del filtrado glomerular (Gigante *et al.*, 2011). Para contribuir a comprender estos mecanismos, los estudios realizados en este trabajo fueron enfocados a la síntesis, caracterización y evaluación de un soporte sobre cultivo de podocitos. Obteniendo los siguientes resultados: 1) Existe co-polimerización de CS, PVA, colágena tipo IV e integrina $\alpha3\beta1$ en el soporte. 2) El soporte CS/PVA/Col IV/Integrina $\alpha3\beta1$ es más estable en comparación con los otros soportes. 3) El PVA, la colágena tipo IV y la integrina $\alpha3\beta1$ actúan como agentes entrecruzantes con el CS. 4) En muestras de SU de pacientes de SN-I el número de podocitos aumenta en comparación con SS. 5) El número de podocitos adheridos en el soporte CS/PVA/Col IV/Integrina $\alpha3\beta1$ es mayor en contraste con el cultivo control. 6) El soporte CS/PVA/Col IV/Integrina $\alpha3\beta1$ mantiene la viabilidad de los podocitos por 30 días. 7) El soporte CS/PVA/Col IV/Integrina $\alpha3\beta1$ no afecta la expresión de proteínas estructurales de los podocitos pero si la expresión de CD80. 8) El soporte CS/PVA/Col IV/Integrina $\alpha3\beta1$ no es toxico para los podocitos.

Actualmente el uso de materiales biodegradables como el CS se ha incrementado gracias a los buenos resultados obtenidos en el tratamiento de cicatrización de heridas y administración de fármacos. Además de que el CS puede ser modificado al combinarse con otros polímeros o proteínas que

alteran sus propiedades para usarse en aplicaciones biomédicas particulares. Estas características hacen al CS un biomaterial ideal en aplicaciones enfocadas a cultivo celular, ya que sin duda constituye la forma más práctica de evaluar la biocompatibilidad y biotoxicidad (Gao *et al.*, 2012).

En esta tesis se caracterizó un soporte celular de CS combinado con un polímero sintético (PVA) y proteínas involucradas en la adhesión de podocitos, como colágena tipo IV e integrina $\alpha3\beta1$; para posteriormente ser evaluado en cultivo primario de podocitos. Nuestros resultados indican que los porcentajes de hinchamiento de los soportes de CS y PVA son del orden de 600%, disminuyendo el porcentaje conforme aumenta el entrecruzamiento de colágena tipo IV e integrina $\alpha3\beta1$ en los soportes. Estos resultados concuerdan con los de Caruapoma y Santiago en 2005 quienes reportan que soportes de CS, PVA y CS/PVA presentan porcentajes de hinchamiento del 600%, con la diferencia de que ellos utilizaron radiación gamma para obtener los soportes, empleando una dosis de 10 kilogray (kGy). Costa *et al.*, en 2009 reportan una disminución en el porcentaje de degradación de soportes de CS/PVA al incrementar las proporciones de glutaraldehído (GA), el cual es utilizado como agente químico entrecruzante. Estos resultados y los nuestros indican que el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas mantiene la estabilidad de los soportes y disminuyen su degradación. Esta hipótesis se apoya con los resultados obtenidos de FTIR que indican la preferencia del entrecruzamiento polimérico de colágena tipo IV e integrina $\alpha3\beta1$ a través del grupo O=C-N del CS, coincidiendo con los resultados reportado por Costa *et al.*, en 2009 donde el GA presenta preferencia por los grupos amino (NH₂) del CS sobre los grupos hidroxilo (OH) del PVA.

Los podocitos son células epiteliales viscerales localizadas en la MBG, son responsables de mantener el flujo del filtrado glomerular a través de los espacios intercelulares que subyace en la función renal. En pacientes con ciertas enfermedades glomerulares se han detectado podocitos en SU, correlacionando con la pérdida de la función renal. Nuestros resultados de la obtención de podocitos viables por selección positiva muestran una mayor

cantidad de podocitos en ratón=8600 células, seguido de paciente de SN-I=6000 células y SS=2000 células. Estos resultados concuerdan con los publicados por Petermann *et al.*, en 2003 que reportan la presencia de podocitos viables en SU de un modelo de nefritis Heymann pasiva inducido en ratas (2500 células), en contraste con los controles donde no se observó presencia de podocitos viables. Nuestros resultados también concuerdan con los de Nakamura *et al.*, en 2000 que reportan en un estudio con 50 pacientes diabéticos y 10 SS, ausencia de podocitos viables en SS, en pacientes diabéticos con normoalbuminuria y pacientes diabéticos con falla renal crónica, en contraste con pacientes diabéticos con microalbuminuria y pacientes diabéticos con macroalbuminuria donde se detectó la presencia de podocitos viables en SU, de 0.8-1.9 células/mL y 0.8-5.3 células/mL respectivamente.

En la literatura existen numerosos estudios en el campo biológico y biomédico que involucran a CS, nanopartículas y cultivo celular. A medida que la nanotecnología avanza, los investigadores están explorando diferentes formas de modificar el CS, evaluando su biocompatibilidad y sus efectos en la adhesión y proliferación, especialmente en cultivos primarios. Las ventajas de usar biomateriales se debe a su bajo costo y a que se pueden emplear en ambientes controlados con resultados previsibles y reproducibles. Al evaluar el soporte en el cultivo se observó por IFI un mayor número de podocitos adheridos SS=2, SN-I=3.5 y ratón=2; en contraste con el cultivo control, SS=1.75, SN-I=2.5 y ratón=1.5. Estos resultados concuerdan con los de Chuang *et al.*, en 1999 donde reportan mayor adhesión de fibroblastos extraídos de piel (5 células por campo) en un soporte de CS/PVA así como presencia de microvellosidades, en contraste con un soporte de PVA donde hay menor cantidad de células adheridas (3 células por campo) sin presencia de microvellosidades. La expresión de podocalixina en los podocitos se observa de forma homogénea tanto en el soporte (SS=10.3, SN-I=10.3 y ratón=11.4) como en el control (SS=9.4, SN-I=9.4 y ratón=9.4), sin embargo la expresión de CD80 se incrementa en podocitos cultivados sobre el soporte

(SS=7, SN-I=7.3 y ratón=7.4) en contraste con el cultivo control (SS=3.9, SN-I=3.9 y ratón=4.5). Existen reportes donde se ha observado que los biomateriales favorecen la maduración de células dendríticas a través de la activación de los TLR's (Toll-like receptor) aumentando la expresión de moléculas co-estimuladoras (p. ej. CD80, CD86, CD40) para una eficaz presentación de antígeno (Vicente, 2013), también datos recientes indican que las células podocitarias en determinadas circunstancias pueden adquirir fenotipo y función de células dendríticas y pueden ser inducidas a expresar CD80 (B7.1) (Segarra *et al.*, 2012). Por lo que creemos que el CS activa alguna vía de señalización lo que conlleva a la expresión de este receptor en los podocitos.

Las pruebas de citotoxicidad utilizando cultivos celulares son el primer paso para determinar la seguridad de los biomateriales y la identificación de compuestos activos. Nuestros resultados de viabilidad celular muestran una liberación de LDH mayor en sobrenadante de cultivo control en contraste con el soporte, sin embargo no se presenta daño a nivel de membrana celular. Estos resultados concuerdan con los de Chuang *et al.*, en 1999 donde reportan una viabilidad de fibroblastos del 70-80% en un soporte de CS/PVA, con respecto a un soporte de PVA donde la viabilidad se redujo hasta un 30%; con la diferencia que sus cultivos los mantuvieron por 4 días y la viabilidad la determinaron por la técnica de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio).

Consideramos que el mantenimiento de los podocitos *ex vivo* ayudaría a esclarecer los mecanismos fisiopatológicos involucrados en las enfermedades glomerulares para diseñar nuevas estrategias de diagnóstico.

9. CONCLUSIONES

La evaluación del soporte celular desarrollado permitió conocer que:

- 1) La co-polimerización de CS, PVA, Colágena IV y $\alpha_3\beta_1$ integrina se realizó satisfactoriamente, proporcionando estabilidad al soporte.
- 2) El porcentaje de hinchamiento y degradación confirman la co-polimerización y estabilidad del soporte CS/PVA/Col IV/ $\alpha_3\beta_1$ Integrina
- 3) .Los espectros de infrarrojo demuestran que el PVA, la colágena tipo IV y la $\alpha_3\beta_1$ integrina actúan como agentes entrecruzantes con el CS, lo que hace que disminuya el porcentaje de hinchamiento y degradación.
- 4) Los espectros de infrarrojo demuestran que el PVA, la colágena tipo IV y la $\alpha_3\beta_1$ integrina presentan interacciones con los grupos amino (NH_2) del CS, lo que disminuye el porcentaje de hinchamiento y degradación.
- 5) Se observa una mayor cantidad de podocitos viables en tejido renal murino.
- 6) El soporte celular mantiene la expresión de Podocina y Podocalixina, sin embargo incrementa la expresión de CD80.
- 7) El soporte celular CS/PVA/Col IV/ $\alpha_3\beta_1$ integrina mantiene la viabilidad del cultivo.

10.PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en esta tesis abren la posibilidad de establecer el uso de soportes celulares con un enfoque comercial o de investigación para el cultivo primario de podocitos con el fin de diseñar modelos de estudio relacionados a patologías en donde estas células se encuentran implicadas (Síndrome Nefrótico, Diabetes Mellitus y Nefritis Lúpica).

11.ANEXOS

HOSPITAL GENERAL DEL ESTADO DE ZACATECAS
"LUZ GONZALEZ COSÍO"
SERVICIO DE NEFROLOGÍA PEDIATRICA

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

YO _____ DOY
AUTORIZACIÓN DE QUE A MI HIJO/A _____ LE SEA
EXTRAIDA UNA MUESTRA SANGUÍNEA Y URINARIA CON EL FIN DE SER UTILIZADA EN EL
PROTOCOLO _____

CON MOTIVO DE INVESTIGACIÓN SOBRE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS Y TRATAMIENTO
DEL SÍNDROME NEFRÓTICO.

LAS COMPLICACIONES DE LA PUNCIÓN SON: HEMORRAGIA, HEMATOMA E INFECCIÓN
DEL SITIO DE PUNCIÓN.

FIRMA DEL PADRE

FIRMA DEL MÉDICO

ZACATECAS, ZACATECAS _____ DE _____ DEL 2014

12.LITERATURA CITADA

Academia Mexicana de Pediatría. Comité de Expertos en Nefrología. Síndrome Nefrótico en niños. Bol Med Hosp Infant Mex 2000; 59: 522-536.

Arrizabalaga P. El diafragma de filtración. Orientación diagnóstica y terapéutica en el Síndrome Nefrótico. Nefrología 2005; 25:361-367.

Atala A. Tissue engineering for the replacement of organ function in the genitourinary system. American Journal of Transplantation 2004; 58-73.

Audard V, Lang P, Sahali D. Pathogenie du síndrome nephrotique a lesions glomerulaires minimales. Medicine/Sciences 2008; 24: 853.858.

Azocar M. Síndrome Nefrótico congénito por mutación del gen de la Nefrina. Caso Clínico. Rev Chil Pediatr 2011; 82: 426-431.

Blanco R, Hernández A, Vallejo A. Los polímeros en medicina [en línea] documento electrónico fuente internet 2005. [fecha de consulta 25 marzo 2015]. Disponible en: <http://www.eis.uva.es/~macromol/curso05-06/medicina/contactenos.htm>.

Carhuapoma W, Santiago J. Caracterización de hidrogeles de quitosano-alcohol polivinílico obtenidos por radiación gamma. Revista Iberoamericana de Polímeros 2005; 6: 333-346.

Colorado AC, Agudelo CA, Moncada ME. Análisis de Biomateriales para uso en Ingeniería de Tejido de Piel. Ingeniería Biomédica 2010; 14: 11-23.

Comité de Nefrología, Sociedad Argentina de Pediatría. Consensus on treatment of nephrotic síndrome in childhood. Arch Argent Pediatr 2014; 112: 277-284.

Costa E, Pereira M, Mansur H. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked. *J Mater Sci: Mater Med* 2009; 20: 553-561.

Chuang WY, Young TH, Yao CH, Chiu WY. Properties of the poly(vinyl alcohol)/chitosan blend and its effects on the culture of fibroblast *in vitro*. *Biomaterials* 1999; 20: 1479-1487.

Da Sacco S, Lemley KV, Sedrakyan S, Zanusso I, Petrosyan A. A Novel Source of Cultured Podocytes. *PLoS ONE* 2013; 8: 1-15.

Davin JC, Rutjes NW. Nephrotic Syndrome in children: from Bench to Treatment. *International Journal of Nephrology* 2011; 8: 32-39.

Diéguez S. Bases moleculares de la barrera de filtración glomerular-síndrome nefrótico corticorresistente. Congreso de nefrología por internet 2003.

Deng M, Nair L, Nukavarapu S, Kumbar S, Jiang T, Weikel A, Krogman N, Allcock H, Laurencin C. In Situ Porous Structures: A Unique Polymer Erosion Mechanism in Biodegradable Dipeptide-based Polyphosphazene and Polyester Blends Producing Matrices for Regenerative Engineering. *Adv Funct Mater* 2011; 20: 2743-2957.

Dvir T, Timko B, Kohane D, Langer R. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nat Nanotechnol* 2011; 6:13-22.

Expósito Harris Ruth (2009). Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid.

Fukasawa H, Bornheimer S, Kudlicka K, Farquhar M. Slit Diaphragms Contain Tight Junction Proteins. *J Am Nephrol* 2009; 20: 1491-1503.

Gao W, Lai J, Leung S. Functional enhancement of chitosan and nanoparticles in cell culture, tissue engineering, and pharmaceutical applications. *Frontiers in physiology* 2012; 3: 1-13.

Gigante M, Piemontese M, Gesualdo L, Iolascon A, Aucella F. Molecular and Genetic Basis of Inherited Nephrotic Syndrome. *International Journal of Nephrology* 2011; 1-15.

Gipson DS, Massengill SF, Yao L, Nagaraj S, Smoyer WE, Mahan JD, Wigfall D, Miles P, Powell L, Lin JJ, Trachtman H, Greenbaum LA. Management of Childhood Onset Nephrotic Syndrome *Pediatrics* 2009; 12: 47-56.

Grimaldo D, Orjuela J, Cardozo C, Casadiego C, Covarrubias A. Hacia una nueva generación de biomateriales. *Rev Col Or Tra* 2010. Primera parte.

Hammerman M. Tissue engineering the kidney. *Kidney International* 2004; 63: 1195-1204.

Hahn D, Hodson EM, Willis NS, Craig JC. Corticosteroid therapy for nephrotic syndrome in children. *The Cochrane Library* 2015; 3: 1-2.

Harper S, Bates D. Glomerular Filtration Barrier and Molecular Segregation: Guilty as Charged?. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 2009-2011.

Hussain N, Zello A, Vasilevska-Ristovska J, Banh T, Patel V, Patel P, Battiston C, Hebert D, Licht C, Piscione T, Parekh R. The rationale and design of Insight into Nephrotic Syndrome: Investigating Genes, Health and Therapeutics (INSIGHT): a prospective cohort study of childhood nephrotic syndrome. *BMC Nephrology* 2013; 14: 1-11.

Ino J, Chevallier P, Letourneur D, Mantovani D, Le Visage C. Plasma functionalization of poly(vinyl alcohol) hydrogel for cell adhesion enhancement. *Biomatter* 2013; 3: 1-7.

Java A, Liszewski MK, Hourcade DE, Zhang F, Atkinson JP. Role of complement receptor 1 (CR1; CD35) on epithelial cells: A model for understanding complement-mediated damage in the kidney. *Molecular Immunology* 2015; 67: 584-595.

Jefferson JA, Nelson PJ, Najafian B, Shankland SJ. Podocyte Disorders: Core Curriculum 2011. *Am J Kidney Dis* 2011; 58: 666-677.

Jinchao M, Zhang B, Liu S, Xie S, Yang Y, Ma J, Deng Y, Wang W, Xu L, Li R, Yu C, Shi W. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) Inhibits Podocyte uPAR Expression and Reduce Proteinuria. PLoS ONE 2013; 8: 1-11.

Kandasamy Y, Smith R, Lumbers E, Rudd D. Nephlin – a biomarker of early glomerular injury. Biomarker Research 2014; 2 (21): 1-8.

Karimi A, Navidbakhsh M, Faghihi S. Fabrication and Mechanical Characterization of a Polyvinyl Alcohol Sponge for Tissue Engineering Applications. Perfusion 2014; 29: 231-237.

Kumar P, Welsh G, Sleem M, Menon R. Molecular and cellular events mediating glomerular podocyte dysfunction and depletion in diabetes mellitus. Frontiers in Endocrinology 2014; 5: 1-10.

Lennon R, Randles M, Humphries MJ. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. Frontiers in Endocrinology 2014; 5: 1-17.

León K, Santiago J. Propiedades antimicrobianas de películas de quitosano-alcohol polivinílico embebido en extracto de sangre de grado. Rev Soc Quím Perú 2007; 73: 158-165.

Londoño María, Jaramillo Juan Manuel, Sabater Roser, Vélez Juan Manuel. Dielectric Properties of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Prepared by Freezing/thawing Technique. Rev. EIA. Esc. Ing. Antioq 2012; 18: 105-114.

López Carrasquero F. Análisis conformacional de polímeros mediante espectroscopia infrarroja de polarización (DIR). Revista Iberoamericana de Polímeros 2003; 4: 48-64.

Miceli R, Kroeger PT, Wingert RA. Molecular Mechanisms of Podocyte Development Revealed by Zebrafish Kidney Research. *Cell Dev Biol* 2014; 3: 1-14.

Nakamura T, Ushiyama CH, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, Koide H. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1379-1383.

Neal C. Podocytes...What's under yours? (Podocytes and foot processes and how they change in nephropathy). *Frontiers in Endocrinology* 2015; 6: 1-11.

Park KD, Kwon IK, Kim YH. Tissue engineering of urinary organs. *Yonsei Medical Journal* 2000. 41: 780-788.

Peluffo EJ. (2012). Uso de Matrices Biodegradables Enriquecidas con PRP, para Restitución Inmediata de Volumen y Regeneración Tisular. Departamento de Cirugía. (Trabajo de investigación). Universidad Autónoma de Barcelona.

Pereira W, Brito-Melo G, Carneiro C, De Sousa D, Costa K, Tadeu F, Rocha-Vieira E, Marciano E, Simoes A. Increased Migratory and Activation Cell Markers of Peripheral Blood Lymphocytes in an Experimental Model of Nephrotic Syndrome. *Mediator of Inflammation* 2015: 1-11.

Pereira V, Queiroz de Arruda I, Stefani R. Active chitosan/PVA films with anthocyanins (Red Cabbage) as Time Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. *Food Hydrocolloids* 2014; 30: 1-9.

Petermann A, Krofft R, Blonski M, Hiromura K, Vaughn M, Pichler R, Griffin S, Wada T, Pippin J, Durvasula R, Shankland J. Podocytes that detach in experimental membranous nephropathy are viable. *Kidney International* 2003; 64: 1222-1231.

Raftery R, O'Brien F, Cryan S. Chitosan for Gene Delivery and Orthopedic Tissue Engineering Applications. *Molecules* 2013; 18: 5611-5647.

Ríos MP, Patiño G. Características del Síndrome Nefrótico Primario en edades no habituales en un hospital pediátrico de tercer nivel en Guadalajara, Jalisco, México. 2011; 68: 271-277.

Rosines E, Johkura K, Zhang X, Schmidt H, DeCambre M, Bush K, Nigam S. Constructing Kidney-like Tissues from Cells Based on Programs for Organ Development: Toward a Method of In Vitro Tissue Engineering of the Kidney. *TISSUE ENGINEERING* 2010. 16(8): 2441-2455.

San Andrés M, Chércoles R, De la Roja JM, Gómez M (2010). Factores responsables de la degradación química en los polímeros. Efectos provocados por la radiación lumínica sobre algunos materiales utilizados en conservación: primeros resultados. 263-307.

Segarra A, Carnicer C, Arbós A, Quiles M, Agraz I, Ostos E. Biomarcadores en el Síndrome Nefrótico: algunos pasos más en el largo camino. *Revista Nefrología* 2012; 32: 558-572.

Serrano Martínez JL. 2004 Espectroscopia infrarroja. Disponible en: http://www.upct.es/~minaees/espectroscopia_infrarroja.pdf.

Song JJ, Guyette JP, Gilpin SE, Gonzalez G, Vacanti JP, Ott HC. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat Med* 2013; 24: 1347-1356.

Sumrita B., Kumar A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomater* 2013; 3:1-12.

Tamayo A, Akbari M, Annabi N, Paul A, Khademhosseini A, Juncker D. Fiber-Based Tissue Engineer: Progress, Challenges and Opportunities. *Biotechnol Adv* 2013; 31: 669-687.

Uwaezuoke S. Steroid-sensitive nephrotic syndrome in children: triggers of relapse and evolving hypotheses on pathogenesis. *Italian Journal of Pediatrics* 2015; 41: 1-6.

Veron D, Villegas G, Kumar Aggarwal P, Bertuccio C, Jimenez J, Velazquez H, Reidy K, Abrahamson D, Moeckel G, Kashgarian M, Tufro A. Acute Podocyte Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-A) Knockdown Disrupts α v β 3 Integrin Signaling in the Glomerulus. *PLoS ONE* 2012; 7: 1-13.

Vicente Ozores Sara (2013). Nanocápsulas polisacáridicas como vehículos adyuvantes de vacunas. Departamento de farmacia y tecnología farmacéutica. (Tesis doctoral) Universidad de Santiago de Compostela.

Wei C, Moller C, Altintas M, Li J, Schwarz K, Zacchinga S, Xie L, Henger A, Schmid H, Rastaldi M, Cowan P, Kretzler M, Padilla R, Bendayan M, Gupta V, Nikolic B, Kalluri R, Carmeliet P, Mundel P, Reiser J. Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor. *Nature Medicine* 2008; 14: 55-63.

William DC. (2006). *Materials Science and Engineering: An Introduction*. (pp. 600-603)

Zambon JP, Magalhaes RS, Ko I, Ross LC, Orlando G, Peloso A, Atala A, Yoo JJ. Kidney regeneration: Where we are and future perspectives. *World J Nephrol* 2014; 24-30.

Zhang A, Huang S. Progress in Pathogenesis of Proteinuria. *International Journal of Nephrology* 2012; 1-14.

13.RESUMEN BIBLIOGRAFICO

Sara Paola Hernandez Martinez

Candidato para el grado de

Maestra en Ciencias con orientación en Inmunobiología

Tesis: SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE UN SOPORTE
CELULAR A BASE DE QUITOSANO, ALCOHOL POLIVINILICO Y
PROTEÍNAS DE ADHESIÓN DE LA MEMBRANA BASAL GLOMERULAR
PARA EL CULTIVO DE PODOCITOS

Campo de estudio: Ciencias Biológicas

Datos personales: Nacida en Zacatecas, Zacatecas el 13 de enero de 1986, hija de
Silvia Martínez Carrillo.

Licenciatura: Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de
Zacatecas. Grado obtenido: Título Químico Farmacéutico Biólogo.