



---

---

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA**

**CIBA-IPN TLAXCALA**

**OBTENCIÓN DE CÉLULAS RENALES A PARTIR  
DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS DE  
RATÓN Y SU APLICACIÓN EN UN MODELO  
MURINO CON LESIÓN RENAL.**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR  
EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:  
Mónica Maribel Mata Miranda**

**DIRECTORES DE TESIS:**

Dr. Raúl Delgado Macuil  
Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara

Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala; Abril 2017.



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizabal siendo las 12:00 horas del día 6 del mes de abril del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA Tlaxcala para examinar la tesis titulada:  
**Obtención de células renales a partir de células madre embrionarias de ratón y su aplicación en un modelo murino con lesión renal**

Presentada por el alumno (a):

**MATA**

Apellido paterno

**MIRANDA**

Apellido materno

**MÓNICA MARIBEL**

Nombre(s)

Con registro:

A	1	4	0	1	3	8
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

**DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

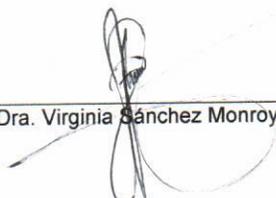
### LA COMISIÓN REVISORA

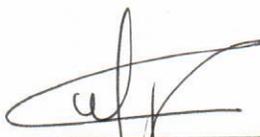
Directores de tesis

  
Dr. Raúl J. Delgado Macuil

  
Dr. David Guillermo Pérez Ishiwara

  
Dr. Marlon Rojas López

  
Dra. Virginia Sánchez Monroy

  
Dr. Miguel Ángel Villalobos López

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
Dra. María Myrna Solís Oba

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada  
Unidad Tlaxcala  
Dirección





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de Tlaxcala el día 7 del mes Abril del año 2016, el (la) que suscribe Mónica Maribel Mata Miranda alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología con número de registro A140138, adscrito a Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Raúl J. Delgado Macuil y cede los derechos del trabajo intitulado Obtención de células renales a partir de células madre embrionarias de ratón y su aplicación en un modelo murino con lesión renal, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección mmcmaribel@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Nombre y firma

## NOTAS DE AGRADECIMIENTO Y DEDICATORIAS.

*Este gran paso en mi vida lo he realizado al lado de mi esposo, quien me ha alentado en momentos de hastío y hartazgo; impulsándome a seguir adelante cada día. Gracias Gustavo, compañero de vida, de profesión y de logros.*

*Quiero hacer un agradecimiento especial a la Dra. Virginia Sánchez Monroy por guiarme en este sendero de la ciencia e impulsarme a realizar este doctorado, brindándome siempre su apoyo, enseñanzas y consejos.*

*Agradezco a mi familia, mis colaboradores en el laboratorio, y a mis maestros que me brindaron su apoyo desde el primer día, aún sin conocerme, me refiero a los doctores Guillermo Pérez Ishiwara, Raúl Delgado Macuil y Marlon Rojas López, gracias por su apoyo y sus enseñanzas.*

*Papá has estado en todos los momentos importantes de mi vida, y me dejaste a la mitad de esta aventura, este paso más ha culminado. Te dedico este logro, prometiéndote que me esforzare cada día más por ser mejor persona.*

# ÍNDICE

Lista de figuras.....	3
Lista de tablas.....	4
Lista de gráficas.....	4
Lista de abreviaturas.....	5
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	9
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN.....	11
Epidemiología.....	11
Clasificación de la Falla Renal.....	12
Terapias de la Enfermedad Renal.....	13
Medicina Regenerativa.....	14
Terapia Celular.....	15
Terapia celular con Células Madre.....	16
Embriología renal y factores nefrogénicos.....	17
Cisplatino como promotor de la Falla Renal.....	23
Espectroscopia vibracional.....	25
CAPÍTULO II ANTECEDENTES.....	27
CAPÍTULO III JUSTIFICACIÓN.....	30
CAPÍTULO IV OBJETIVOS.....	31
Objetivo general.....	31
Objetivos específicos.....	31
CAPÍTULO V METODOLOGÍA.....	32
Cultivo de Fibroblastos Embrionarios de Ratón (MEF).....	33
Arresto Celular de los MEF.....	34
Cultivo de Células Madre Embrionarias de Ratón (mESC).....	34
Diferenciación de mESC a células renales.....	35
Descripción Morfológica.....	35
Diseño, estandarización y validación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	35
Inmunocitoquímica y microscopia de fluorescencia.....	40
Espectroscopia vibracional.....	43
Tratamiento Espectral y Análisis multivariado.....	44
Modelo murino con lesión renal.....	44

CAPÍTULO VI RESULTADOS.....	50
Expansión de los fibroblastos embrionarios de ratón.....	50
Bloqueo del ciclo celular de los fibroblastos embrionarios de ratón. ....	50
Expansión de las células madre embrionarias de ratón.....	51
Descripción morfológica de las células renales obtenidas a partir de mESC a lo largo del proceso de diferenciación. ....	52
Extracción y cuantificación de RNA.....	53
Curvas de disociación de los genes amplificados.....	54
Validación.....	56
Evaluación de los cambios de expresión de los genes estudiados.....	56
Titulación de anticuerpos para la microscopía de fluorescencia. ....	61
Modelo murino con lesión renal.....	68
Análisis bioquímico en los grupos de estudio .....	71
Análisis de la mortalidad.....	74
Análisis histopatológico .....	75
CAPÍTULO VII DISCUSIÓN.....	78
CAPÍTULO VIII CONCLUSIONES .....	92
CAPÍTULO IX PERSPECTIVAS.....	94
ANEXOS.....	95
Anexo A.....	95
Producción del autor de los trabajos derivados de la tesis.....	95
Anexo B.....	99
Otros trabajos del autor desarrollados durante el periodo doctoral .....	99
Premios obtenidos durante el doctorado .....	108
BIBLIOGRAFÍA.....	110

## Lista de figuras

- Figura 1. Regulación de la nefrogenesis.
- Figura 2. Estrategia experimental.
- Figura 3. Obtención de muestras histopatológicas.
- Figura 4. Esquematización de la titulación de los anticuerpos primarios y secundarios.
- Figura 5. Línea del tiempo de los grupos de estudio.
- Figura 6. Administración del cisplatino.
- Figura 7. Toma y recolección de muestras sanguíneas.
- Figura 8. Obtención de muestras histopatológicas.
- Figura 9. Técnica histológica.
- Figura 10. Cultivo celular de fibroblastos embrionarios de ratón.
- Figura 11. Colonias de mESC de ratón sobre una monocapa de MEF.
- Figura 12. Cuerpos Embrionarios en diferentes etapas de diferenciación.
- Figura 13. Integridad del RNA.
- Figura 14. Curvas de disociación de los oligonucleótidos diseñados.
- Figura 15. Gel de los productos de PCR de los genes estudiados.
- Figura 16. Gráficas con los valores de CT de cada uno de los iniciadores ya estandarizados.
- Figura 17. Controles negativos durante la titulación en riñón de ratón.
- Figura 18. Controles positivos en riñón de ratón.
- Figura 19. Controles negativos durante la titulación en cultivos de mESC.
- Figura 20. Controles positivos en cultivos de mESC.
- Figura 21. Ausencia de proteínas renales en mESC.
- Figura 22. Inmunodetección de proteínas renales en CRD.
- Figura 23. Ausencia de pluripotencialidad en CRD.
- Figura 24. Espectros FTIR.
- Figura 25. Segunda derivada de los espectros FTIR.
- Figura 26. Análisis de Componentes Principales (PCA).
- Figura 27. Microfotografías representativas del sistema tubular.
- Figura 28. Microfotografías representativas de los glomérulos.

## Lista de tablas

- Tabla 1. Genes expresados en el desarrollo embrionario renal y en riñón adulto.
- Tabla 2. Factores que contribuyen a la nefrogenesis.
- Tabla 3. Asignación de bandas en el espectro ir comunes en muestras biológicas.
- Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para caracterizar la expresión génica de las CRD.
- Tabla 5. Resumen de los valores de expresión relativa en los genes estudiados.
- Tabla 6. Perfil bioquímico del grupo de estudio 1 (50mg/kg).
- Tabla 7. Perfil bioquímico del grupo de estudio 2 (35mg/kg).
- Tabla 8. Perfil bioquímico del grupo de estudio 3 (20mg/kg).
- Tabla 9. Perfil bioquímico del grupo de estudio 4 (18mg/kg).
- Tabla 10. Perfil bioquímico del grupo de estudio 5 (15mg/kg).
- Tabla 11. Perfil bioquímico de los grupos de estudio 72 horas posteriores a la inducción del daño renal.
- Tabla 12. Parámetros normales del perfil bioquímico.
- Tabla 13. Perfil bioquímico de los grupos de estudio.
- Tabla 14. Casos de mortalidad.

## Lista de gráficas

- Gráfica 1. Expresión relativa del gen *Oct4*.
- Gráfica 2. Expresión relativa del gen *SOX2*.
- Gráfica 3. Expresión relativa de *PAX2*.
- Gráfica 4. Expresión relativa de *WT1*.
- Gráfica 5. Expresión relativa de *Ksp*.
- Gráfica 6. Conglomerado de la expresión de los genes analizados.
- Gráfica 7. Promedios de los valores séricos de creatinina.
- Gráfica 8. Promedios de los valores séricos de BUN.
- Gráfica 9. Promedios de los valores séricos de glucosa.
- Gráfica 10. Mortalidad acumulada en los grupos de estudio.

## Lista de abreviaturas

<b>ABREVIATURA</b>	<b>DESCRIPCIÓN DE LA ABREVIATURA</b>
<b>BMP</b>	Proteína Morfogenética del Hueso; del inglés Bone Morphogenetic Protein
<b>CDDP</b>	Cis-diamino-dicloroplatino o cisplatino
<b>CT</b>	Ciclo umbral del inglés Cycle Threshold
<b>C<sub>T</sub>Pb</b>	CT producto del gen problema
<b>cDNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico complementario
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DMEM</b>	Medio Eagle modificado de Dulbecco de las ingles Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico; del inglés Deoxyribonucleic Acid
<b>EB</b>	Cuerpo embrionario del inglés Embryoid Body
<b>ER</b>	Expresión relativa
<b>ERC</b>	Enfermedad Renal Crónica
<b>ESC</b>	Células Madre Embrionarias; del inglés Embryonic Stem Cells
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos; del inglés Fibroblast Growth Factor)
<b>FR</b>	Falla Renal
<b>FRC</b>	Falla renal crónica
<b>FTIR</b>	Infrarroja por Transformada de Fourier del inglés Fourier transform infrared spectroscopy
<b>GDNF</b>	Factor Neurotrófico Derivado de la Glia; del inglés Glial cell-Derived Neurotrophic Factor
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento hepatocítico; del inglés Hepatocyte Growth Factor
<b>IDR</b>	Inducción del daño renal
<b>ip</b>	Intraperitoneal
<b>iPSC</b>	Células pluripotentes inducidas; de las ingles Induced Pluripotent Stem Cells
<b>IRCT</b>	Insuficiencia Renal Crónico Terminal
<b>LIF</b>	Factor inhibidor de leucemia; del inglés Leukaemia Inhibitory Factor
<b>MSC</b>	Células madre multipotenciales; del inglés Multipotent Stem Cells
<b>MEF</b>	Fibroblastos embrionarios de ratón; del inglés Mouse Embryonic Fibroblast
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana
<b>NTA</b>	Necrosis Tubular Aguda
<b>Oct4</b>	Proteína de unión octamérica 4
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PAX2</b>	Paired box 2
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfato
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa; del inglés Polymerase Chain Reaction

<b>RA</b>	Ácido retinoico; del inglés Retinoic Acid
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno; del inglés Reactive Oxygen Species
<b>RT-PCR</b>	Transcriptasa reversa de la reacción de la cadena de polimerasa; del inglés Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico; del inglés Ribonucleic Acid
<b>RNAm</b>	Ácido Ribonucleico mensajero
<b>SC</b>	Células madre; del inglés Stem cell
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>SOX2</b>	SRY-box 2
<b>SSEA1</b>	Stage Specific Embryonic Antigen 1
<b>SSI</b>	Solución Salina Isotónica
<b>STO</b>	S, SIM; T, 6-resistente a la tioguanina; O, resistente a la ouabaina
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral; del inglés Tumor Necrosis Factor
<b>VFG</b>	Velocidad de Filtración Glomerular
<b>WT1</b>	Tumor de Wilms; del inglés Wilms Tumor 1

## RESUMEN

Las enfermedades renales son un problema de salud mundial. En la actualidad, más de 2 millones de personas requieren terapias sustitutivas como diálisis o trasplante, sin embargo, dichos tratamientos están asociados con alta morbilidad y mortalidad, por lo que se han buscado nuevas estrategias de terapias enfocadas en la medicina regenerativa, buscando mejorar la funcionalidad renal.

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se cultivaron células madre embrionarias de ratón (mESC) las cuales fueron sometidas a un proceso de diferenciación de 20 días, en el transcurso de la diferenciación se analizó su morfología mediante microscopía óptica, así como su perfil génico a los días 0, 10, 15 y 20 de diferenciación mediante RTq-PCR, analizando los genes *Oct4*, *SOX2*, *PAX2*, *WT1* y *Ksp*; en los mismos días se realizó un análisis por espectroscopia vibracional FTIR; y al día 18 mediante inmunofluorescencia se estudió la expresión de *Oct4*, *SSEA-1*, *PAX2*, *WT1*, y E-cadherina. Finalmente se estandarizó un modelo murino con daño renal utilizando cisplatino, evaluando la aplicación de mESC como terapia celular, para lo cual se hicieron dos grupos de estudio, el grupo control fue tratado con solución salina isotónica y el grupo experimental recibió  $1 \times 10^6$  mESC, ambos grupos recibieron el tratamiento de acuerdo al grupo al que pertenecían a las 24 hrs, 7 y 13 días posteriores a la inducción del daño renal, evaluando la función renal mediante el análisis bioquímico de los niveles séricos de creatinina, BUN y glucosa a los 3, 12 y 20 días posteriores a la inducción del daño renal, obteniéndose muestras histopatológicas a los 5 y 20 días posteriores al daño renal.

Los resultados de esta investigación demostraron que se obtuvieron Células Renales Diferenciadas (CRD) de mESC, las cuales pasaron a través de las

diferentes etapas cronológicas del desarrollo embrionario del riñón de acuerdo al análisis por RTq-PCR e inmunofluorescencia. En cuanto al análisis de espectroscopia vibracional por FTIR, se mostraron bandas relacionadas con biomoléculas en los espectros de mESC y CRD, observándose diferencias distintas entre los linajes celulares y las etapas de maduración. El Análisis de Componentes Principales (PCA) obtenido de los espectros FTIR permitió caracterizar químicamente y estructuralmente las mESC y su proceso de diferenciación a CRD de forma rápida, sencilla y no invasiva. La evaluación de las mESC como terapia celular en los animales con daño renal, mostraron un aumento en la supervivencia desde etapas tempranas del tratamiento ya que en el grupo control la supervivencia a los 20 días posteriores a la inducción del daño renal fue de 70% y en el grupo experimental fue de 40%, observándose además en el grupo experimental cambios histológicos relacionados con regeneración tisular.

Concluyéndose que se obtuvieron CRD a partir mESC, las cuales pasaron a través de las diferentes etapas cronológicas del desarrollo embrionario del riñón. Además, la espectroscopia FTIR es una técnica no invasiva, rápida y precisa que junto con el PCA permite caracterizar químicamente y estructuralmente ambos tipos de células y también discriminar y determinar diferentes etapas a lo largo del proceso de diferenciación. Por último, concluimos que la terapia celular con mESC aumenta la supervivencia en un modelo murino con daño renal.

## ABSTRACT

Kidney diseases are a global health problem. Currently, over 2 million people require renal substitution therapies such as dialysis or transplant; however, these treatments are associated with high morbidity and mortality; therefore, new strategies of therapies focused on regenerative medicine have been developed, seeking to improve the renal function.

For the development of this research mouse Embryonic Stem Cells (mESC) were cultured, and underwent to 20 days of differentiation process, during the course of the differentiation its morphology was analyzed by optical microscopy, as well as its gene profile at days 0, 10, 15 and 20 of differentiation by RTq-PCR, analyzing *Oct4*, *SOX2*, *PAX2*, *WT1* and *Ksp* genes. At the same days, a FTIR vibrational spectroscopy analysis was performed. And at day 18 the expression of Oct4, SSEA-1, PAX2, WT1, and E-cadherin proteins were studied by immunofluorescence. Finally, a murine model with renal damage using cisplatin was standardized, evaluating the application of mESC as a cellular therapy, for which purpose two study groups were made, the control group was treated with isotonic salt solution, and the experimental group received  $1 \times 10^6$  mESC. Both groups received their treatment according to the group that they belonged at 24 hrs, 7 and 13 days after the induction of renal damage, evaluating renal function by biochemical analysis of serum levels of creatinine, BUN and glucose at 3, 12 and 20 days after the induction of renal damage, obtaining histopathological samples at 5 and 20 days after renal damage.

Our results prove that we generate Differentiated Kidney Cells (DKCs) from mESC, showing by RTq-PCR and immunofluorescence the obtention of DKCs, which passed through the different chronological stages of the embryonic kidney

development. Regarding to the analysis of FTIR vibrational spectroscopy, bands related to biomolecules were shown in mESC and DKCs spectra, differences between both cell lineages and maturation stages were observed. The Principal Component Analysis (PCA) obtained from the FTIR spectra allowed to characterize chemically and structurally the mESC and its differentiation process to CRD in a fast, simple and non-invasive way. The evaluation of mESC as a cell therapy in animals with renal damage showed an increase in survival from early stages of treatment since in the control group survival at 20 days after induction of renal damage was 70% and in the experimental group was 40%. Finally, histological changes related to tissue regeneration were also observed in the experimental group.

In conclusion, we obtained DKCs from mPSCs, which passed through the chronological stages of embryonic kidney development. Moreover, FTIR spectroscopy resulted in a non-invasive, rapid and precise technic that together with Principal Component Analysis allows to characterize chemical and structurally both kind of cells and also discriminate and determine different stages along the cell differentiation process. Finally, we conclude that cell therapy with mESC increases survival in a murine model with renal damage

## CAPÍTULO I

### **INTRODUCCIÓN.**

El riñón realiza funciones fisiológicas esenciales tales como la excreción de productos de desecho del metabolismo, funciones homeostáticas, síntesis de glutatión, amoniogenesis, catabolismo de las hormonas peptídicas y factores de crecimiento, además de la producción y regulación de múltiples citoquinas implicadas en la regulación inflamatoria e inmunológica (1, 2). Por lo que el daño estructural y funcional de dicho órgano conocida como Enfermedad Renal (ER) o Falla Renal (FR) conlleva una serie de alteraciones principalmente relacionadas con la excreción de productos de desecho.

Se ha considerado como una patología de alto costo, por generar un fuerte impacto económico sobre las finanzas del Sistema de Salud y por causar un dramático efecto sobre la calidad de vida del paciente y su familia, incluidas las repercusiones laborales.

### **Epidemiología**

Las enfermedades renales son actualmente un problema de salud pública a nivel mundial y provocan consecuencias devastadoras en la sociedad. Globalmente, la tasa de mortalidad se encuentra entre el 50 y 80%. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en el 2005 se presentaron 58 millones de muertes en todo el mundo, y de ellas, 35 millones son atribuidas a enfermedades renales; Por otro lado, más de 2 millones de personas se encuentran en terapia de reemplazo renal, pero esto probablemente represente menos del 10% de los que la necesitan (2, 3, 4). Al respecto, la Fundación Mexicana del Riñón ha reportado que en México existen actualmente 8.3 millones de personas con insuficiencia renal leve, 102 mil personas con insuficiencia renal crónica y 37,642 personas con tratamiento continuo de diálisis (5).

En México se estima una incidencia de insuficiencia renal crónica de 377 casos por millón de habitantes y una prevalencia de 1,142. Esta tendencia epidemiológica se correlaciona con el aumento de la longevidad y de la prevalencia de las condiciones

que causan complicaciones renales, como la enfermedad cardiovascular, la hipertensión arterial y la diabetes mellitus (6).

### **Clasificación de la Falla Renal**

Habitualmente la Enfermedad Renal o Falla Renal (FR) se ha dividido en aguda y crónica, y estas a su vez abarcan una gran cantidad de etiologías. Cuando la elevación de productos nitrogenados o bien las alteraciones en los parámetros urinarios se desarrollan en el plazo de horas o días se habla de un proceso agudo; por otro lado, si la evidencia de enfermedad renal se extiende a varias semanas representa un proceso rápidamente progresivo (subagudo) y, por último, cuando es conocido desde meses o años llevará un curso crónico, pero que puede asociarse con exacerbaciones agudas. (6)

No existe una definición universal de Falla Renal Aguda (FRA), en general, todas las definiciones de insuficiencia renal aguda se basan en el deterioro inmediato de la función renal y el descenso brusco del filtrado glomerular, considerándose la elevación de los productos nitrogenados en sangre, como el marcador universal de la insuficiencia renal aguda independiente de su etiología (6).

Por otra parte, la Falla Renal Crónica (FRC), se define como la presencia de un daño renal estructural con una velocidad de filtración glomerular (VFG) normal o levemente reducida (VFG 60-90 mL), independientemente de la etiología subyacente. La evidencia del daño estructural potencialmente progresivo puede derivar de un estudio histológico o imagenológico, o de las alteraciones persistentes del examen de orina por un plazo superior a tres meses, particularmente la presencia de albuminuria. Las guías de la *Kidney Disease Improving Global Outcome* KDIGO han apoyado la expresión “Enfermedad Renal Crónica” (ERC) para referirse a todo el espectro de la enfermedad que ocurre luego del inicio del daño renal (7).

La etiología de lesión renales es muy amplia, actualmente, las principales causas de ERC son en primer lugar la diabetes y luego la hipertensión arterial, que en conjunto representan aproximadamente el 60% de los pacientes en diálisis crónica

y por otro lado la causa más frecuente de lesión renal aguda es la necrosis tubular (7, 8).

La forma más severa de FRA es la Necrosis Tubular Aguda (NTA) y se caracteriza por la lesión subletal y letal de las células tubulares, principalmente en las porciones distales del túbulo proximal y en la porción ascendente gruesa del asa de Henle. En la fisiopatología de la isquemia renal aguda están implicados factores hemodinámicos, lesión tubular y procesos inflamatorios (6).

### **Terapias de la Enfermedad Renal**

Las terapias actuales para la enfermedad renal incluyen estrategias de reemplazo de la función, dentro de las cuales se encuentran el trasplante y la diálisis, que puede ser hemodiálisis o diálisis peritoneal (9).

La hemodiálisis es el procedimiento terapéutico especializado que utiliza como principio físico-químico la difusión pasiva de agua y solutos de la sangre a través de una membrana artificial, y por su parte en la diálisis peritoneal se utiliza una membrana peritoneal. Ambas se asocian con una alta morbilidad y mortalidad. Por otro lado, el trasplante renal, se refiere al procedimiento terapéutico basado en la tolerancia inmunológica mediada por fármacos, en el que se emplean riñones de donadores vivos o de cadáver, por lo que dicho procedimiento se encuentra limitado a la cantidad de donadores, al rechazo inmune y a la necesidad de tratamientos inmunosupresivos de por vida. Aunque se ha considerado que el riñón es un órgano incapaz de regenerarse, se están buscando en la actualidad nuevos tratamientos que mejoren la función renal (9, 10).

Cuando se produce un daño renal crónico suficientemente extenso, sea cual sea su origen y su causa, la función renal va en decremento de forma inexorable hasta llegar a la Insuficiencia Renal Crónica Terminal (IRCT), sin que existan tratamientos capaces de revertir el proceso (11). Aunque se ha demostrado que cuando se produce un daño en un tejido adulto, existe un proceso de renovación celular, en determinados órganos dicho proceso es facilitado por la presencia de células madre o progenitoras, mismas que permiten la renovación celular periódica y/o la regeneración cuando se produce algún daño tisular. Sin embargo, el riñón a diferencia otros órganos como el hígado, es de regeneración lenta. Incluso se

consideró durante años como un órgano incapaz de regenerarse. De hecho, la lesión renal es seguida por una hipertrofia regenerativa más que por el desarrollo de nuevas nefronas, dado que no se forman nuevas nefronas después de las 36 semanas de gestación (11, 12). Se ha demostrado que después de una lesión, el riñón tiene una respuesta regenerativa que precede a la restauración de la función renal, la regeneración renal es frecuentemente inadecuada, aproximadamente en el 40% de los pacientes falla por completo la restauración de la función, y el 10% de estos pacientes requiere un reemplazo renal terapéutico después de 5 años de la lesión (13).

A pesar de los avances en el entendimiento de la FRA y las terapias sustitutivas, la calidad de vida del paciente con daño renal va en decremento y la enfermedad *per se* conlleva una serie de complicaciones. Por lo que dado el aumento de la tasa de insuficiencia renal en etapa terminal y a las pocas alternativas para su tratamiento, se han empezado a investigar nuevas alternativas, enfocándose en la medicina regenerativa, buscando que dichas estrategias mejoren la calidad de vida del paciente, disminuyan las complicaciones y reduzcan los gastos de las instituciones de salud.

### **Medicina Regenerativa**

Los intentos de la medicina regenerativa de reparar, reemplazar o regenerar tejidos dañados por enfermedades o lesiones, ha sido una gran utopía en el campo de la investigación. Durante las últimas décadas, esta visión se ha hecho factible y se ha introducido recientemente en la práctica médica.

La medicina regenerativa se remonta al cultivo celular *in vitro* con el subsiguiente trasplante de células e ingeniería de tejidos. Alexis Carrel (1873-1944) es considerado como el fundador de la medicina regenerativa debido a su trabajo de cultivo tisular realizado en 1912, en el que colocó pequeños fragmentos de tejido cardíaco de embriones de pollo en un medio nutriente fresco, observando que cada 48 hrs el tejido se duplicaba en tamaño, logrando mantenerlo en cultivo durante 34 años (14,15).

El proceso de regeneración es esencial para muchos organismos y, de diversas maneras, la medicina regenerativa se ha convertido en la rama líder de la investigación biomédica y la práctica clínica, debido a sus implicaciones para el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas (16).

El término medicina regenerativa incluye la creación artificial de tejidos y órganos, haciendo referencia al conjunto de procesos destinados a reparar o reemplazar un tejido o función de un órgano mediante la estimulación o inducción de su propia auto-regeneración, proporcionando un tratamiento terapéutico (17). Aunque estudios recientes han demostrado que el cuerpo humano tiene un sistema endógeno de regeneración a través de células madre (SC, Stem Cells), en ocasiones éstas son insuficientes para lograr la regeneración total y restauración de la función (18).

De manera general, la medicina regenerativa engloba dos estrategias terapéuticas: las fundamentadas en el uso de células vivas o terapia celular y, la basada en ingeniería tisular utilizando diferentes andamiajes (scaffolds) con matrices o materiales biocompatibles que solos o en combinación dan soporte y facilitan la reparación del daño tisular (17,18).

### **Terapia Celular**

La terapia celular es una de las disciplinas de la medicina regenerativa complementando a la bioingeniería; depende de técnicas de cultivo de células y tejidos con la finalidad de expandir células específicas que reemplazarán estructuras morfológicas, tejidos y funciones (19).

Por definición, el principal componente o principio activo de una terapia celular es la propia célula, mientras que el excipiente estaría representado por los factores de crecimiento y/o biomateriales que faciliten la diferenciación o integración estructural de las células. Este componente celular puede estar integrado por células maduras o por células indiferenciadas como las células madre embrionarias y las células madre adultas (16).

## **Terapia celular con Células Madre**

Las SC por definición, se caracterizan por presentar auto-renovación y potencialidad, particularidades que les permite dar lugar a más SC y diferenciarse en diversos linajes celulares en condiciones apropiadas. Debido a estas características, las SC han sido consideradas como el origen de la vida de un organismo y consecuentemente una posible fuente de reemplazo celular, convirtiéndose en una innovación biológica, debido a que a partir de éstas se pueden obtener diferentes células, tejidos y órganos (20).

Existen dos tipos principales de SC, embrionarias y adultas. Las células madre embrionarias (ESC, Embryonic Stem Cells) de acuerdo a su potencialidad, se pueden considerar totipotentes y pluripotentes, las cuales pueden diferenciarse en las tres líneas germinales (endodermo, ectodermo y mesodermo). Las SC no embrionarias o adultas, son multipotentes y unipotentes, es decir, su potencial de diferenciación es muy limitado (18, 20).

Uno de los principales atractivos al utilizar ESC como estrategia terapéutica, es su característica propia de transdiferenciación o conversión del linaje, lo que se refiere a la posibilidad de diferenciarse en un tipo celular específico (21, 22), no sólo morfológicamente, sino también de forma funcional, lo que las hace una fuente de reemplazo celular atractiva, otra característica es su baja inmunogenicidad, que ofrece la posibilidad de evitar complicaciones al utilizarlas cuando son reintroducidas como agente terapéutico (19, 23), así como su capacidad de auto renovación ilimitada, debida a la actividad de la telomerasa (9).

La combinación de estas características las hace tomar presencia en la medicina regenerativa, ya que pueden formar las tres líneas germinales y a partir de ellas puede dirigirse su diferenciación hacia células pancreáticas, hematopoyéticas, motoneuronas, neuronas, riñones, entre otras. La habilidad para diferenciar selectivamente una ESC depende en parte de los factores de diferenciación o de crecimiento mimetizando el ambiente particular del linaje celular al cual se pretende diferenciar (23).

## Embriología renal y factores nefrogénicos

La medicina regenerativa se basa en el entendimiento del desarrollo normal de cualquier órgano, es decir, el entender las bases moleculares de la organogénesis renal nos abre una gran ventana de investigación para el desarrollo una terapia regenerativa en enfermedades renales.

El riñón es un órgano complejo que está formado por diversos tipos celulares, por lo que su generación *in vitro* requiere de una estrategia complicada. En el riñón de la rata se encuentran aproximadamente 30, 000 nefronas en cada riñón. Los componentes esenciales de la nefrona incluyen: el corpúsculo renal (glomérulo y la capsula de Bowman), los túbulos y el espacio intersticial (13).

Al día 6.5 del desarrollo embrionario murino, se establece la señal de la Proteína Morfogenética del Hueso 4 (BMP4) a lo largo del axis próximo-distal del embrión, BMP4 es requerida para la gastrulación y el desarrollo de las líneas germinales, aunque su intervención aún no se ha establecido con precisión, sin embargo se ha reportado que en cultivo, BMP4 induce factores de transcripción, moléculas de señalización y proteínas de adhesión celular que se expresan durante el desarrollo del mesodermo en el embrión (9).

La formación del riñón está dada por la recapitulación ontogénica de tres estructuras: Pronefros, Mesonefros y Metanefros. Mismas que se originan a partir del mesodermo intermedio. Las dos primeras estructuras son transitorias pero necesarias para la formación del riñón definitivo, el pronefros y mesonefros involucionan *in útero*, el metanefros se ubica en la porción más caudal y es el que dará lugar al riñón adulto (24, 25).

Por lo tanto, la organogénesis del riñón adulto, ocurre principalmente en tres eventos: 1) El paso de mesodermo intermedio a mesénquima metanéfrico. 2) la ramificación de la yema ureteral, ocasionada por la síntesis de condroitin sulfato y el procesamiento de condroitin sulfato glucosaminoglucanos, 3) Contacto de la yema ureteral con el blastema metanéfrico, induciéndose ambos recíprocamente a través de moléculas solubles sintetizadas por el mesénquima, mediante un contacto

célula-célula y célula-matriz extracelular, para posteriormente madurar del tejido metanéfrico en tejido renal adulto (25, 26).

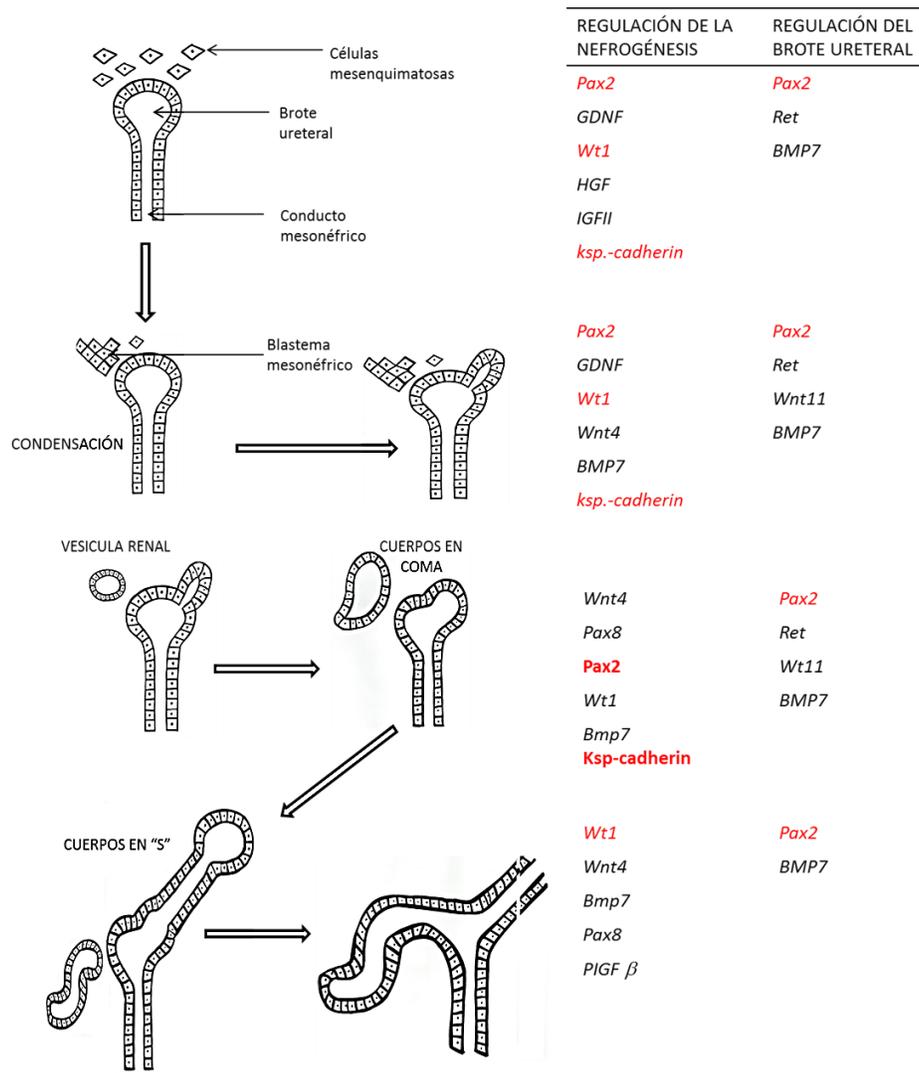
Las subsecuentes ramificaciones de la yema ureteral y su asociación con el mesénquima definirá las gruesas estructuras del riñón como los cálices mayores y menores, así como las ramificaciones distales de los conductos ureterales que formaran el sistema colector del riñón. Conforme los conductos se van alargando el mesénquima metanéfrico se va condensando alrededor, por otro lado, cada grupo de tejido epitelial se va elongando hasta formar los cuerpos en “coma” y los cuerpos en “S” y estos a su vez continúan alargándose hasta fusionarse con las ramificaciones de la yema uretral en su extremo distal (26).

Para la maduración del tejido metanéfrico, la yema ureteral induce al mesénquima a su diferenciación en un tejido epitelial (epitelio tubular glomerular); esta transición de mesénquima a epitelio, estaba gobernado por factores de crecimiento tales como factor de crecimiento hepatocítico (HGF), proteína morfogenética del hueso 7 (BMP7), entre muchos otros. Por tanto, el desarrollo renal en los mamíferos requiere de un proceso de conversión de las células del mesénquima metanéfrico en células epiteliales polarizadas (11), durante la interacción yema ureteral – mesénquima metanéfrico comienzan a expresarse los genes *WT1*, *PAX2*, *six-2*, *gdnf* y *wnt-4* (14). Produciéndose posteriormente el crecimiento y la ramificación del uréter dentro del mesénquima renal, alrededor de la punta de los brotes ureterales, las células mesenquimáticas se agrupan, realizándose un proceso llamado condensación, posteriormente, cada grupo compuesto por 100 células aproximadamente forman una vesícula la cual evoluciona a la forma de “coma” y luego a la forma en “S”, ambas precursoras de la forma glomerular definitiva. La hendidura inferior de los cuerpos en forma de “S” es penetrada por precursores mesangiales y endoteliales, los cuales eventualmente se diferencian para dar origen a los capilares glomerulares y al mesangio glomerular. Como resultado del proceso nefrogénico, el mesénquima metanéfrico dará origen a las nefronas, diferenciándose en túbulos proximales, asa de Henle y fibroblastos intersticiales, mientras que el brote ureteral y sus ramificaciones dan origen al epitelio de los túbulos colectores (24, 25).

Subyacentes a estos fenómenos inductivos se encuentran los fenómenos de expresión génica diferencial, responsables de la expresión de las moléculas inductoras y de aquellas necesarias para la función renal: transportadores de membrana, receptores, etcétera, a la fecha se han descrito más de 250 genes que podrían desempeñar algún papel en el desarrollo del riñón (27). En la tabla 1 se muestran los genes expresados a lo largo del desarrollo embrionario renal, así como en el riñón adulto.

Los genes *Lim-1*, y *PAX2*, parecen operar en etapas previas al inicio del desarrollo del riñón propiamente dicho ya que se encargan de marcar el territorio nefrogénico, así como el desarrollo del mesénquima metanéfrico. Una vez formado el mesenquima, este secreta GDNF (Factor Neurotrófico Derivado de la Glia), induciendo al conducto de Wolff, de donde nacerá yema uretral, la cual como se ha descrito anteriormente invade el blastema metanéfrico, y comienza su elongación y ramificación (27).

El papel de *PAX2*, en el desarrollo del riñón no sólo se limita a estas etapas tempranas de especificación del territorio nefrogénico, sino que también parece desempeñar papeles importantes en etapas posteriores (mesonefros y metanefros), como sugiere su expresión en estructuras intermedias del desarrollo de la nefrona, como los cuerpos en “coma” y en “S” (24, 27). Por otro lado, el gen supresor de tumores de Wilms (*WT1*) es el primer marcador que se detecta en el desarrollo renal expresándose inicialmente en el mesodermo intermedio. Existen tres fases en las que la expresión de *WT1* es crucial, estas son: desarrollo inicial del metanefros, en la transición del mesénquima al epitelio renal y en los podocitos maduros, por lo que *WT1* mantiene su expresión relativamente continua a lo largo de la organogénesis renal, siendo su pico en el momento en que la yema uretral entra en contacto con el metanefros (25), además se localiza en las regiones distales de los cuerpos en “coma” y en “S”, los cuales formaran los podocitos de los glomérulos, por lo que también se puede detectar la expresión de *WT1* en los podocitos en los que también se detecta la expresión del gen *nephrin*, mismo que codifica para una proteína de adhesión celular producida por las células epiteliales glomerulares (9, 28) (Figura 1).



**Figura 1. Regulación de la nefrogenesis.** Participación de los principales genes durante el desarrollo embrionario del riñón. En rojo se muestran los genes que se serán estudiados en este proyecto.

Otra familia importante en el desarrollo embrionario del riñón, son las proteínas morfogenéticas del hueso 2 (BMP), BMP2 actúa como un potente inhibidor de la ramificación del brote ureteral, restringiendo la ramificación de la parte terminal de la yema; por otro lado, la expresión de BMP4 en el estroma, alrededor de la yema ureteral y a lo largo del saco de la yema ureteral previene la formación temprana de la yema ureteral y la bifurcación antes de que invada el mesénquima; por su parte BMP7 guía a los grupos de células mesenquimales, expresándose en el conducto de Wolf, en el mesénquima metanéfrico, en los agregados pretubulares durante su epitelización y, en el adulto, en los podocitos (27) (Figura 1).

Conforme las nefronas se van formando, expresan factores de transcripción como PAX2 y Hoxa-11, además secretan Wnt-4, factor que actúa en un circuito autócrino para estimular su propia síntesis, ya que es requerido para que las células mesenquimales se diferencien en epitelio, por lo que wnt-4 se expresa exclusivamente en las células mesenquimales condensadas (27).

**TABLA 1. GENES EXPRESADOS EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO RENAL Y EN RIÑÓN ADULTO**

LOCALIZACIÓN	GENES
Territorio nefrogénico	<i>Lim-1, PAX2</i>
Especificación del mesodermo nefrogénico	<i>EYA1</i>
Cuerpo ureteral	<i>Claudin 3, 4, 7,</i>
Mesenquima metanéfrico	<i>WT1, PAX2, GDNF, Wnt-4 FOXc1, SOX2, HOXA 10</i>
Ramificación del cuerpo ureteral	<i>Wnt9b</i>
Transición del mesenquima a epitelio, mesenquima metanéfrico y progenitores de las nefronas.	<i>Wnt4, Wnt9b</i>
Inducción de la nefrogenesis y mesenquima metanéfrico.	<i>Wnt5a</i>
Túbulos proximales progenitores	<i>Cadherin-6</i>
Túbulos distales progenitores	<i>E-cadherin</i>
Cuerpos en S	<i>VEGF</i>
Células epiteliales glomerulares	<i>PODXL</i>
Podocitos	<i>WT1</i>
Epitelio tubular	<i>E-cadherin</i>
Túbulos proximales	<i>AQP1</i>
Túbulos contorneados distales	<i>SLC12A3</i>
Túbulos colectores	<i>AQP3</i>
Membrana basolateral de las células epiteliales tubulares.	<i>Ksp</i>

Es importante destacar que los embriones de ratón en los que se realiza la ablación genética de PAX2 no desarrollan riñones, uréteres, ni tracto genital; a consecuencia de ello los animales mueren en el primer día de vida extrauterina. (24, 29). De igual forma, los ratones mutantes nulos de *WT1* carecen de riñones, posiblemente porque el uréter no se desarrolla y no envía señales al mesénquima metanéfrico, y los ratones mutantes nulos del gen *BMP7* inician la tubulogénesis, pero ésta se interrumpe y no llegan a formar nefronas, o lo hacen en un número muy reducido (27).

Los factores de crecimiento, son morfógenos producidos en el riñón embrionario y se encargan de modular la proliferación y la diferenciación celular, así como la morfogénesis (24). Entre ellos se ha reportado la activina, la cual en cultivo refuerza la diferenciación de las ESC hacia mesodermo, y dado que el origen embriológico del riñón es mesodermo, es de vital importancia conducir la diferenciación de las ESC hacia mesodermo, además en combinación con el ácido retinoico (RA), *BMP7* y *GDNF* aumenta la expresión génica de *PAX2* y *WT1*, mismos que son esenciales para el desarrollo del mesodermo, además de que como ya se ha mencionado son genes esenciales en la regulación de la nefrogenesis y del brote ureteral, incluyendo la diferenciación ductal y del mesénquima (28), por otro lado el *GDNF* secretado por el mesénquima metanéfrico es el responsable de la formación de la yema ureteral y de su sucesiva ramificación. De hecho, la aplicación local de *GDNF* es capaz de inducir yemas ureterales ectópicas (24, 27). Y como ya se ha comentado *HGF* participa en la maduración del mesénquima metanéfrico (11).

Recientemente, se ha propuesto que *BMP7* podría colaborar con *FGF-2* (factor de crecimiento derivado de fibroblastos) en el control del desarrollo del riñón, previniendo la apoptosis del mesénquima renal. Sin embargo, *BMP7* y *FGF-2* tanto independientemente como en combinación, parecen inhibir la tubulogénesis. *BMP7* y *FGF-2* colaborarían en el mantenimiento de una población celular mesenquimática indiferenciada en la zona nefrogénicamente activa (27). En la tabla 2 se citan algunos de los principales factores que contribuyen a la nefrogénesis aunque la lista crece continuamente (24).

**TABLA 2. FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA NEFROGÉNESIS**

FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN	FACTORES DE CRECIMIENTO
WT1	EGF
PAX2	HGF
Emx 2	BMP2 BMP7
BF 2	GDNF
Hox a 11 7 Hox d 11	TGF- $\beta$
Fox c / Fox c2	PDGF- $\beta$

Para el desarrollo de este trabajo de investigación, es necesario desarrollar un modelo murino con daño renal, con la finalidad de poder valorar en el transcurso del tiempo con la patología implementada, los efectos de la terapia celular con la implantación de ESC, evaluando cambios bioquímicos (urea, creatinina y productos nitrogenados) y morfo-estructurales (Histopatológicos).

Dado que la etiología de la inducción de la insuficiencia renal es múltiple se han desarrollado diferentes modelos animales de FR, imitando las condiciones clínicas de este padecimiento, entre los cuales se encuentra el uso de glicerol en una dosis intramuscular, imitando la falla renal producida por una rabiomiolisis; el pinzamiento de la arteria renal izquierda durante una hora seguida de reperfusión, suponiendo cambios hemodinámicos; así como el uso de drogas como la administración intramuscular gentamicina, y la inyección intraperitoneal (ip) de cisplatino, los cuales imitan la FR secundaria a la administración clínica de los fármacos (30). Por lo que, de acuerdo a la viabilidad de la administración intraperitoneal de cisplatino en ratones y a las características del mismo fármaco, en este trabajo de investigación se utilizó este agente como promotor de la FR.

### **Cisplatino como promotor de la Falla Renal**

La molécula cis-diamino-dicloroplatino o cisplatino (CDDP) fue sintetizada por Michel Peyrone en 1845, y posteriormente sus efectos antineoplásicos fueron descubiertos en 1965 por Barnett Rosenberg Durant, quien se encontraba realizando estudios de corrientes eléctricas y su papel en la división celular en *Escherichia coli*, observando que la división celular se inhibía por la producción de

CDDP procedente de los electrodos de platin (31). Este compuesto inorgánico, neutro, se encuentra formado por dos grupos cloro, dos grupos amino y una molécula de platino en el centro de la estructura (32).

Desde su descubrimiento y a la fecha se ha considerado como un agente antineoplásico efectivo en el tratamiento de varios tumores sólidos, incluyendo cáncer de ovario, cérvix, cuello, pulmón, endometrio, entre otros, (33) sin embargo, a pesar de su potente actividad antitumoral, su uso en la clínica está limitado debido a los efectos secundarios indeseables como la nefrotoxicidad, la cual resulta de la lesión a las células epiteliales del túbulo renal, que puede manifestarse como una FRA o como una insuficiencia renal crónica (34).

Se ha demostrado que el CDDP se acumula preferentemente en las células de los túbulos proximales renales y sus nefrotóxicos se relacionan con los transportadores de cationes orgánicos (33, 35). Durante mucho tiempo se ha reconocido que el CDDP provoca FRA inducida por nefrotoxinas y otros mecanismos, las células tubulares renales sufren lesiones citotóxicas, que van desde leves cambios subletales hasta una muerte necrótica catastrófica que se caracteriza por la inflamación y ruptura de las células y la activación de una respuesta inflamatoria (35).

Los efectos tóxicos *in vitro* del CDDP en células tubulares renales han sido demostrados en numerosos estudios, y son múltiples los mecanismos que inducen la nefrotoxicidad, entre ellos se encuentran los siguientes:

- a) Induce daños en el DNA, al unirse con la posición N7 de las guaninas y de las adeninas, formándose aductos o puentes de unión entre guaninas adyacentes (cis-GG). Estas uniones tienen lugar entre guaninas de la misma cadena de ADN o intracatenarias, así como entre guaninas de distintas cadenas de ADN. Su toxicidad se asocia mayoritariamente a las uniones intracatenarias (32).
- b) Forma especies reactivas del oxígeno (ROS), demostrándose que el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), y el radical hidroxilo (OH) están involucrado en la inducción de la nefrotoxicidad (33).

- c) Induce la cascada de la inflamación, algunas citosinas y quimiocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$ , MCP-1 y la proteína inflamatoria de macrófagos (MCP-1) están reguladas positivamente en los riñones durante la nefrotoxicidad inducida con CDDP (36).
- d) Provoca disfunción mitocondrial, activa caspasas, llevando a la muerte celular por necrosis o por apoptosis dependiendo de la concentración del fármaco.

### **Espectroscopia vibracional**

De acuerdo a los antecedentes bibliográficos, el seguimiento a lo largo de la diferenciación de ESC a células renales, se ha enfocado en el uso de técnicas de PCR e inmunofluorescencia, sin embargo, en este trabajo de investigación se empleó la técnica de espectroscopia vibracional.

Actualmente existen técnicas modernas basadas en la espectroscopia vibracional, como Raman e infrarrojo, que proporcionan información estructural importante sobre la composición molecular y cambios estructurales en una muestra (37).

La espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), se basa en la absorción de la radiación con longitud de onda entre 2.5  $\mu\text{m}$  y 25  $\mu\text{m}$ , la cual es equivalente a (4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ ) números de onda; aprovechando las propiedades intrínsecas de la materia para generar vibraciones de sus enlaces a diferentes frecuencias de luz infrarroja. En consecuencia, muchas macromoléculas biológicas importantes como los ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, proteínas, tienen un modo vibracional característico y bien definido; mismos que dan origen a bandas de grupos funcionales claramente identificados en el espectro infrarrojo (IR), los cuales nos brindan información importante y que al analizar el espectro se puede detectar, identificar, cuantificar y determinar la estructura química específica de algunas moléculas (37, 38).

Además, se ha demostrado que el espectro infrarrojo de una proteína provee una riqueza en la información de la estructura, medio ambiente del esqueleto de una proteína y de las cadenas laterales de los aminoácidos, por lo cual es una

herramienta muy útil en la investigación de la estructura y plegamiento de las proteínas (39).

Por todo lo anterior, la espectroscopia FTIR ha sido usada para estudiar variaciones entre las células normales y las células cancerosas, células apoptóticas y células necróticas, entre otras (37), además se ha reportado el uso de microscopia FTIR para la detección de SC multipotentes y pluripotentes (38).

En general el uso de esta técnica de microscopia vibracional correlaciona y complementa la información que proveen los métodos de biología molecular e inmunocitoquímica convencionales, de una forma rápida y sin alterar la muestra biológica (38).

La asignación de bandas en el espectro IR de acuerdo a la literatura se presentan en la tabla 3, es menester citar que la banda más prominente en el espectro biológico es la amida I, banda que surge del estiramiento del enlace C=O y la flexión N-H de proteínas. Sin embargo, la interpretación de la información de las proteínas en esta región del espectro debe hacerse con precaución, debido a la contaminación de los espectros del vapor de agua y la distorsión a través de la luz.

**TABLA 3. ASIGNACIÓN DE BANDAS EN EL ESPECTRO IR COMUNES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS**

<b>Banda máxima (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Asignamiento de Banda</b>
~2962	C-H Tensión máxima de lípidos y proteínas
~2923	C-H Tensión asimétrica de lípidos y proteínas
~2850	C-H Tensión simétrica de lípidos y proteínas
~1743	C=O Tensión de esteres lipídicos
~1685	Estructura secundaria de los giros de la proteína β
~1654	Estructura secundaria de α-helices
~1635	Estructura secundaria de la proteína β-plegada
~1554	Absorbancia de proteínas en general
~1458	Grupos metilo y metileno de lípidos y proteínas
~1396	Tensión de las cadenas laterales COO <sup>-</sup>
~1238	P = O tensión asimétrica de los grupos fosfodiéster PO <sub>2</sub> a partir de moléculas fosforiladas
~1080	P = O tensión simétrica de los grupos fosfodiéster PO <sub>2</sub> de moléculas fosforiladas, y glucógeno
~1153	C-O vibraciones de glicógeno y otros carbohidratos
~1050	C-O vibraciones de glicógeno y otros carbohidratos
~1022	C-O vibraciones de glicógeno y otros carbohidratos
~995	C-O Tensión de la cadena de ribosa de RNA y otros carbohidratos
~950	C-C vibraciones de ácidos nucleicos

## CAPÍTULO II

### **ANTECEDENTES**

Como se ha mencionado con anterioridad, una gran utopía de la medicina regenerativa es reemplazar tejidos lesionados y órganos enfermos, y los avances significativos actuales en este campo se han desarrollado con gran velocidad. A continuación, se mencionan algunos trabajos relacionados con la diferenciación de SC hacia algún linaje celular renal.

En el 2005, Kim y Dressler diferenciaron mESC a CR progenitoras utilizando ácido retinoico (RA), Activina A, BMP4 y BMP7, las células obtenidas fueron microinyectadas en riñones de E11.5 y E12.5, expresándose los genes de *PAX2*, *WT1*, *WT4*, *cad-6*. Observándose que estas células se integran al riñón en desarrollo con una gran eficiencia (23).

Por otro lado, Bruce y cols. en 2006, informó la expresión espontánea de genes renales en cuerpos embrionarios (EBs) cultivados y suplementados con BMP4 y factor inhibidor de leucemia, reportado la expresión de *PAX2*, *WT1*, *podocalyxin*, *Pod-1* y *nfrin* (9).

Los estudios con células madre pluripotentes inducidas (iPSC) también han tomado importancia en este campo, ya que Ryuji y cols. en el 2009 cultivaron ESC y iPSC, indujeron la diferenciación de ambas líneas celulares a células renales mediante factores como la Activina, GDNF, Gremlin, GDF1. Compararon entre ambas líneas celulares la expresión de genes (*six2*, *PAX2*, *WT1*, *Ksp*, *nephrin*) mediante PCR tiempo real, llegando a la conclusión de que ambas líneas celulares son perceptibles a ser diferenciadas (28).

Ren y cols. en el 2010, indujeron la formación de EBs a partir de mESC, posteriormente estimularon la diferenciación de los EBs a poblaciones celulares de mesodermo, acondicionando el cultivo con Activina y Ácido retinoico. Detectándose por citometría de flujo a los seis días de diferenciación la expresión de las proteínas *PAX2* y *branchyury* en el 72% de las células. Posteriormente para la inducción a células renales utilizaron medio recolectado de cultivos de células de la yema

ureteral de un feto de 13 días, las células del mesodermo se cultivaron durante 10 días antes de la expresión de marcadores renales (WT1, PAX2, pod1 y E-Cadherina) (3).

Nishikawa y cols. en el 2011, indujeron la diferenciación de mESC siguiendo el desarrollo embrionario por etapas, en la etapa I, indujeron la diferenciación hacia mesodermo utilizando activina A, BMP7 y Litio. Posteriormente se dirigió la diferenciación hacia la etapa II (mesodermo intermedio) agregando ácido retinoico, y en la etapa III para la generación de líneas celulares renales, las células se mantuvieron en cultivo con medio condicionado de mesénquima metanéfrico y yema ureteral. Comprobándose la diferenciación al detectar la expresión de genes como *PAX2*, *lim1*, *WT1* y *nestin* entre otros, además de la expresión de las proteínas de los mismos mediante inmunofluorescencia (41).

Es importante citar uno de los trabajos más actuales y sobresalientes, el cual es el de Narayan y cols. quienes en el 2013 diferenciaron SC embrionarias humanas (HUES-7) en células epiteliales renales, utilizando medio de crecimiento epitelial renal durante 20 días, detectándose la expresión de marcadores característicos de células renales del túbulo proximal (AQP1, CK18 Y GGT) determinados por PCR tiempo real. Determinaron también la importancia de BMP7 en la diferenciación de ESC, ya que al utilizarla como inductor de la diferenciación renal aumentó la expresión de AQP1, analizadas mediante técnicas de inmunofluorescencia y citometría de flujo. Observándose al microscopio formaciones tubulares (42).

Por otro lado, respecto a los efectos de las SC en modelos animales con daño renal, Barbara Imberti y cols. en el 2015 cultivaron iPSC humanas y las diferenciaron a células renales progenitoras, aplicándolas vía intravenosa en ratones NOD-SCID con lesión renal aguda, observando una mejora en la función renal al disminuir el BUN, de igual forma, reportaron la restauración histológica a los 4 días posteriores de la aplicación de las células renales progenitoras (43).

A pesar de los estudios que se han realizado en busca de obtener CRD a partir de ESC, aún no se ha reportado si dichas células tienen la capacidad de restablecer la función renal y restaurar el tejido dañado.

En este trabajo de investigación se diferenciaron células madre embrionarias de ratón (mESCs, mouse Embryonic Stem Cells) a células renales diferenciadas (CRD), analizando sus perfiles morfológicos, genéticos, fenotípicos y bioquímicos a lo largo del proceso de diferenciación mediante Real-Time PCR, inmunofluorescencia y espectroscopia vibracional, valorándose los efectos de las mESC en un modelo murino con lesión renal. Aunque existen estudios en este ámbito que han reportado la caracterización genética o fenotípica, ninguno de ellos ha dado seguimiento a los cambios morfológicos ocurridos en la diferenciación ni ha combinado estas técnicas con la espectroscopia FTIR para analizar el proceso de diferenciación. Resaltando además que la espectroscopia vibracional sólo se ha utilizado para caracterizar la diferenciación de los ESC hacia precursores de cardiomiocitos (40), y nuestro grupo de investigación ha logrado la caracterización de la diferenciación de ESC hacia células pancreáticas. Por otro lado, los trabajos que han valorado la función renal considerando únicamente el BUN, y en este trabajo se evaluó creatinina, BUN y glucosa, además de realizar un seguimiento en los cambios histopatológicos a los 5, y 20 días posteriores a la inducción del daño renal (IDR).

## CAPÍTULO III

### **JUSTIFICACIÓN**

La FRA y FRC han aumentado progresivamente convirtiéndose en un problema de salud global; presentan una tasa de mortalidad entre el 50 y el 80%; en México entre ocho y nueve millones padecen esas enfermedades, y entre 100 mil y 130 mil personas se dializan, para lo cual se erogan 250 mil pesos anuales.

De acuerdo con el último censo de Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en 2012 hubo 12 mil fallecimientos derivados de insuficiencia renal (5).

Los tratamientos actuales (diálisis y trasplante) son muy costosos y están sujetos a reacciones adversas y a un reducido número de donadores (28, 41), además del rechazo inmune y la necesidad de inmunosupresores de por vida. A pesar del uso de las terapias sustitutivas, la calidad de vida del paciente con daño renal va en decremento y la enfermedad *per se* conlleva una serie de complicaciones.

Dado el aumento de la tasa de insuficiencia renal en etapa terminal y a las pocas alternativas de tratamiento, se tienen que empezar a investigar posibles enfoques regenerativos en el riñón, con la finalidad de aumentar la funcionalidad renal y revertir el daño tisular y funcional generado por dichas enfermedades; es por esto que se han buscado nuevas alternativas de terapias sustitutivas de la función que reduzcan los costos y mejoren la calidad de vida del paciente.

El reciente progreso en la medicina regenerativa ha traído esperanza en la innovación de tratamientos, como la terapia celular y la bioingeniería. Y dadas las características de las ESC de auto renovación y diferenciación, se ha pensado en el uso de estas células como fuente de terapia celular en la regeneración renal, con lo que podrían llegar a ser innecesarias o menos frecuentes las terapias de reemplazo, disminuyéndose las complicaciones y gastos de las instituciones de salud. Por lo que el desarrollo de este trabajo de investigación es necesario para la generación de las bases de una nueva estrategia terapéutica basada en la terapia celular, con la cual se busca mejorar la funcionalidad renal y restaurar la microarquitectura.

## CAPÍTULO IV

### **OBJETIVOS**

#### **Objetivo general**

Obtener Células Renales Diferenciadas (CRD) a partir de Células Madre Embrionarias de Ratón (mESC) y analizar los cambios en la función renal y la microestructura en un modelo murino con nefrotoxicidad tratado con mESC.

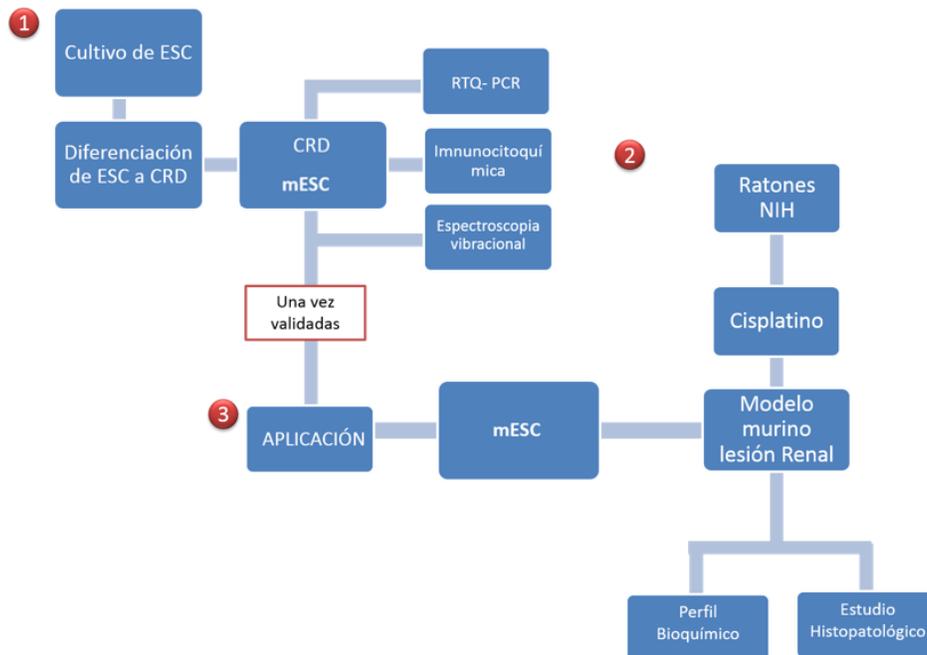
#### **Objetivos específicos**

1. Diferenciar Células Madre Embrionarias de Ratón (mESC) a Células Renales Diferenciadas (CRD).
2. Caracterizar génica y proteicamente las CRD mediante los cambios de la expresión de los genes *Oct4*, *SOX2*, *PAX2*, *WT1* y *Ksp*, así como la inmunolocalización de Oct4, SSEA-1, WT1, PAX2 y E-caderina.
3. Determinar la estructura orgánica de las mESC y las CRD, mediante espectroscopia vibracional y análisis multivariado.
4. Establecer un modelo murino con lesión renal
5. Evaluar la función renal de los animales con falla renal que recibieron tratamiento de terapia celular con mESC mediante parámetros bioquímicos.
6. Analizar los cambios histopatológicos generados por el tratamiento con mESC en los animales con falla renal.

## CAPÍTULO V

### METODOLOGÍA

El desarrollo del proyecto se llevó a cabo en tres fases; en la primera fase se cultivaron mESC y se sometieron a un protocolo de diferenciación de 20 días para obtener CRD, se diseñaron oligonucleótidos ( *$\beta$ -actina*, *Oct4*, *SOX2*, *PAX2*, *WT1* y *Ksp*) con la finalidad de evaluar de expresión de estos genes en tiempo específicos a lo largo de la diferenciación renal (días 0, 10, 15 y 20) mediante RTq-PCR, mismos que fueron evaluados mediante microscopia de fluorescencia (*Oct4*, *SSEA-1*, *PAX2*, *WT1*, y *E-cadherina*) al día 18 de diferenciación. Además, las CRD se analizaron por técnicas de espectroscopia vibracional de infrarrojo con la finalidad de evaluar cambios estructurales químicos durante el proceso de diferenciación (día 0, 10, 15 y 20). La segunda fase consistió en el desarrollo de un modelo murino con daño renal utilizando CDDP, evaluando el perfil bioquímico. Finalmente, en la tercera fase se aplicó la terapia celular (mESC) al modelo animal de acuerdo al grupo de estudio que pertenecía, para evaluar la funcionalidad a través de análisis bioquímicos e histopatológicos. El esquema general del estudio se resume en la figura 2.



**FIGURA 2. Estrategia experimental.** El desarrollo del proyecto de investigación se desarrolló en 3 fases, 1. Cultivo de mESC y su diferenciación a CRD, 2. Implementación de un modelo murino con lesión renal y 3. Aplicación de las CRD en el modelo murino con lesión renal y su estudio bioquímico e histopatológico.

## **Cultivo de Fibroblastos Embrionarios de Ratón (MEF)**

Se utilizaron fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) de la línea celular STO (S, SIM; T, 6-resistente a la tioguanina; O, resistente a la ouabaina). Los cuales fueron sembrados en el siguiente medio de cultivo; medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (ATCC, 30-2002) 85%, Suero fetal bovino (SFB) (ATCC,30-2020) 15% y antibiótico Penicilina 10,000 UI/ml/Estreptomicina 10,000 µg/ml (Invitrogen, 5140) 1%.

Una vez que se preparó el medio, se procedió a descongelar la línea celular de fibroblastos, para lo que se vertieron 5 ml de medio DMEM completo en un tubo falcón de 15 ml, se descongeló el vial y se agregó su contenido al tubo falcón de 15 ml. Se centrifugó la suspensión celular a 1000 rpm por 3 minutos, se decantó el sobrenadante, resuspendiendo las células con medio DMEM completo, se sembraron la totalidad de las células en placas de cultivo P60, posteriormente se incubaron a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, se esperó a que el cultivo se adaptara a las condiciones del medio y lograra confluencia; una vez logrado este paso, se lavaron las células con solución amortiguadora de fosfato (PBS), con la finalidad de eliminar las células que se encontraban muertas, y dado que los MEF son células adherentes, fue necesario despegar las células de la placa de cultivo con Tripsina / 0.53 EDTA (ATCC, 30-2101), posteriormente se desactivó la tripsina con medio DMEM completo y se vertió la suspensión celular a un tubo falcón de 15 ml, centrifugándose a 900 rpm por 3 min, obteniéndose el pellet y resuspendiéndose en 1 ml de medio DMEM completo.

Posteriormente, con el objetivo de saber la viabilidad y el número de células que se obtienen, se procedió al conteo celular empleando el contador automático (*Invitrogen cell counter*), para lo cual se mezclaron 5 µl de la suspensión celular y 5 µl de azul tripano, sembrando los MEF en cajas de cultivo P60 a una densidad de 55,000 células/cm<sup>2</sup>.

## **Arresto Celular de los MEF**

Una vez que se lograron expandir los MEF se procedió a bloquearlos en su ciclo celular, con la finalidad de que sólo sirvieran como células alimentadoras y no compitieran con las células ESC, para lo que se utilizó mitomicina C (sigma, M4287), la cual se ajustó a una concentración de 1 mg/ml con DMEM, siendo utilizada esta solución para preparar medio DMEM completo con mitomicina a una concentración de 20 µl/ml. Para llevar a cabo el bloqueo del ciclo celular de los MEF, éstos se sembraron con medio DMEM completo en una caja de cultivo P60 a una densidad celular de 55 000 células/cm<sup>2</sup> y 24 hrs después se les aspiró el medio DMEM completo y en su lugar se agregó medio DMEM completo con mitomicina, incubándose a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> por 3 hrs; pasado el tiempo se le aspiró el medio, se enjuagaron las células con PBS, se tripsinizaron y se incubaron por 1 min, posteriormente se desactivó la tripsina con medio DMEM completo, se vertió la suspensión celular a un tubo falcón de 15 ml, se centrifugó a 1000 rpm por 3 min, obteniéndose un pellet, mismo que se resuspendió con medio DMEM completo, posteriormente se volvieron a sembrar los MEF tratados con mitomicina en placas de cultivo P60.

## **Cultivo de Células Madre Embrionarias de Ratón (mESC)**

Las células madre embrionarias de ratón, se adquirieron en ATCC, como se ha citado con anterioridad, y se siguió el protocolo de descongelamiento de la línea celular y expansión con ligeras modificaciones de las especificaciones del fabricante como a continuación se cita:

Una hora antes de sembrar las mESC, se cambió el medio DMEM completo de los MEF tratados con mitomicina por medio completo de SC de ratón, el cual contenía lo siguiente: medio basal de SC de ratón (ATCC, SCRR-2010) 85%, SFB 15%, 2 mercaptoetanol (Invitrogen, 21985023) 0.1 mM, Factor Inhibidor de Leucemia (LIF) (Chemicon, ESG1107) 1 000 U/ml. Posteriormente se sembraron las mESC en una caja de cultivo P60; incubándose a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, siendo necesario el cambio de medio cada 24 hrs. Hasta que se observó una confluencia del 70%; una vez lograda la confluencia se realizaron pases celulares

## **Diferenciación de mESC a células renales**

Una vez que se lograba confluencia y era necesario un pase celular de las mESC, se procedió a la diferenciación de estas células, para lo cual se sembraron las mESC en cajas P35, a una densidad de 50,000 células/cm<sup>2</sup>, utilizándose medio de diferenciación renal que contenía los siguiente: DMEM 90%, Suero fetal de Ternero (FCS) (Promocell cat: C-37350) 10%, 2 mercaptoetanol 0.1mM, Activina (R&D systems, 338-AC) 10ng/ml, Factor neutrofico derivado de la glia (GDNF) (R&D systems, 512-GF) 150ng/ml, Proteína morfogenética del hueso 7 (BMP7) (R&D systems, 5666-BP) 15 ng/ml, LIF 1u/ml, Gremlin (R&D systems, 956-GR) 1.25 ug/ml, Factor de Diferenciación y Crecimiento 11 (GDF11) (R&D systems, 1958-GD) 25 ng/ml y Familia del sitio de integración Wingless-Tipo MMTV, Miembro 4 (Wnt-4) (R&D systems, 475-WN) 10ng/ml, induciendo la diferenciación por 20 días, y partir del día 4 el medio se cambió cada 2 días.

## **Descripción Morfológica**

Las mESC y los cuerpos embrionarios (EBs) obtenidos a los días 5,10, 15 y 20 de diferenciación fueron observados a lo largo del proceso de cultivo, expansión y diferenciación en un microscopio invertido Ti-U Eclipse Nikon, determinándose el diámetro y confluencia celular del EB, así como la forma y adherencia celular. El diámetro proyectado del EBs se calculó con el software de análisis de imágenes Image-Pro Premier 9.1, Media Cybernetics, (Maryland, EE.UU.), suponiendo un área de sección transversal circular (N = 10 EB en cada día de diferenciación).

Se utilizó una prueba Anova para comparar las diferencias de los diámetros de los EBs entre las células renales diferenciadas obtenidas en diferentes tiempos de maduración a los días 5, 10, 15 y 20 de diferenciación.

## **Diseño, estandarización y validación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Se realizaron extracciones de RNA a partir de tres replicas biológicas de riñones embrionarios, riñones adultos y de mESC. El total de RNA se aisló utilizando trizol (invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante y se cuantificó por espectroscopia, para finalmente ser tratado con DNasas (Promega, M6101) y sintetizar el cDNA, para lo que se utilizó el kit first strand cDNA (invitrogen, 12328-

040). La PCR en tiempo real se realizó en un equipo ABI PRISM 7000 sequence Detection system-SDS, y se utilizó SYBR Green como sistema de detección. El diseño de la secuencia de los oligonucleótidos para todos los genes que se estudiaron (*β-actina*, *Oct4*, *SOX2*, *PAX2*, *WT1* y *Ksp*) se desarrolló en el programa Primer express Real-Time PCR ver 3.0 de Applied Biosystems (Tabla 4).

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la compañía Uniparts S.A. de C.V., se hidrataron y ajustaron a una concentración final de 10 μM. A partir de la concentración de 10 μM se hicieron 3 diluciones de cada uno de los iniciadores para ajustarlos a 0.5, 3 y 9 μM, las cuales fueron utilizadas para la estandarización de la PCR con cada uno de los genes.

Se estandarizaron las concentraciones adecuadas de cada uno de los oligonucleótidos, se validó y comprobó su eficiencia antes de ser utilizados en las CRD. Una vez validada y comprobada la eficiencia se procedió a la cuantificación relativa de los genes *β-actina*, *Oct4*, *SOX2*, *PAX2*, *WT1* y *Ksp* en tres réplicas biológicas de las células cultivadas a los 0, 10, 15 y 20 días de cultivo en diferenciación.

**TABLA 4. OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA CARACTERIZAR LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS CRD**

<b>Gen</b>	<b>Iniciador sentido 5'-3'</b>	<b>Iniciador antisentido 5-3</b>
<i>β-actina</i>	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	AACCGCTCGTTGCCAATAGT
<i>Oct4</i>	ACATGTGTAAGCTGCGGCC	TCCAGACTCCACCTCACACG
<i>sox-2</i>	AACCGATGCACCGCTACG	TTGACCACAGAGCCCATGG
<i>PAX2</i>	CGCTCCAACGGTGAGAAGAG	AGACTCGATCCAGAGCTTCCAG
<i>WT1</i>	GCATCCCAGGCAGGAAAGT	TCCTTCCGGCAAACCTGATA
<i>Ksp</i>	ACCCAACAGTCAACATCCCTG	GCTTTGTTTTTCAGCCCCCTC

#### **a. Estandarización de la PCR.**

Para la estandarización de la PCR se utilizó cDNA, el cual se obtuvo a partir de RNA extraído de riñón y feto de ratón. El procedimiento para la extracción del RNA se cita a continuación:

### 1. Extracción del RNA.

La extracción se realizó según el método de Chomczynski y Sacchi, 1987, de acuerdo al siguiente protocolo: Se obtuvieron tres muestras de un riñón de ratón adulto y tres muestras de un feto de ratón (10 días de gestación) y se transfirieron a razón de 10 mg de células x 1.0 ml de trizol (invitrogen, 15596-018) en un tubo eppendorf, posteriormente se homogeneizó el tejido de cada una de las muestras y se transfirió cada una de las muestras a otro tubo limpio agregándosele 200  $\mu$ l de cloroformo (J. T. Baker, 9180-22) x 1 ml de trizol, las mezclas se agitaron vigorosamente durante 15 s y se incubaron a temperatura ambiente por 3 min para separar la fase acuosa de la mezcla, se centrifugó a 11,000 rpm, durante 15 min a 4 °C. Una vez separada la fase acuosa se transfirieron a un tubo limpio y se le adicionaron 500  $\mu$ l de isopropanol (J. T. Baker, 9080) para precipitar el RNA. Se dejaron incubar por 10 min y se centrifugaron a 11,000 rpm, durante 15 min a 4 °C. Una vez precipitadas las muestras se lavaron con 1 ml de etanol (J. T. Baker, 8006) al 75 % por cada ml de trizol adicionado, posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm, por 3 min y se eliminó el sobrenadante, dejándose secar el RNA al aire libre. Una vez seco el RNA, se le agregaron 50  $\mu$ l de dietilpirocarbonato (DEPC) a cada muestra y se procedió a disolver el pellet, hasta obtener una mezcla homogeneizada.

### 2. Cuantificación de RNA total por espectrofotometría.

La cuantificación del RNA extraído se realizó directamente y se tomaron lecturas a longitudes de onda de 260 nm en un espectofotometro (NanoDrop). Las concentraciones se ajustaron a 100 ng/  $\mu$ l, y se procedió a evaluar la integridad del RNA en un gel desnaturizante de agarosa (invitrogen) al 1 %, teñido con bromuro de etidio.

### 3. Purificación del RNA.

Todas las muestras se trataron con DNasa (RQ1 RNase-Free DNase Promega) para evitar la contaminación por DNA genómico. De acuerdo con el siguiente protocolo: Se preparó la mezcla de reacción: 8  $\mu$ l RNA (100 ng/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l Buffer y 1  $\mu$ l DNasa RQ1. Posteriormente se incubó la mezcla a 37 °C durante 30 min, y pasado el tiempo de incubación se le adicionó 1  $\mu$ l de solución de paro (EDTA 20 mM pH =

8.0) para la enzima RQ1. Finalmente se incubó la mezcla a 65 °C durante 10 min para inactivar la enzima.

#### 4. Síntesis del cDNA para la amplificación en tiempo real.

El cDNA se sintetizó utilizando el kit first strand cDNA, de acuerdo a las instrucciones del fabricante, como se describe en el siguiente protocolo: Se hizo la siguiente mezcla de reacción; 1 µl de primer (oligo dT), 5 µl del RNA tratado con DNasa, 2 µl de 10mM dNTP mix, y finalmente 4 µl de agua con DEPC. Se desnaturalizó el RNA y el iniciador incubándolos a 65 °C por 5 min, luego se preparó la siguiente mezcla de reacción: 4 µl Buffer de síntesis de cDNA, 1 µl 0-1 M DTT, 1 µl RNasaOUT (40 U/ µl), 1 µl agua con DEPC y 1 µl AMV RT (15 U/ µl). Se vertieron 8 µl de la mezcla de reacción en cada tubo de reacción con el RNA y se incubó bajo las siguientes condiciones 45 min 50 °C y 5 min 85 °C

#### 5. Amplificación de genes por PCR en tiempo real.

La PCR en tiempo real se realizó en un equipo ABI PRISM 7000 sequence Detection system-SDS versión del programa 1.1 PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA utilizando SYBR Green como sistema de detección y el kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 12.5 µl los cuales contenían 6.25 µl del Master Mix SYBR Green, 1.75 µl de agua, 2 µl del templado (sentido y antisentido) y 1.25 µl de cada uno de los iniciadores a concentraciones diferentes (sentido/ antisentido, 0.5/0.5, 0.5/0.3, 0.5/0.9, 0.3/0.5, 0.3/0.3, 0.3/0.9, 0.9/0.5, 0.9/0.3, 0.9/0.9).

Las reacciones se realizaron en placas ópticas y se sometieron a las condiciones de 95 °C por 10 min y 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 min.

#### 6. Curvas de disociación de los genes amplificados

Finalizada la PCR, las reacciones se sometieron a incrementos de temperatura desde 60 °C a 95 °C para construir una curva de disociación de cada gen amplificado en las diferentes concentraciones de los iniciadores. Esta curva se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente después de la PCR, para monitorear la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Mediante esta aplicación se puede determinar la temperatura de alineamiento de los iniciadores ( $T_m$ ) para comprobar su especificidad.

## 7. Validación

Una vez que se logró seleccionar la concentración ideal de cada uno de los iniciadores, siendo estas las que se citan a continuación: *β-actina* 3/3, *Oct4* 9/0.5, *WT1* 9/3, *PAX2* 9/0.5, *Ksp* 0.5/9. Se validaron bajo el siguiente protocolo: se cuantificaron las concentraciones de los productos de PCR obtenidas en el nanodrop y se ajustaron a 5 ng/μl y a partir de esta dilución se realizaron 5 diluciones decuplex, de manera que se obtuvieron las siguientes concentraciones en cada uno de los iniciadores: 0.05, 0.005, 0.0005, 0.00005 y 0.000005 ng/μl. De cada una de las diferentes concentraciones se realizaron por triplicado PCRs con los iniciadores ya estandarizados para cada uno de los genes, de donde se obtuvieron los valores del ciclo umbral ( $C_T$ ), los cuales fueron graficados contra el logaritmo (log) de la concentración del cDNA, para obtener una recta, ecuación de esta y valor de la pendiente.

## 8. Evaluación de los cambios de expresión de los genes estudiados.

Para comparar los cambios de la expresión de los genes de estudio, se extrajo RNA de mESC (día 0 de diferenciación) y de células renales diferenciadas a los días 10, 15 y 20 de diferenciación, las muestras se trataron con DNasas y se sintetizó el cDNA como se describió anteriormente.

En la PCR tiempo real, los valores de fluorescencia son medidos cada ciclo y representan la cantidad de producto amplificado en la reacción. Entre más templado presente una reacción al comienzo de la PCR, menor es el número de ciclos que se necesitan para alcanzar un punto en el que la fluorescencia es medida por encima de la fluorescencia normal de la reacción de ( $C_T$ ).

Es por eso que las muestras de RNA extraído en los diferentes días se ajustaron para cada cinética a 100 ng/μl.

Se utilizó el método de cuantificación relativa, en el que se compara el  $C_T$  de las mESC (día 0 de diferenciación) contra las células en días 10, 15 y 20 de diferenciación. Todas las cuantificaciones fueron realizadas por triplicado y normalizadas con un control endógeno (*β-actina*) para tener en cuenta la variación en la concentración inicial, calidad del RNA y en la eficiencia de reacción en la transcripción reversa.

Cada una de las muestras en los diferentes días de maduración se estudiaron por triplicado con los diferentes genes.

Una vez obtenidos los  $C_T$  de las cinéticas, se utilizó el método del  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  de Livak, el cual analiza los cambios de expresión relativa; debido a que es sencillo, fácil de manejar y de análisis rápido. En primer lugar, se determinó el  $C_T$  del producto del gen problema ( $C_{T\text{Pb}}$ ) y del control interno  $\beta$ -actina ( $C_{T\beta\text{-actina}}$ ), en cada muestra. Con estos datos se calculó el  $\Delta C_T$ , el cual resultó de la diferencia del  $C_{T\text{Pb}}$  y  $C_{T\beta\text{-actina}}$ ; haciéndose este cálculo para normalizar las diferencias de extracción del RNA y en la eficiencia de la reacción de síntesis de cDNA. Posteriormente se calculó el  $\Delta\Delta C_T$  en cada muestra, éste se obtuvo de la diferencia del  $\Delta C_T$  de cada muestra y de la media de los  $\Delta C_T$  del calibrador (ESC o células en diferenciación en 10, 15 y 20 días, según correspondiera). Por último, se calculó el  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  sobre el resultado obtenido anteriormente.

La diferencia en la expresión del gen Pb se expresó como  $n$ -veces relativa a las mESC o células en diferenciación del día 10, 15 o 20 según correspondiera. Las ecuaciones que se consideraron para calcular el  $\Delta\Delta C_T$  para el método de cuantificación relativa fueron:

$$C_T \text{ gen Pb} - C_{T\beta\text{-actina}} = \Delta C_T$$

$$\Delta C_T \text{ de la muestra} - \Delta C_T \text{ del calibrador} = \Delta\Delta C_T$$

$$\text{Cantidad relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

#### 9. Análisis estadístico.

El análisis estadístico de los datos y los gráficos se realizaron utilizando el programa Past versión 3.08. Se usó una prueba Anova para comparar los cambios de expresión entre las mESC y las células renales diferenciadas obtenidas en diferentes tiempos de maduración.

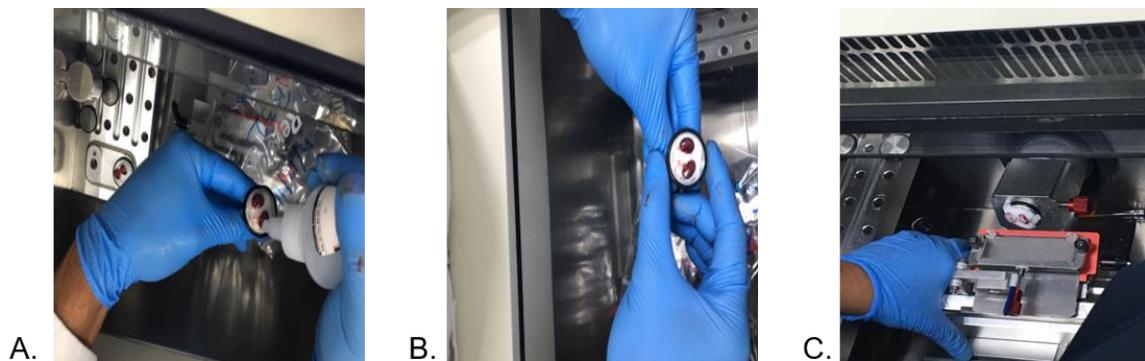
#### **Inmunocitoquímica y microscopia de fluorescencia.**

Para la estandarización de esta técnica primeramente se titularon los anticuerpos primarios y secundarios para evidenciar el marcaje y funcionalidad de los

anticuerpos contra Oct4, SSEA1 (Stage Specific Embryonic Antigen 1), WT1, PAX2, y E-cadherina, para lo cual se emplearon cultivos de SC embrionarias en pase 1 y cortes histológicos de riñón de ratón sano el cual se obtuvo mediante técnica quirúrgica.

#### a. Criocorte

Una vez obtenidas las muestras histopatológicas se realizaron cortes con un criostato de pie (ecoshel) a una temperatura de  $-30^{\circ}\text{C}$ , para lo cual los tejidos se colocaron en posición anatómica en platinas metálicas aplicando Tissue-Tek para fijar el tejido. Se dejó enfriar la muestra por un lapso de 5 minutos, una vez que la muestra se encontraba congelada se colocó en el brazo del criostato y se obtuvieron tres cortes por cada muestra a un grosor de  $5\ \mu\text{m}$  colocándolos en portaobjetos, fijando las muestras con paraformaldehído (Sigma, cat: P6148) al 4% y ácido pícrico (Sigma, cat: 197378) al 0.15% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, lavándose 2 veces con PBS al término de la fijación (Figura 3).



**FIGURA 3. Obtención de muestras histopatológicas.** A. Colocación del tejido en posición anatómica sobre las platinas y colocación de Tissue Teck. B. Congelamiento de la muestra. C. Montaje de la muestra y obtención de cortes

Posteriormente se permeó la membrana celular con Tritón X100 (Sigma, cat: X100) al 0.1% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS y en seguida se adicionaron  $50\ \mu\text{l}$  de proteína bloqueadora (Dako, cat: X0909) durante 20 minutos para inhibir tinciones no específicas. Concluido el tiempo se eliminó el exceso de suero y se procedió a realizar el marcaje con los anticuerpos (Abs) primarios en las preparaciones citológicas e histológicas para la titulación,

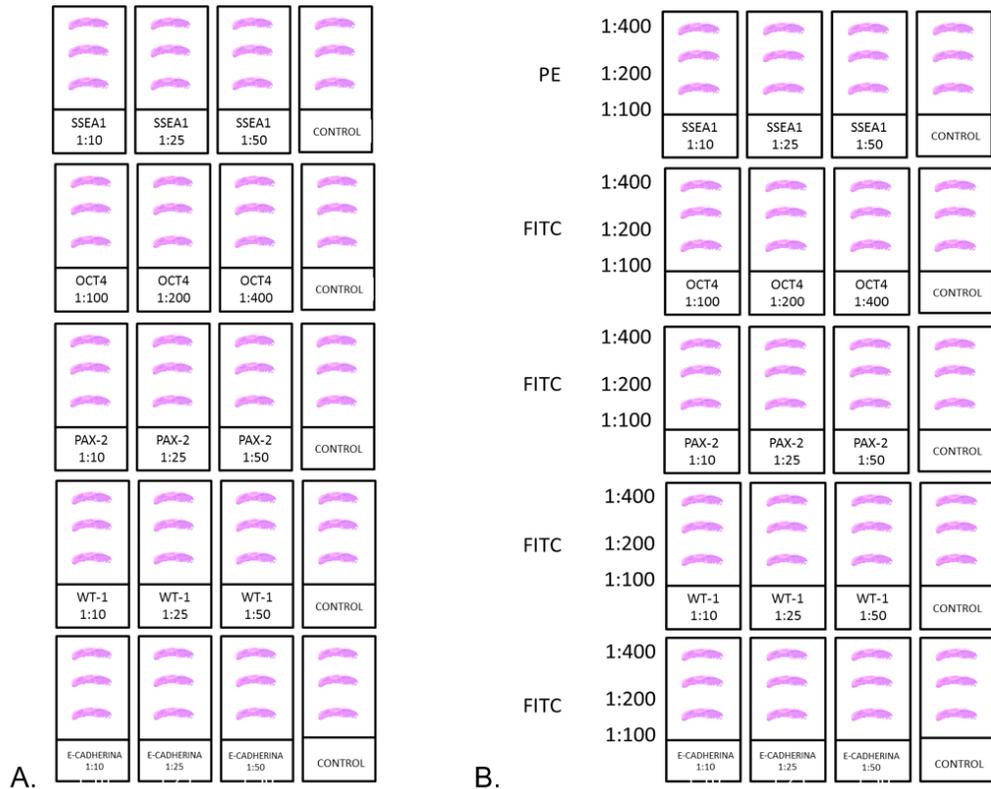
adicionando 50  $\mu$ l de los Abs primarios en 3 muestras por cada dilución como se muestra en la figura 4A, empleando las siguientes concentraciones:

Anticuerpo (Ab) primario de ratón anti-SSEA1 (abcam, ab16285), 1:10, 1:25 y 1:50; anticuerpos primarios de conejo anti-Oct4 (abcam, ab19857), 1:100, 1:200 y 1:400; anti-WT1 (Santa Cruz, sc 68880), anti-PAX2 (Santa Cruz, sc 25408) y anti-E-cadherina (Santa Cruz, sc 7870), 1:10, 1:25 y 1:50.

Los Abs primarios y los controles (proteína bloqueadora) para Oct4 y SSEA1 se incubaron durante 24 hrs en refrigeración, en tanto los Abs para WT1, PAX2 y E-cadherina se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. Pasados los tiempos establecidos, se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente, se realizaron las diluciones correspondientes a los Abs secundarios conjugados contra ratón (Alexa fluor 647) (abcam, ab150115) y contra conejo (Dylight 488) (abcam, ab96895) a razón de 1:100, 1:200 y 1:400, adicionándose 50  $\mu$ l del Ab secundario a las preparaciones citológicas e histológicas que se habían incubado previamente con los Ab primarios. Con lo anterior, las combinaciones de las titulaciones se esquematizan en la figura 4B.

Los Abs secundarios conjugados se incubaron durante 45 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron 4 veces con PBS. En seguida se agregaron 10  $\mu$ l de glicerol al 10% y se les colocó cubreobjetos. Finalmente, las muestras fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia TiU-Eclipse (Nikon, Japón), utilizando el software microimage pro.

Una vez establecida la titulación para cada uno de los anticuerpos, se procedió a realizar la inmunocitoquímica en tres replicas biológicas de cultivos celulares con ESC y CRD al día 18 de diferenciación.



**Figura 4. Esquemización de la titulación de los anticuerpos primarios y secundarios.** A. Anticuerpos primarios. Se realizaron las titulaciones para cada una de las proteínas: Oct4, SSEA1, PAX2, WT1 y E-cadherina. B. Esquemización de la titulación de los anticuerpos secundarios. Se realizaron las titulaciones para los anticuerpos secundarios conjugados contra conejo y contra ratón.

Las concentraciones finales utilizadas para los anticuerpos primarios fueron las siguientes: Oct4 1:200, SSEA1, PAX2, WT1 y E-cadherina 1:10, y para los secundarios Alexa fluor y Dylight 1:200.

### **Espectroscopia vibracional.**

Las muestras se analizaron por espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) (espectrómetro Bruker Vertex 70) en el intervalo de número de onda de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando el modo de muestreo por reflectancia total atenuada (ATR) para medir la absorción de luz infrarroja de las muestras y posteriormente comparar las diferencias entre los espectros en los diferentes días de diferenciación.

Una vez que el cultivo de mESCs alcanzó confluencia y las CRD cumplieron 10, 15 y 20 días en cultivo, las células fueron tripsinizadas y centrifugadas a 1,200 rpm durante 3 minutos, el sobrenadante fue retirado y las células fueron lavadas 3 veces

con PBS, lo anterior debido a que Santos *et al.* han indicado que las células se conservan por períodos más largos de tiempo en PBS (43), obteniéndose muestras de  $\sim 10^5$  células en 3  $\mu$ l, mismos que se colocaron en la superficie del cristal ATR y se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 minutos para eliminar el exceso de agua, midiendo los espectros hasta que las bandas de absorción relacionadas con el agua fueran indetectables. La radiación infrarroja se propagó a lo largo del cristal para obtener el espectro correspondiente, los cuales fueron el promedio de 120 barridos o adquisiciones de datos. Con esta metodología se analizaron tres repeticiones de cultivo de mESCs y CRD en diferentes etapas de diferenciación mediante espectroscopia FTIR.

### **Tratamiento Espectral y Análisis multivariado.**

Una vez que se adquirieron todos los espectros FTIR (espectros en crudo), se les aplicó un proceso de normalización de variación normal estándar (SNV, Standart Normal Variate) utilizando el software UNSCRAMBLER X10.3 CAMO, seguido del cálculo de su segunda derivada, empleando el algoritmo de Savitzky-Golay, el cual utiliza un conjunto de subconjuntos sucesivos de puntos de datos adyacentes con un polinomio de menor grado por mínimos cuadrados lineales. Después de que se trataron los espectros, los datos se utilizaron como información de entrada para la aplicación del método de Análisis de Componentes Principales (PCA, Principal Component Analysis), utilizando la rutina de reducción de dimensiones, empleando también el software UNSCRAMBLER.

### **Modelo murino con lesión renal**

Este trabajo experimental siguió las directrices de la Norma Oficial Mexicana Guía para el uso y cuidado de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y para la eliminación de residuos biológicos (NOM-087-ECOL-1995). Se utilizaron ratones machos de 8 semanas de edad de la cepa NIH, los cuales fueron mantenidos con dieta estándar, y dispusieron de agua *ad libitum*, se aclimataron durante 1 semana antes de iniciar el proyecto en jaulas metabólicas, manteniéndose con ciclos de 12 hrs de luz/oscuridad, con humedad controlada (50–60%) y condiciones de temperatura constante ( $21 \pm 1$  °C).

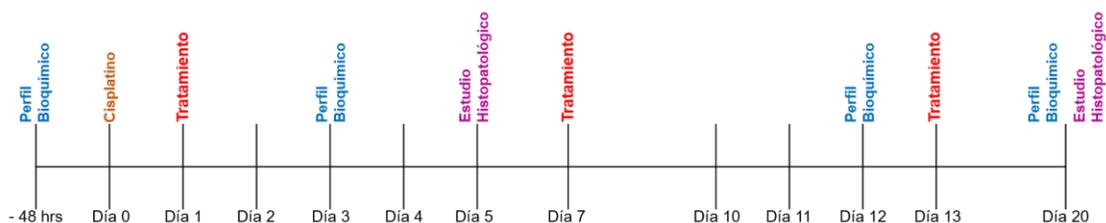
Para la estandarización del modelo se hicieron 5 grupos de estudio los cuales recibieron una única dosis de (50, 35, 20, 18 y 15 mg/kg) de acuerdo al grupo al que pertenecían, (N=5).

Por otro lado, para el desarrollo de la investigación, una vez que se estandarizó la dosis ideal para la IDR con un menor índice de mortalidad, se conformaron 2 grupos de estudio cada uno constituido por 16 animales (grupo 1, grupo control y grupo 2, grupo experimental), a todos los integrantes de ambos grupos se les indujo una lesión renal con CDDP. Cada grupo recibió un tratamiento de acuerdo al grupo que pertenecían a las 24 hrs, 7 y 13 días posterior a la IDR. 10 animales de cada grupo se tomaron para realizar perfiles bioquímicos y 6 para el análisis histopatológico

### a. Modelos de estudio

De acuerdo a los grupos de estudio al que pertenecían los ratones estos recibieron un tratamiento a las 24 hrs, 7 y 13 días post-IDR, y a los días 3, 12 y 20 post-IDR se les realizó un perfil bioquímico de 3 elementos (creatinina, BUN y glucosa). Finalmente, al día 20 post-IDR los animales fueron sacrificados y se obtuvieron cortes histológicos de riñón. Siguiéndose la línea de tiempo que se muestra en la figura 5.

El grupo 1 fue considerado como grupo control y únicamente recibió solución salina isotónica (SSI), el grupo 2 recibió  $1 \times 10^6$  mESC resuspendidas en SSI (N=10).



**Figura 5. Línea del tiempo de los grupos de estudio.** Se siguieron los tiempos establecidos en la presente línea de tiempo en los dos grupos de estudio.

### b. Administración intraperitoneal de CDDP.

Para la IDR se utilizó CDDP (P3494, Sigma-aldrich), en primera instancia se pesaron los animales en una báscula Ohaus con capacidad máxima de 2610 g.

Posteriormente de acuerdo al peso se calcularon las dosis de CDDP (50, 35, 20, 18 y 15 mg/kg) de acuerdo al grupo que pertenecían, para lo cual con una espátula de plástico se pesó el CDDP en una balanza analítica (ADAM modelo AEA 250g), diluyéndose el CDDP en solución salina al 0.9%, la cual se calentó previamente a 30°C para facilitar la dilución.

Ya que se contaban con las dosis individuales para cada animal, las dosis de CDDP fueron administradas intraperitoneal (ip), siguiéndose el siguiente protocolo: Se sujetó al animal colocándolo boca arriba en un ángulo de 90°, con la finalidad de que los órganos migren hacia la pared dorsal por gravedad, con lo que se evitó puncionar estos órganos. A continuación, se dividió visualmente el abdomen en cuatro cuadrantes, se ubicó el cuadrante inferior izquierdo y previa asepsia y antisepsia el CDDP fue administrado con una aguja 31 G / 6 mm colocándola en un ángulo de 35° con respecto al eje corporal del animal, seguidamente se jaló el émbolo de la jeringa para asegurarnos de no estar puncionando la vejiga o el intestino (Figura 6). Una vez asegurada la zona de aplicación se procedió a la aplicación del CDDP. Finalmente, la zona de punción se limpió con una torunda con alcohol haciendo presión por un lapso de 3 minutos.

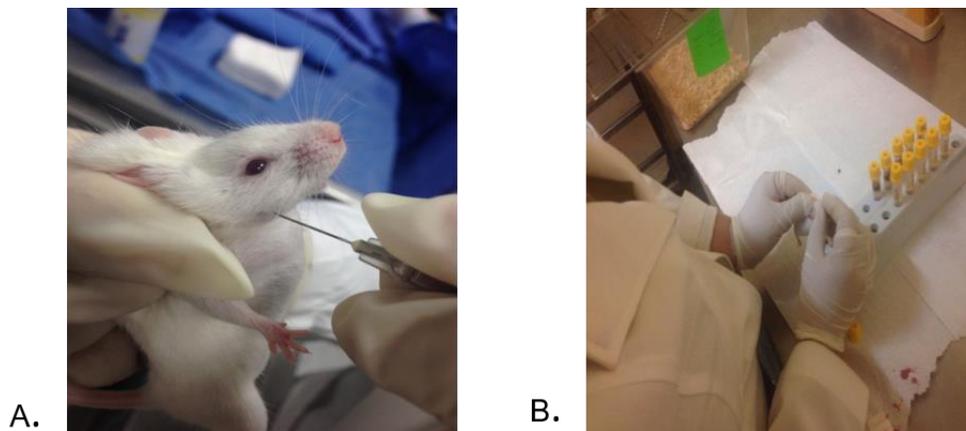
Una vez estandarizada la dosis ideal para la IDR, la cual fue de 18 mg/kg los dos grupos de estudio (control y experimental) recibieron dicha dosis de acuerdo al protocolo antes mencionado.



**FIGURA 6. Administración del cisplatino.** Se coloca al animal en 90° y se punciona el cuadrante inferior izquierdo.

### **Obtención de muestra sanguíneas.**

A cada uno de los animales se les extrajo sangre periférica 48 hrs antes de la IDR y posteriormente a los 3, 12 y 20 días posteriores a la inducción del daño. Utilizándose la técnica de punción en la vena facial. Para lo cual, previa asepsia y antisepsia se sujetó al ratón por la piel de la nuca, ejerciendo presión leve sin lastimarlo, estableciendo así una situación de inmovilidad. posteriormente, con una aguja 21 G/32 mm se puncionó la vena facial, en el bulto vascular que caracteriza al ratón de laboratorio, que es donde confluyen las venas orbitarias, la vena facial y otras venas que drenan la región facial, formando el inicio de la vena yugular, obteniéndose por punción 10 gotas de sangre, las muestras sanguíneas fueron recolectadas en tubos Microtainer. Al final del proceso se aplica presión con una gasa por menos de un minuto para detener el sangrado. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm por 5 minutos, obteniéndose el suero, realizándose las químicas sanguíneas de 3 elementos (creatinina, BUN y glucosa) en un equipo de química clínica analítica (discrete random analyser modelo MINI; Química Clínica Aplicada) (Figura 7).

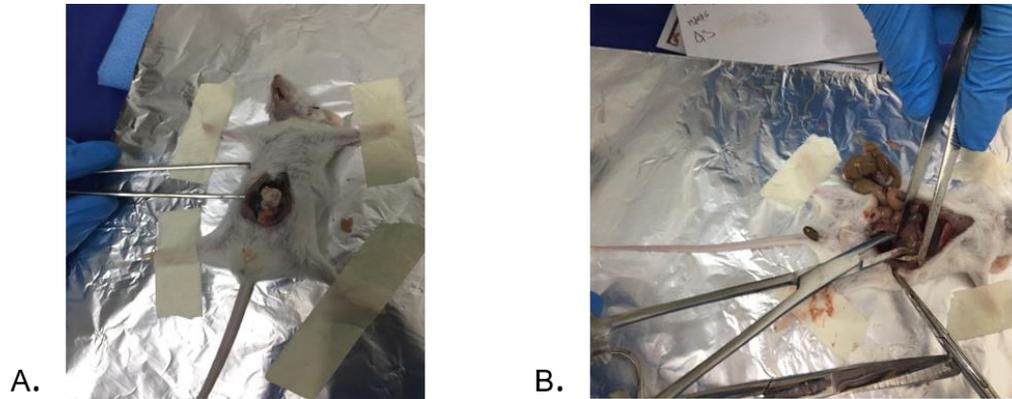


**FIGURA 7. Toma y recolección de muestras sanguíneas.** A. Técnica de punción de la arteria facial. B. Recolección en tubos Microtimer.

### **Obtención de muestras histopatológicas**

Para la obtención de las muestras histopatológicas se sacrificaron 3 ratones a los 5 y 20 días posteriores a la IDR, posteriormente, el animal se fijó en una tabla y se realizó una incisión en línea media abdominal, disecando la totalidad de los planos

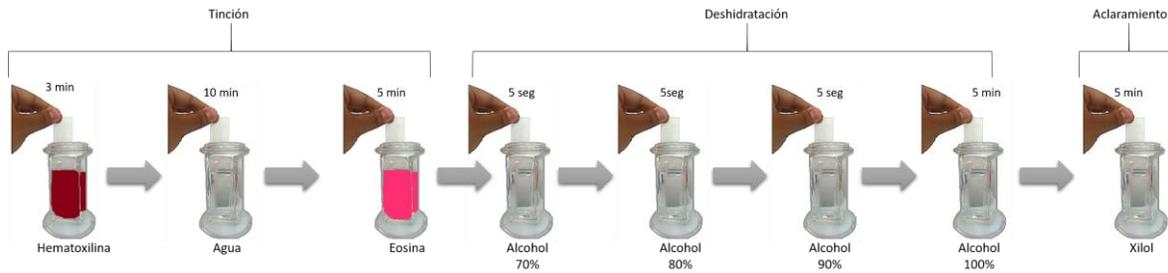
hasta llegar a cavidad peritoneal, extrayendo los órganos abdominales con la finalidad de exponer los riñones, una vez localizados los riñones, ambos fueron disecados (Figura 8), e inmediatamente tratados con la técnica histológica, obteniéndose las muestras histopatológicas mediante criocorte, con la técnica antes mencionada, posteriormente el tejido fue fijado con paraformaldehído al 4% y ácido pícrico al 0.15% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, lavándose 2 veces con PBS al término de la fijación.



**FIGURA 8. Obtención de muestras histopatológicas.** A. Incisión en línea media abdominal. B. Extracción de órganos.

#### a. Tinción de los cortes histopatológicos

Una vez que se fijaron las muestras, se procedió a realizar una tinción con Hematoxilina y Eosina, para lo cual primeramente fueron teñidas con hematoxilina durante 3 minutos, pasado el tiempo las muestras se lavaron con agua destilada por 10 minutos, para posteriormente teñirlas por 1 minuto en Eosina. Finalizada la tinción se procedió a la deshidratación de la muestra, para lo cual las muestras fueron lavadas con alcohol durante 5 segundos a las concentraciones de 70 %, 80%, 90% y 5 min a 100%. Como último paso se realizó el aclaramiento de la muestra utilizando Xilol (Figura 9).



**Figura 9. Técnica histológica.** Pasos para la tinción, deshidratación y aclaramiento de las muestras histopatológicas.

### b. Análisis histopatológico

El análisis histopatológico se realizó por triplicado en cada uno de los riñones obtenidos (2 riñones por cada animal), obteniendo microfotografías de las muestras más representativas, utilizando un microscopio TI-U Nikon, y el software de análisis de imágenes Image-Pro Premier 9.1, Media Cybernetics.

## **CAPÍTULO VI**

### **RESULTADOS.**

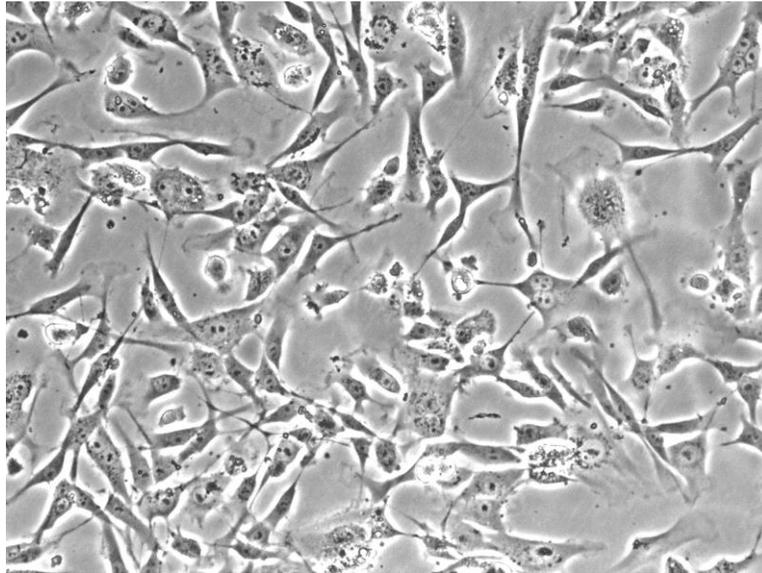
#### **Expansión de los fibroblastos embrionarios de ratón.**

Para el cultivo de mESC es primordial cultivar MEF, debido a que estos secretan LIF, el cual ayuda a que las mESC en cultivo mantengan su estado de pluripotencialidad, funcionando como monocapa alimentadora. Los MEF son células adherentes en cultivo, con las características propias de cualquier fibroblasto, presentando un núcleo oval cerrado, algo achatado con 1-2 nucléolos, escaso citoplasma, con finas prolongaciones alargadas, en cultivo son adherentes y forman un tapete celular en la placa de cultivo (Figura 10).

La confluencia celular inicial de los MEF se logró a los 5 días de haber realizado el cultivo inicial, posteriormente la densidad celular se duplicaba cada 3 días, siendo necesario realizar un pase cada 3 días a una proporción 1:2.

#### **Bloqueo del ciclo celular de los fibroblastos embrionarios de ratón.**

Una vez que se cultivaron los MEF, para que estos sirvan como capa alimentadora y no compitieran en el cultivo con las mESC, fue necesario arrestarlos en su ciclo celular de acuerdo a la metodología antes descrita. Para comprobar el arresto del ciclo celular de los MEF, estos se volvieron a sembrar en placas de cultivo P60 a una densidad de 55,000 células/cm<sup>2</sup> y cada 3 días se realizó un conteo celular; encontrando cuentas inferiores a la inicial, perdiendo la viabilidad total después del día 10 de haber sido sembradas. Resaltando que los MEF expuestos a mitomicina, no cambian su morfología normal, posterior a su bloqueo del ciclo celular.



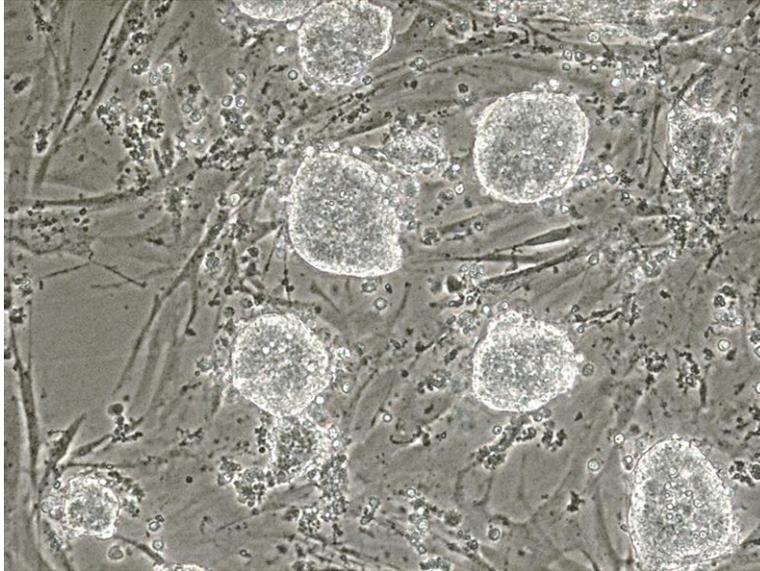
**Figura 10. Cultivo celular de fibroblastos embrionarios de ratón.** Células fusiformes adheridas a la placa de cultivo. (100 X).

### **Expansión de las células madre embrionarias de ratón.**

Una vez que se obtuvo una monocapa de MEF arrestados en su ciclo celular, sobre estos se cultivaron mESC. Las mESC son células adherentes que tienen como característica principal su crecimiento en agrupaciones celulares formando colonias, mostrando una amplia capacidad de replicación, estas colonias se componen de muchas células redondas (Figura 11).

La formación de las primeras colonias se dio en el tercer día de cultivo, mismas que fueron creciendo, siendo necesario el cambio de medio cada 24 hrs.

La confluencia celular inicial de los mESC se logró a los 5 días de haber realizado el cultivo inicial, posteriormente la densidad celular se duplicaba cada 4 días, siendo necesario realizar un pase cada 3 días a una proporción 1:3. Los pases celulares se hicieron antes que algunas de las colonias hicieran contacto entre ellas.



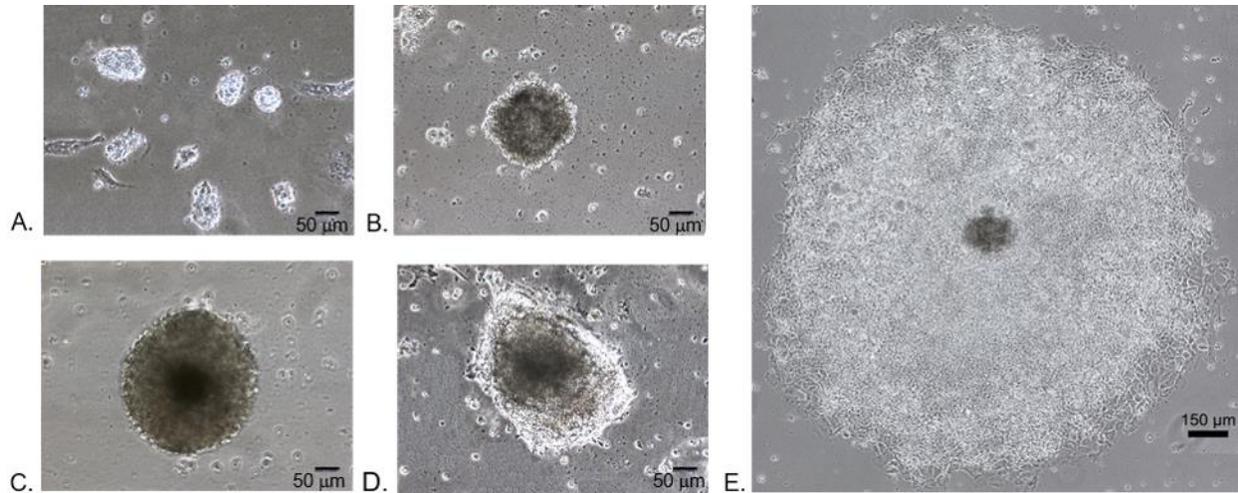
**Figura 11. Colonias de mESC de ratón sobre una monocapa de MEF. Células adherentes formando agrupaciones celulares. (100X).**

### **Descripción morfológica de las células renales obtenidas a partir de mESC a lo largo del proceso de diferenciación.**

Posterior al cultivo de mESC, se procedió a la diferenciación de estas a CRD, para lo cual las mESC fueron expuestas a un medio de diferenciación renal, el cual contenía varios inductores de diferenciación, mismos que ya se han citado con anterioridad en el capítulo de metodología.

Conforme fueron pasando los días de diferenciación, se observó la formación de agregados celulares, al día 5 se formaron conglomerados celulares de  $52.493 \pm 0.849 \mu\text{m}$  de diámetro en promedio (Figura 12A); dichos agregados fueron conformando estructuras tridimensionales esferoidales formadas por células típicas esféricas adherentes, características propias de un EB, al día 10 de diferenciación el diámetro de dichos EBs aumentaron considerablemente hasta  $156.28 \pm 11.410 \mu\text{m}$  (Figura 12B), siendo mayor la densidad celular que forman estos EBs. Al día 15 aumentó aún más la densidad celular de los EBs y su diámetro, presentando un diámetro promedio de  $256.934 \mu\text{m} \pm 15.852 \mu\text{m}$  (Figura 12C), en la figura 12D se evidencia la tridimensionalidad adquirida de los cuerpos embrionarios al día 15 de diferenciación. Finalmente, al día 20 de diferenciación los EBs presentaron un diámetro de hasta  $1651.39 \pm 32.96 \mu\text{m}$ , observando células aisladas en la periferia

de los EBs, infiriendo que la adherencia intercelular disminuyó (Figura 12E), Se presentó una significancia estadística entre el tamaño de los EBs en las diferentes etapas de diferenciación ( $p < 0.001$ ).

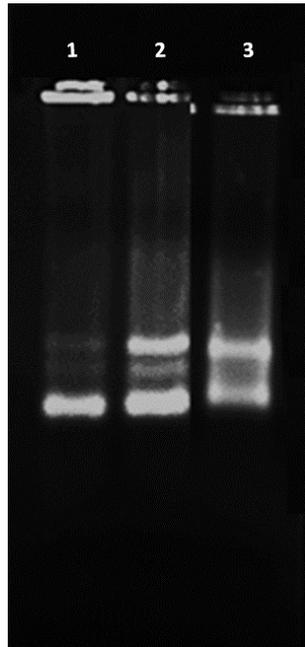


**Figura 12. Cuerpos Embrionarios en diferentes etapas de diferenciación.** A. Día 5 de diferenciación, agregados celulares con un diámetro  $\bar{X} = 52.493 \pm 0.849 \mu\text{m}$ . B. Día 10 de diferenciación, aumento la densidad de los EBs, presentando un diámetro  $\bar{X} = 156.28 \pm 11.410 \mu\text{m}$ . C y D. Día 15 de diferenciación, aumento considerablemente el diámetro promedio y la densidad celular de los EBs  $\bar{X} = 256.934 \mu\text{m} \pm 15.852 \mu\text{m}$ . D. Se evidencia la tridimensionalidad de los cuerpos embrionarios esféricos. E. EBs a los 20 día de diferenciación, los EBs llegaron a presentar un diámetro  $\bar{X} = 1651.39 \pm 32.96 \mu\text{m}$ , por lo que se tuvo que hacer una reconstrucción de campos mediante un tilling, observándose células aisladas en la periferia. (100X).

### Extracción y cuantificación de RNA.

Se obtuvieron 5 muestras de RNA de riñón y feto de ratón, así como RNA de cultivo de mESC con la finalidad de estandarizar y validar la amplificación de los genes respectivos con cada par de iniciadores.

Los resultados mostraron la obtención de un RNA integro, en la figura 13 se aprecian en los carriles una señal difusa a lo largo de todo el gel, que corresponde al RNAm, así como unas bandas difusas inferiores que bien podrían pertenecer al RNA ribosomal 5S y/o al RNA de transferencia.



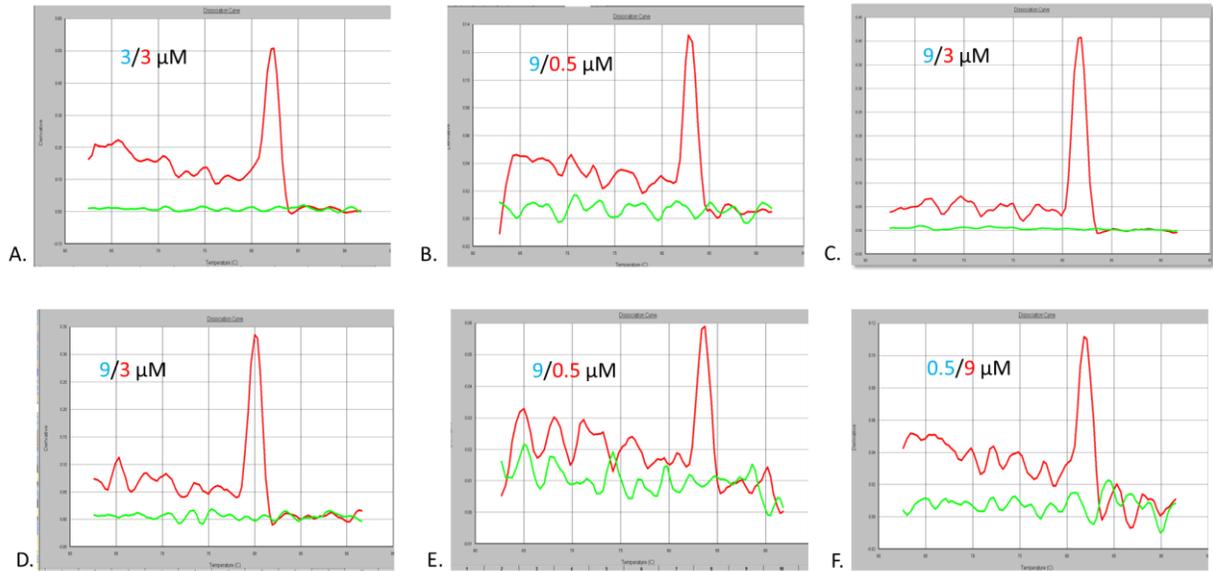
**Figura 13. Integridad del RNA.** El RNA se extrajo por el método Chomczynski y Sacchi. Gel de agarosa al 1% tenido con bromuro de etidio. 1. RNA de Riñon, 2. RNA Fetal y 3. RNA de mESC.

### **Curvas de disociación de los genes amplificados.**

Una vez extraído y verificada la integridad del RNA, se trató con DNasas para la eliminación total del DNA y se sintetizó el cDNA como se describe en metodología. Con el cDNA sintetizado se estandarizaron las condiciones para la amplificación de los genes ( *$\beta$ -actina*, *Oct4*, *SOX2*, *WT1*, *PAX2*, y *Ksp*).

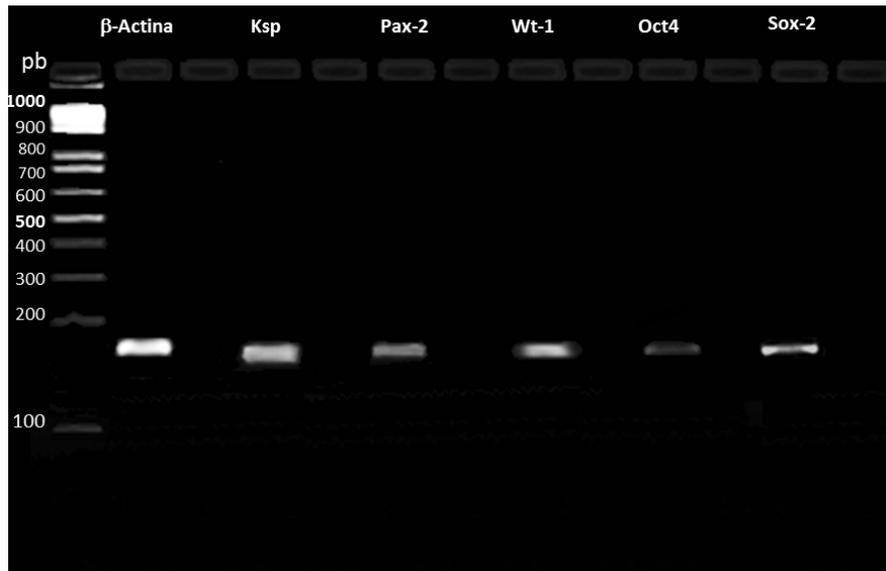
Las condiciones ideales de amplificación para el gen endógeno ( *$\beta$ -Actina*) fue una concentración de 3/3 ng/ul, para *Oct4* fue a una concentración de iniciadores de 9/0.5 ng/ul, para *SOX2* la concentración ideal de los iniciadores fue de 9/3 ng/ul, para *WT1* una concentración de 9/3 ng/ul, para *PAX2* la concentración ideal fue de 9/0.5 ng/ul, y finalmente para *Ksp* de 0.5/9 ng/ul,

Finalizadas las PCRs de amplificación para cada uno de los genes, se corrió una curva de disociación que nos permitió observar un solo pico estrecho para los amplificados y la ausencia de amplificación en los blancos (Figura 14) lo cual indica que las PCRs eran específicas para el fragmento diseñado.



**Figura 14. Curvas de disociación de los oligonucleótidos diseñados.** Se muestran en rojo las curvas de disociación realizadas con cDNA, sintetizado a partir de RNA de riñón de ratón, feto de ratón y mESC y en verde los blancos de reactivos (todos los reactivos de la reacción excepto material genético), A. *β-actina*, B. *Oct4*, C. *SOX2*, D. *WT1*, E. *PAX2* y F. *Ksp*.

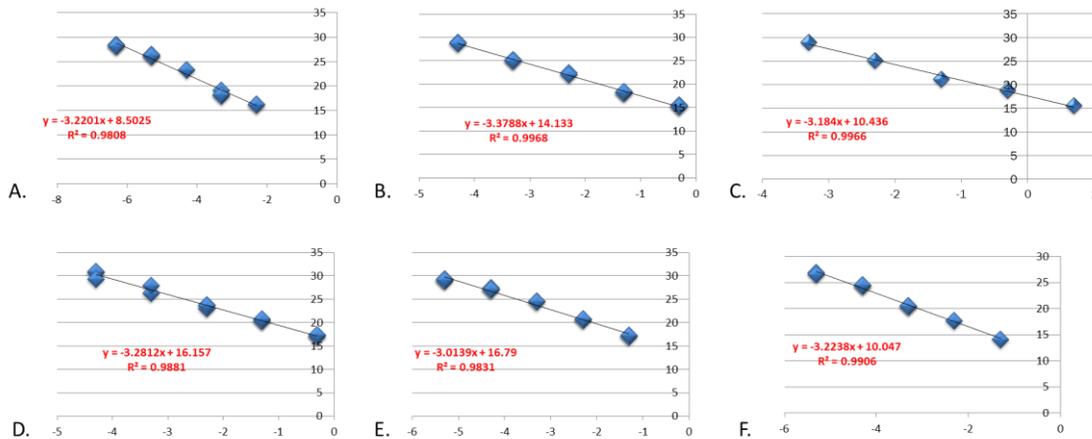
De igual forma se verificó en un gel de agarosa al 3%, la generación de un sólo amplificado y que el tamaño de este correspondía al que previamente se había diseñado, en un gel de agarosa al 3%. (Figura 15).



**Figura 15. Gel de los productos de PCR de los genes estudiados.** Se muestra la amplificación de un sólo amplificado y el tamaño de cada uno de estos corresponde al que previamente se había diseñado en un gel de agarosa al 3%.

## Validación.

Una vez que se logró la estandarización, se procedió a validar la eficiencia de amplificación, realizando diluciones decuplex de producto de PCR y graficando los  $C_T$  obtenidos de la amplificación contra los logaritmos de concentración utilizadas para la amplificación. Las gráficas obtenidas se muestran en la figura 16 donde se observan las pendientes con valores próximos a 3, lo que nos indica eficiencias cercanas al 100% de acuerdo a la ecuación descrita por Rasmussen, validando con esto, los resultados de las PCRs.



**Figura 16. Gráficas con los valores de  $C_T$  de cada uno de los iniciadores ya estandarizados.** Se graficaron los  $C_T$  obtenidos para cada uno de los genes contra el logaritmo de la concentración del cDNA. Con valores de eficiencia y reproducibilidad cercanas al 100% A.  $\beta$  Actina, B. Oct4, C SOX2, D. WT1, E. PAX2 y F. Ksp.

## Evaluación de los cambios de expresión de los genes estudiados.

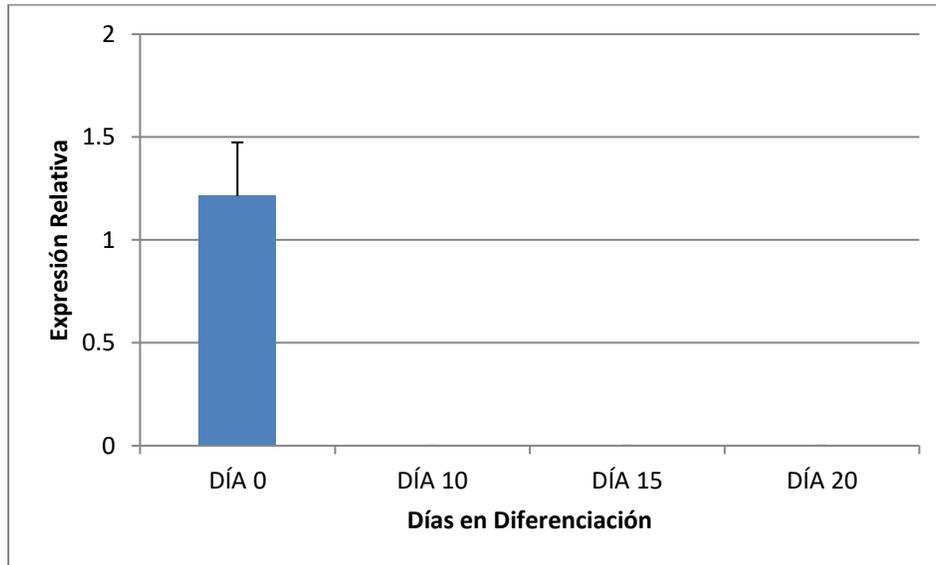
Una vez estandarizado y validado el procedimiento de la PCR en tiempo real, se evaluaron los cambios de expresión relativa para los genes de Oct4, SOX2, WT1, PAX2, y Ksp, la tabla 5 resume los valores del promedio para la expresión relativa ( $\bar{X}$ ) y el error estándar (EE) calculado con las réplicas realizadas para las mESC sin inductores de diferenciación, es decir al día 0 de la diferenciación y las células tratadas con inductores de diferenciación a los 10, 15 y 20 días, así como el valor de “p” para cada uno de los genes analizados.

**TABLA 5. RESUMEN DE LOS VALORES DE EXPRESIÓN RELATIVA EN LOS GENES ANALIZADOS**

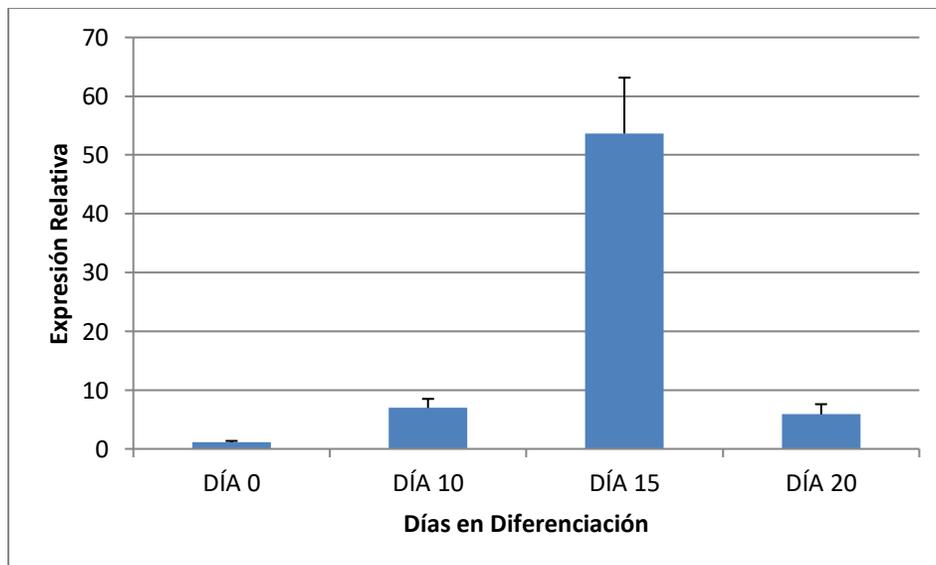
Gen	Día 0 ( $\bar{X} \pm EE$ )	Día 10 ( $\bar{X} \pm EE$ )	Día 15 ( $\bar{X} \pm EE$ )	Día 20 ( $\bar{X} \pm EE$ )
<i>Oct4</i>	1.2133 ± 0.0219	No se detectó el transcrito	No se detectó el transcrito	No se detectó el transcrito
		p < 0.001		
<i>sox-2</i>	1.1334 ± 0.2196	6.9746 ± 1.530	53.6485 ± 9.4989	5.8835 ± 1.7215
		p < 0.001		
<i>PAX2</i>	1.0751 ± 0.1778	78.9301 ± 7.0686	59.0945 ± 8.1849	0.4293 ± 0.332
		p < 0.001		
<i>WT1</i>	1.4234 ± 0.4662	0.3758 ± 0.0114	36.1126 ± 9.9091	0.0928 ± 0.019
		p < 0.001		
<i>Ksp</i>	1.1577 ± 0.2473	0.3758 ± 0.3396	125.8275 ± 20.3421	18.2454 ± 2.270
		p < 0.001		

Se detectó la expresión de *Oct4*, únicamente al día 0 de diferenciación, expresándose 1.2133 veces más en comparación con los días 10, 15 y 20 de diferenciación (Gráfica 1). *SOX2* presentó una expresión de 1.1334 veces al día 0, al día 10 de diferenciación incrementó su expresión 6.9746 veces más, siendo aún más notorio su aumento de expresión al día 15, ya que se expresó 53.6485 veces más que al día 0, sin embargo, al día 20 de diferenciación, la expresión disminuyó a 5.8835 veces la expresión basal del control (Gráfica 2). La expresión de *PAX2* en las mESC, es decir al día 0 de diferenciación fue de 1.0751, sin embargo, al día 10 de diferenciación, la expresión aumentó considerablemente hasta 78.9301 veces respecto al día 0, y en el día 15 la expresión bajó a un valor de 59.0945 veces, y disminuyó su expresión hasta 0.4293 veces (Gráfica 3). Respecto a la expresión del gen *WT1*, al día 0 de diferenciación su expresión fue de 1.4234 pero al día 10 su expresión disminuyó 0.3758 veces, sin embargo, al día 15 se elevó la expresión 36.1126 veces para finalmente disminuir su expresión al día 20, presentando una expresión relativa de 0.0928 (Gráfica 4). Finalmente, *Ksp* mostró una expresión de 1.1577 al día 0 de diferenciación, y de 0.3758 al día 10 de diferenciación, alcanzando valores de 125.8275 veces más que en las células en día 0 de

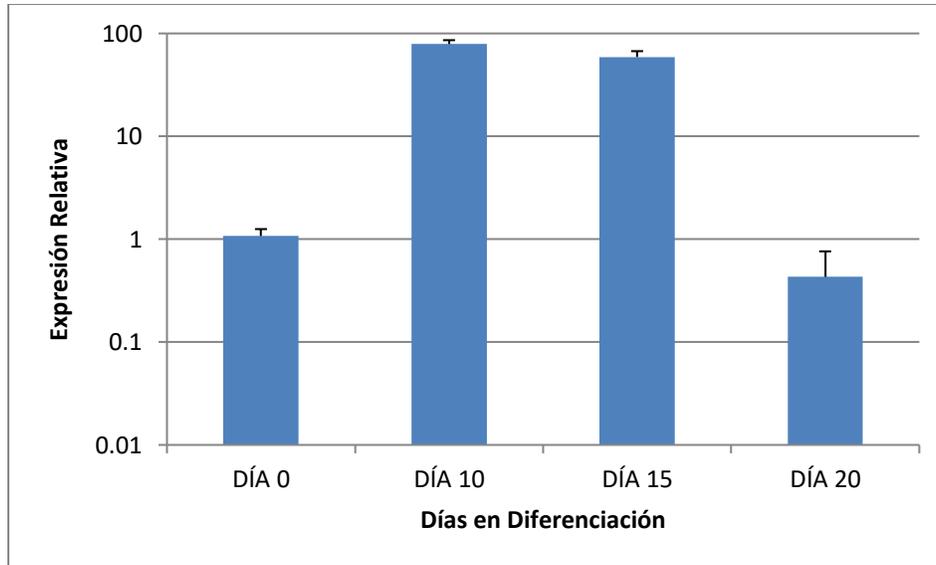
diferenciación, disminuyendo su expresión relativa a 18.2454 al día 20 de diferenciación (Gráfica 5).



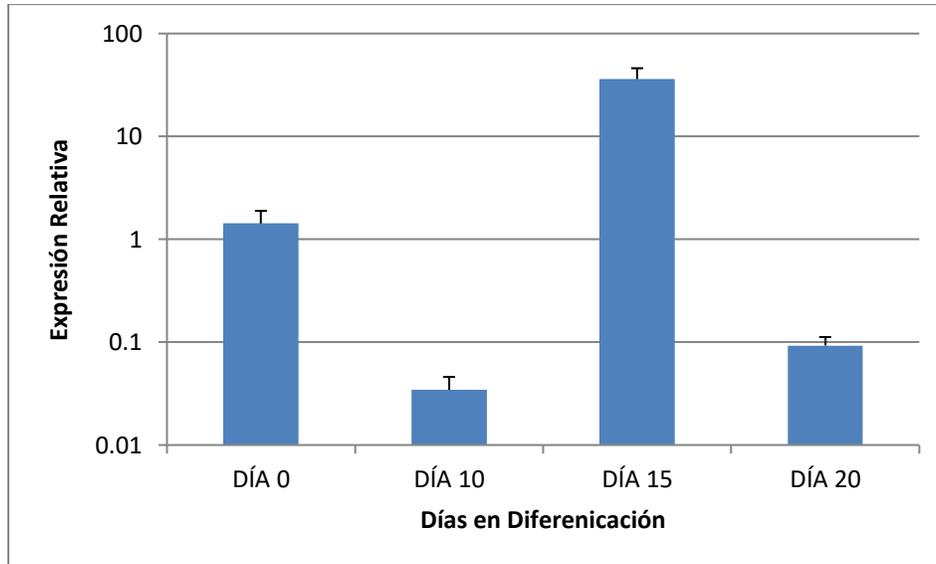
**Gráfica 1. Expresión relativa del gen *Oct4*.** Valores de la expresión relativa del gen *oct4* a los días 0, 10, 15 y 20 de diferenciación.



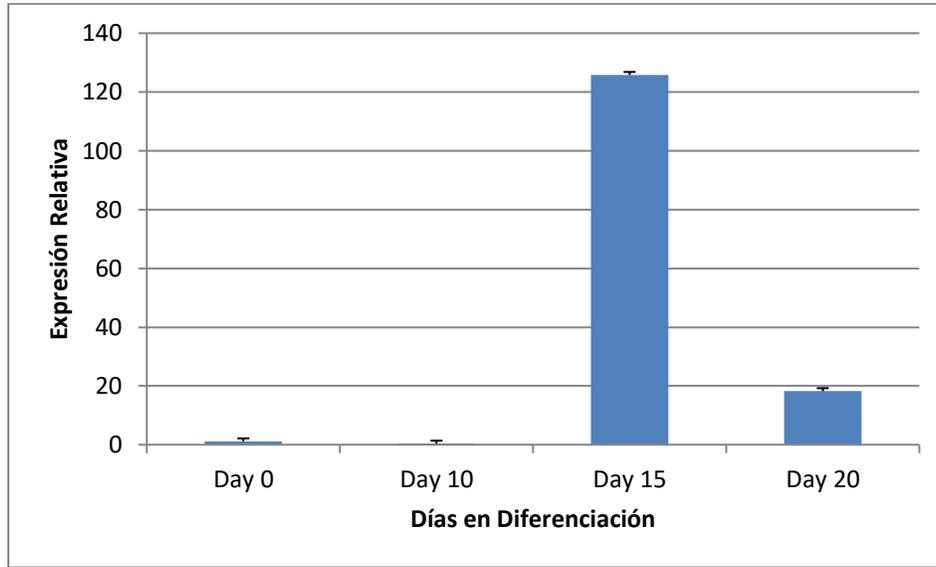
**Gráfica 2. Expresión relativa del gen *SOX2*.** Valores de la expresión relativa del gen *SOX2* a los días 0, 10, 15 y 20 de diferenciación.



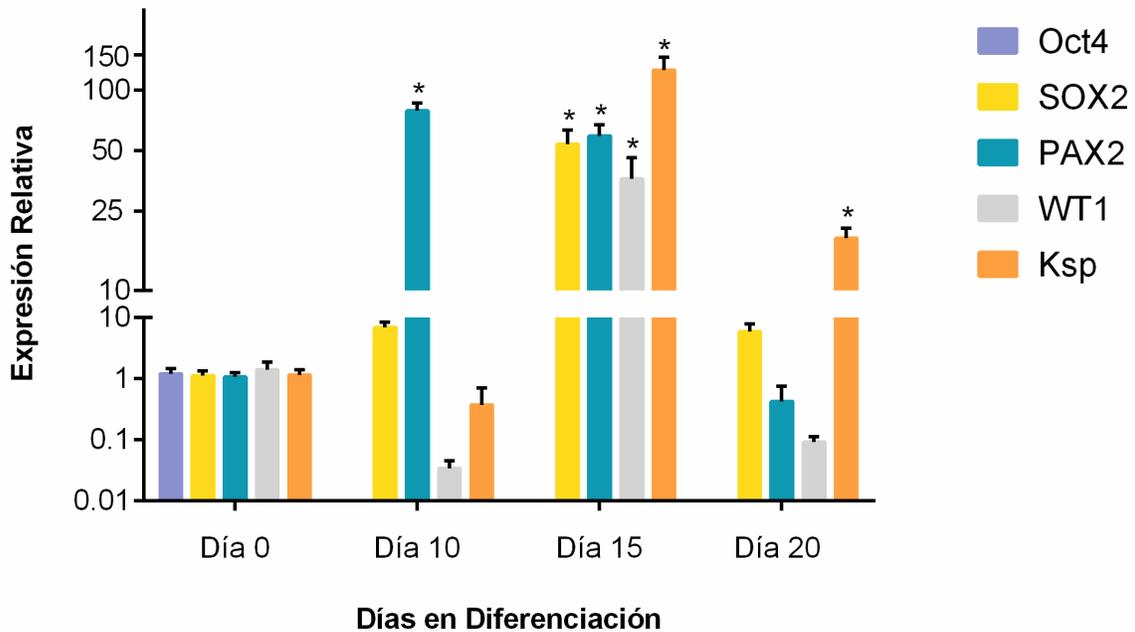
**Gráfica 3. Expresión relativa de *PAX2*.** Valores de la expresión relativa del gen *PAX2* a los días 0, 10, 15 y 20 de diferenciación.



**Gráfica 4. Expresión relativa de *WT1*.** Valores de la expresión relativa del gen *WT1* a los días 0, 10, 15 y 20 de diferenciación.



**Gráfica 5. Expresión relativa de *Ksp*.** Valores de la expresión relativa del gen *Ksp* a los días 0, 10, 15 y 20 de diferenciación.

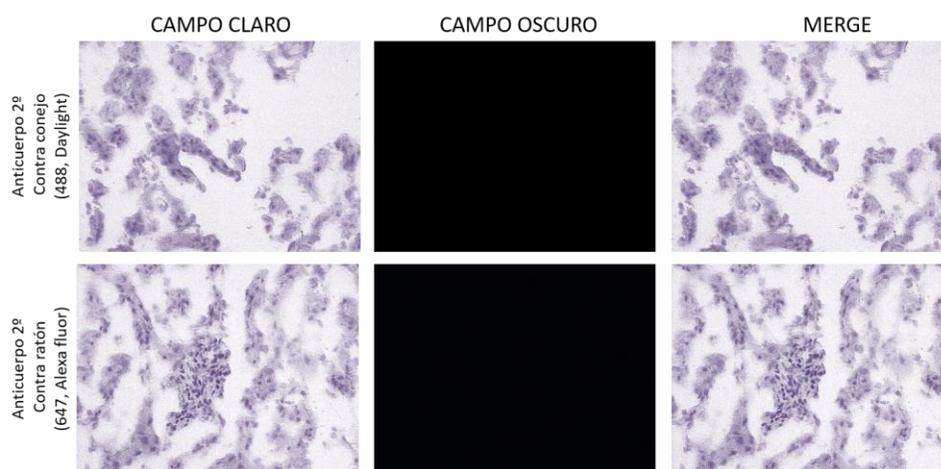


**Gráfica 6. Conglomerado de la expresión de los genes analizados.** La PCR se realizó por triplicado y los niveles de expresión se normalizaron contra  $\beta$ -actina. Las barras representan las medias  $\pm$  SD. \* indica las CRD que mostraron diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) con respecto a la expresión relativa de las mESC (día 0 de diferenciación).

## Titulación de anticuerpos para la microscopía de fluorescencia.

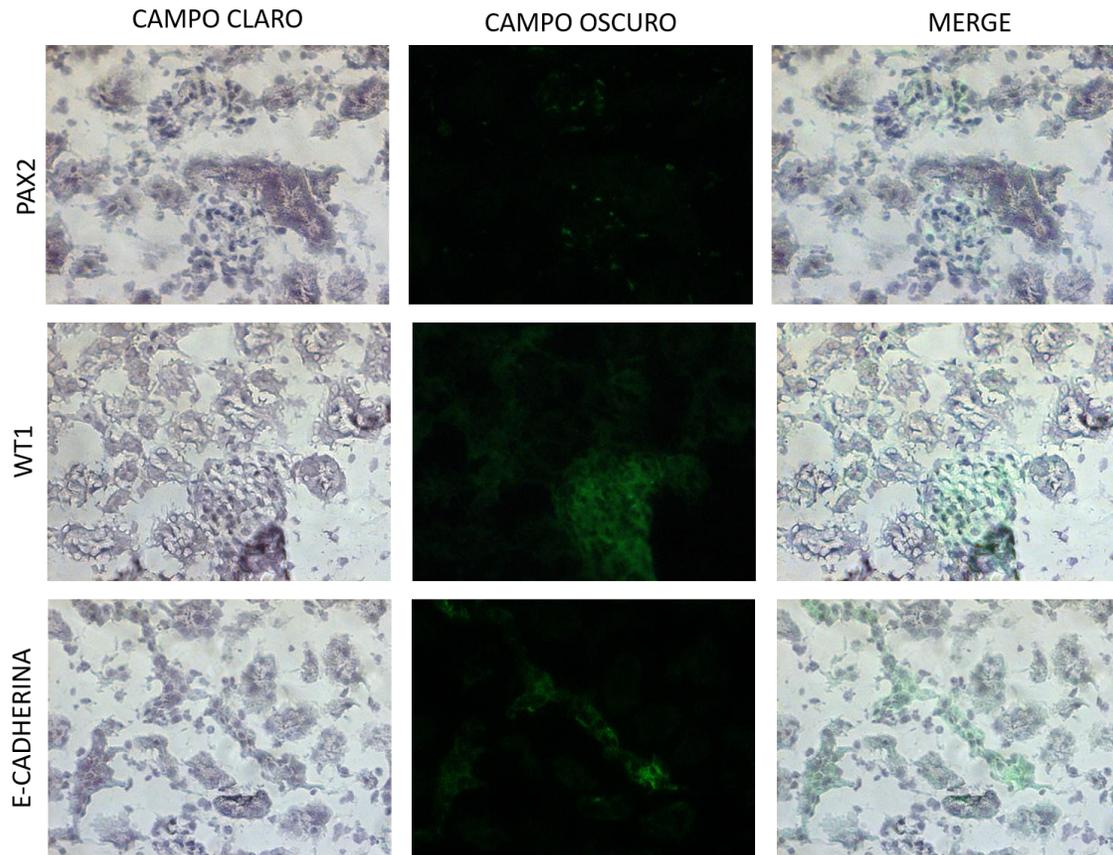
Para comprobar la presencia de las proteínas SSEA1, Oct4, PAX2, WT1 y E-cadherina en mESC y en CRD, fue necesario realizar las titulaciones de los anticuerpos primarios y secundarios, para lo cual se analizaron las preparaciones citológicas e histológicas antes citadas de acuerdo a la metodología descrita, resultando las titulaciones más adecuadas las que se indican en la tabla 6.

De acuerdo a las titulaciones establecidas, la figura 17 representa los controles negativos en los cortes histológicos de riñón de ratón donde se descarta autofluorescencia del tejido renal.



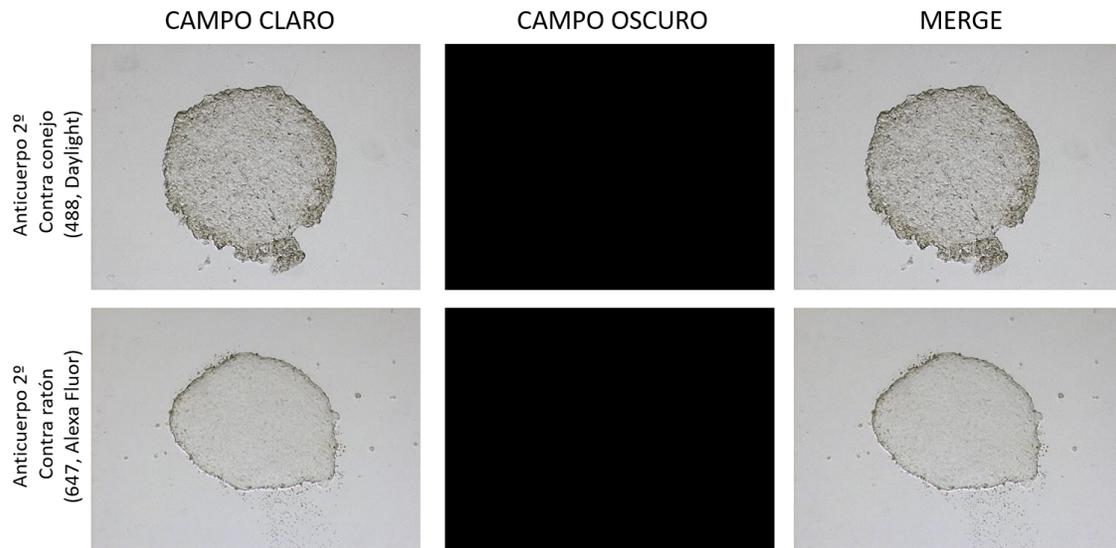
**Figura 17. Controles negativos durante la titulación en riñón de ratón.** Imagen representativa de ausencia de autofluorescencia en el tejido renal (200X).

En la figura 18, se muestran los controles positivos durante la titulación en cortes histológicos de riñón de ratón, demostrando la funcionalidad y el marcaje de los Abs primarios contra PAX2, WT1 y E-cadherina.

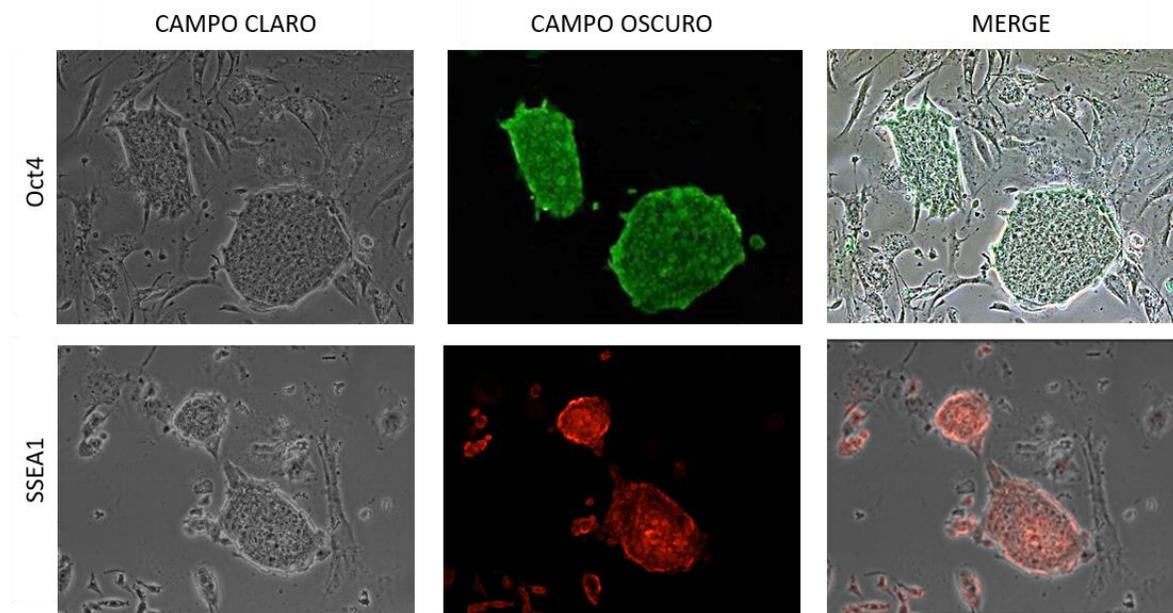


**Figura 18. Controles positivos en riñón de ratón.** Imagen representativa de inmunodetección de las proteínas PAX2, WT1 y E-cadherina en cortes histológicos de riñón de ratón (200 X).

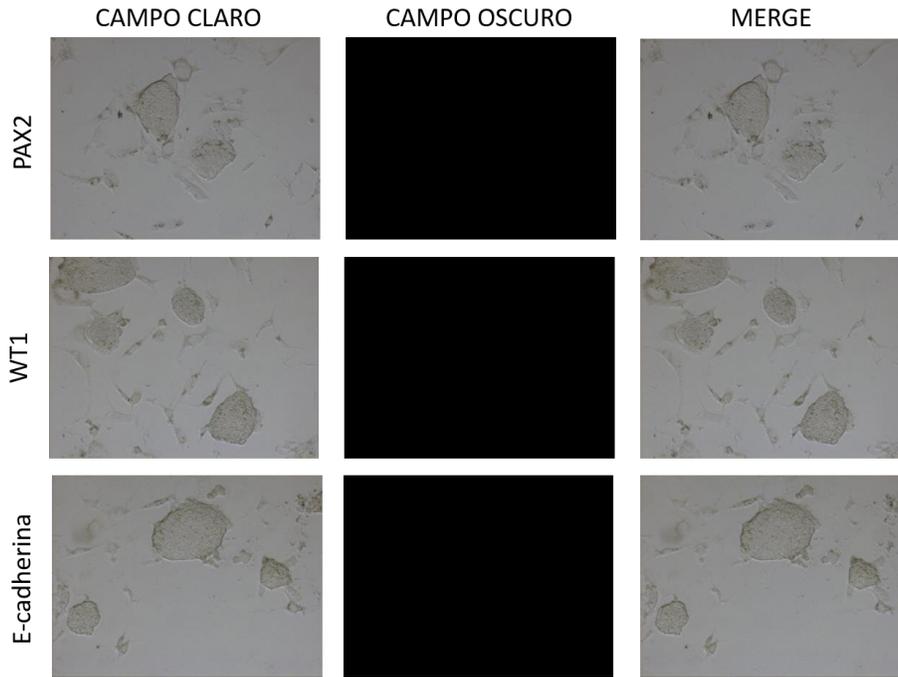
De igual forma, se hicieron las titulaciones de los anticuerpos marcadores de pluripotencia Oct4 y SSEA1 en mESC. En la figura 19, se muestran los controles negativos con la finalidad de descartar auto fluorescencia, en tanto en la figura 20, se muestran los controles positivos con lo que se comprueba la funcionalidad y el marcaje de los anticuerpos, así como el estado de pluripotencia de las ESC cultivadas. En la figura 21 se demuestra la ausencia de expresión de proteínas renales (PAX2, WT1 y E-cadherina) en mESC. Sin embargo, al someter dichas mESC al protocolo de diferenciación renal, se formaron EBs en los que se puede observar inmunodetección de PAX2, WT1 y E-cadherina al día 18 de diferenciación (Figura 22).



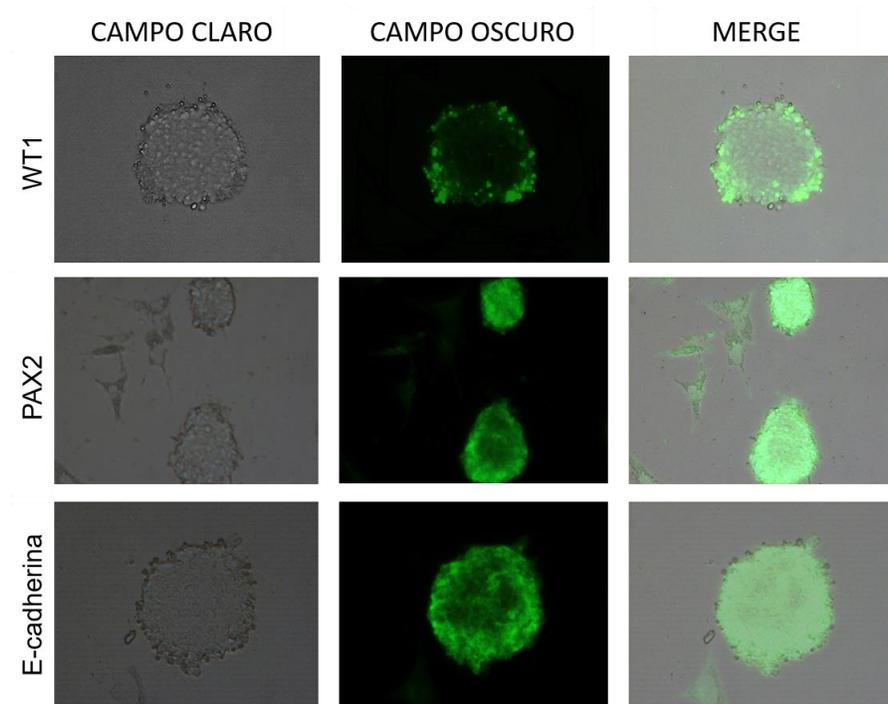
**Figura 19. Controles negativos durante la titulación en cultivos de mESC.** Imagen representativa de ausencia de autofluorescencia en mESC para los anticuerpos secundarios conjugados contra conejo (Dylight 488) y contra ratón (Alexa Fluor 647) N=3. (200X).



**Figura 20. Controles positivos en cultivos de mESC.** Imagen representativa de inmunodetección de las proteínas Oct4 y SSEA-1 (marcadores de pluripotencia) en las mESC cultivadas, N=3. (100X). En la figura 20, se evidencia la ausencia de inmunodetección de las proteínas PAX2, WT1 y E-cadherina en mESC.

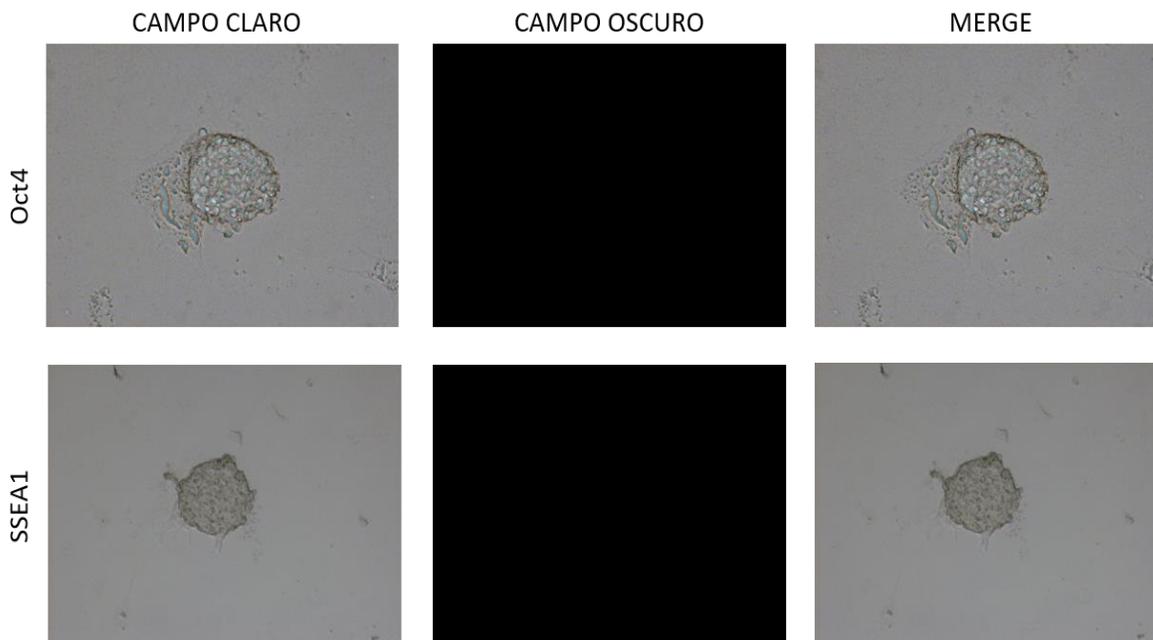


**Figura 21. Ausencia de proteínas renales en mESC.** Imagen representativa de ausencia de inmunodetección de PAX2, WT1 y E-cadherina en mESC, N=3 (100X).



**Figura 22. Inmunodetección de proteínas renales en CRD.** Imagen representativa de la presencia de las proteínas PAX2, WT1 y E-cadherina en cuerpos embrionarios (EB) conformados por células renales diferenciadas a partir de células madre embrionarias (ESC) de ratón. N=3 (100X).

En la figura 23 se presentan EBs a los 18 días de diferenciación, en los que se descarta inmunodetección para los marcadores de pluripotencia Oct4 y SSEA1, comprobándose la pérdida de pluripotencialidad en las mESC diferenciadas a CRD.

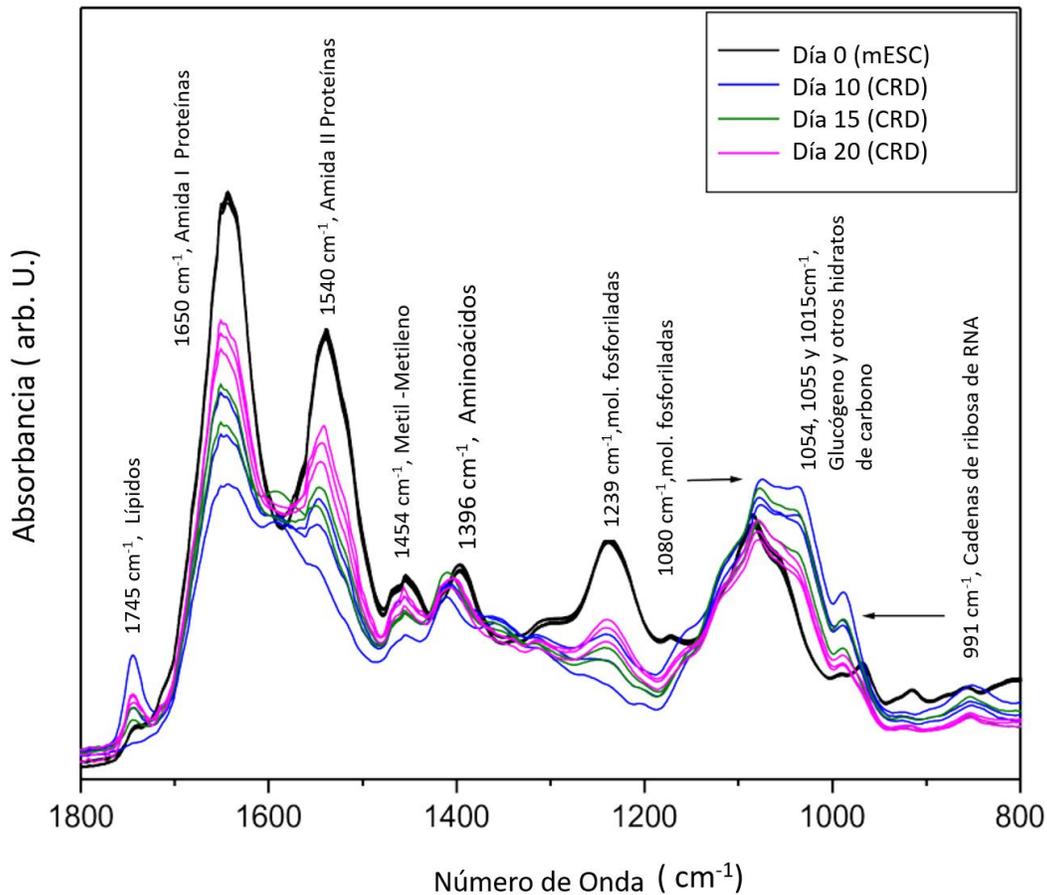


**Figura 23. Ausencia de pluripotencialidad en CRD.** Imagen representativa de ausencia de inmunodetección de Oct4 y SSEA1 en EBs al día 18 de diferenciación. N=3. (100X)

### Análisis espectroscópico

Se analizaron por FTIR en modo ATR las líneas celulares de mESC y CRD en momentos específicos de la diferenciación (días 10,15 y 20), usando la normalización SNV, los resultados de los espectros obtenidos se muestran en la figura 24, una banda de absorción a  $1745\text{ cm}^{-1}$  está relacionada con la vibración de extensión del grupo éster  $\text{C} = \text{O}$  de los lípidos, mientras que dos bandas intensas a  $1650\text{ cm}^{-1}$  y  $1540\text{ cm}^{-1}$  están relacionadas con los grupos funcionales amida I y amida II de las proteínas, respectivamente. Otra banda a  $1454\text{ cm}^{-1}$  proviene de los grupos metilo y metileno de los lípidos y proteínas, mientras que la banda a  $1396\text{ cm}^{-1}$  se debe a las vibraciones  $\text{COO}^-$  de estiramiento de las cadenas laterales de aminoácidos. La banda a  $1239\text{ cm}^{-1}$  se relaciona con el estiramiento asimétrico del enlace  $\text{P} = \text{O}$  de grupos fosfodiéster  $\text{PO}_2$  de moléculas fosforiladas, mientras que la banda a  $1080\text{ cm}^{-1}$  proviene del estiramiento simétrico  $\text{P} = \text{O}$  de grupos fosfodiéster

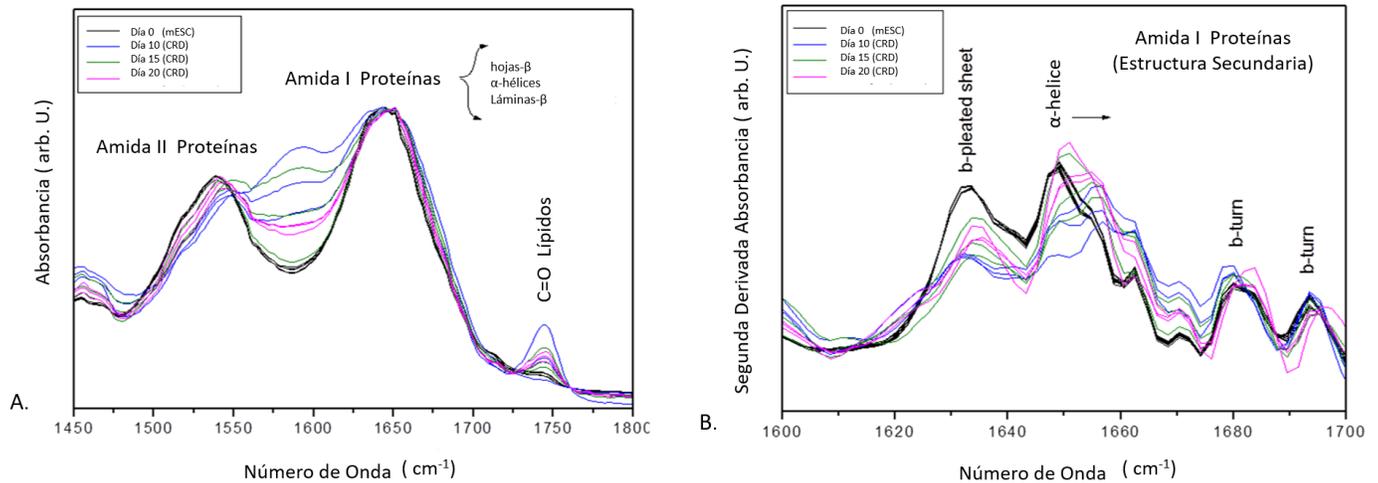
PO<sub>2</sub> de moléculas fosforiladas y glucógeno. Otras bandas a 1154 cm<sup>-1</sup>, 1055 cm<sup>-1</sup> y 1015 cm<sup>-1</sup>, se relacionan con vibraciones C-O de glucógeno y otros carbohidratos (20). Por último, la banda a 991 cm<sup>-1</sup> se debe principalmente al modo extensión C-O de la cadena de ribosa de RNA.



**Figura 24. Espectros FTIR** de Células madre de ratón (mESC) y células renales diferenciadas (DKC), medidos en la región de la huella digital. Se observan bandas de absorción relacionadas con lípidos, proteínas y moléculas fosforiladas (N = 3)

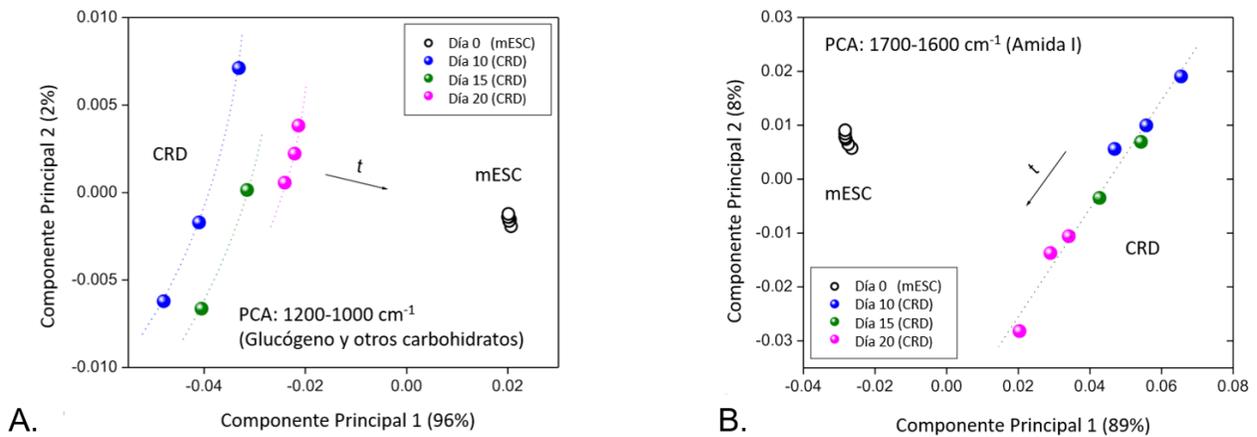
La figura 25A muestra los espectros FTIR de SNV tanto de las mPSC como de las DKC en momentos específicos de diferenciación en la región proteica (1800-1450 cm<sup>-1</sup>), de amida I (1650 cm<sup>-1</sup>) y la amida II (1540 cm<sup>-1</sup>) de las proteínas. Por otra parte, los espectros de segunda derivada de las mismas muestras en la región del grupo amida I (1700-1600 cm<sup>-1</sup>) calculados con el algoritmo de Savitzky-Golay permitieron la identificación de varias bandas asociadas a la estructura secundaria presentes en las proteínas, como hélices β (1694 cm<sup>-1</sup> y 1680 cm<sup>-1</sup>), hélices α (1650

$\text{cm}^{-1}$ ) y láminas  $\beta$  ( $1633 \text{ cm}^{-1}$ ); de la misma manera, se observaron diferencias entre mESCs y CRD en tres bandas a  $1675 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1670 \text{ cm}^{-1}$  y  $1633 \text{ cm}^{-1}$ , que también se relacionan con asparagina, glutamina y arginina respectivamente (Figura 25B).



**Figura 25. Segunda derivada de los espectros FTIR.** Espectros de células madre embrionarias de ratón (mESC) y células diferenciadas de riñón (CRD) en la región de proteínas. (A) espectros en crudo con normalización SNV (B) Espectros de segunda derivada. (N = 3).

En la figura 26 se muestran las gráficas de puntuación obtenidas para los dos primeros componentes principales después del PCA con los espectros de segunda derivada de mESCs y CRD a los 10, 15 y 20 días. El PCA se realizó en dos regiones espectrales:  $1700\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$  (amida I de las proteínas) y  $1200 - 1000 \text{ cm}^{-1}$  (glucógeno y otros hidratos de carbono). El primer componente principal para ambas regiones exploradas nos permitió discriminar mESCs y CRD, y en la región de glucógeno y otros carbohidratos, las tres diferentes etapas de diferenciación se pueden distinguir siguiendo un patrón radial de acuerdo con el tiempo de diferenciación. Por otro lado, el segundo componente principal en la región amida I permitió evidenciar el proceso de diferenciación inicial y final mostrando un patrón lineal según el proceso de diferenciación.



**Figura 26. Análisis de Componentes Principales (PCA).** Datos obtenidos de los espectros FTIR normalizados de células madre embrionarias de ratón (mESC) y células renales diferenciadas (CRD) a los días 10, 15 y 20 de diferenciación (N = 3).

### Modelo murino con lesión renal

Como se comentó con anterioridad, para la estandarización de la lesión renal se probaron 5 dosis diferentes (50, 35, 20, 18 y 20 mg/kg). La lesión renal se determinó de acuerdo a los valores séricos de creatinina y BUN. En las siguientes tablas se muestran los resultados obtenidos con las diferentes dosis.

**TABLA 6. PERFIL BIOQUÍMICO DEL GRUPO DE ESTUDIO 1 (50mg/kg)**

No. RATÓN	PESO (g)	CISPLATINO 50mg/ kg/ ip DOSIS (mg)	PREINDUCCIÓN						INDUCCIÓN DEL DAÑO RENAL CON CISPLATINO	72 HORAS POSTINDUCCIÓN					
			UREA	BUN	CRE	AUR	GLU	TRI		UREA	BUN	CRE	AUR	GLU	TRI
A1	30.2	1.057	52.8	24.65	0.74	1.94	142	152	628	293.28	3.14	3.06	218	92	
A2	33.6	1.176	80.1	37.4	0.84	2.82	132	234	529	247.04	2.96	0.19	458	62	
A3	32	1.12	80.4	37.54	0.74	2.08	204	316	62.3	29.094	1.26	1.89	147	399	
A4	29.4	1.029	84.6	39.5	0.78	1.74	171	150	680	317.56	2.76	0.14	404	16	
A5	20	0.7	82.4	38.48	0.72	1.28	150	92	*	221.74	2.53	*	*	*	

Con una única dosis de 50mg/kg observamos un aumento considerable de BUN, urea y creatinina a las 72 hrs, sin embargo, la letalidad registrada fue de 100% a los 4 días.

**TABLA 7. PERFIL BIOQUÍMICO DEL GRUPO DE ESTUDIO 2 (35mg/kg)**

No. RATÓN	PESO (g)	CISPLATINO 35mg/ kg/ ip DOSIS (mg)	PREINDUCCIÓN						INDUCCIÓN DEL DAÑO RENAL CON CISPLATINO	72 HORAS POSTINDUCCIÓN					
			UREA	BUN	CRE	AUR	GLU	TRI		UREA	BUN	CRE	AUR	GLU	TRI
B1	30	1.05	85.8	40.06	1.11	3.03	135	183	76.5	35.72	1.62	3.99	147	63	
B2	30	1.05	85.2	39.78	1.2	1.92	138	237	33.6	15.69	2	5.4	252	80	
B3	26	0.91	101.7	47.49	1.26	3.9	180	159	450	210.15	2.22	1.56	204	78	
B4	26	0.91	115.5	53.93	1.5	2.58	141	291	176.6	82.47	2.28	2.82	312	198	
B5	30	1.05	89.7	41.88	1.59	3.36	156	180	*	86.09	2.03	*	*	*	

Con una sola dosis de 35 mg/kg observamos un aumento considerable de BUN, urea y creatinina a las 72 hrs, sin embargo, la letalidad registrada fue de 80% a los 4 días y 100% a los 5 días postinducción.

**TABLA 8. PERFIL BIOQUÍMICO DEL GRUPO DE ESTUDIO 3 (20mg/kg)**

No. RATÓN	PESO (g)	CISPLATINO 20 mg/ kg/ ip DOSIS (mg)	PREINDUCCIÓN						INDUCCIÓN DEL DAÑO RENAL CON CISPLATINO	72 HORAS POSTINDUCCIÓN					
			UREA	BUN	CRE	AUR	GLU	TRI		UREA	BUN	CRE	AUR	GLU	TRI
C1	26.5	0.53	65.4	30.5418	0.8	1.42	160	65.4	230.4	107.6	2.72	2.72	108	164	
C2	33	0.66	67.2	31.3824	0.76	1.08	174	67.2	139	65	1.31	*	*	*	
C3	33	0.66	61.2	28.5804	0.88	0.94	190	61.2	98.8	46.14	0.78	3.54	170	36	
C4	28	0.56	69.3	32.3631	0.34	1.05	162	69.3	122.7	57.3	0.87	6.57	144	57	
C5	33	0.66	72.2	33.7174	0.84	1.82	114	72.2	105	49.04	0.87	6.57	165	36	

Con una dosis de 20mg/kg pudimos observar que también se producía un daño renal, al aumentar el BUN, la urea y la creatinina, y la letalidad disminuyó a un 20% a los 4 días y a 60% a los 5 días.

**TABLA 9. PERFIL BIOQUÍMICO DEL GRUPO DE ESTUDIO 4 (18mg/kg)**

No. RATÓN	PESO (g)	CISPLATINO 18 mg/ kg/ ip DOSIS (mg)	PREINDUCCIÓN						INDUCCIÓN DEL DAÑO RENAL CON CISPLATINO	72 HORAS POSTINDUCCIÓN					
			UREA	BUN	CRE	AUR	GLU	TRI		UREA	BUN	CRE	AUR	GLU	TRI
D1	27.5	0.495	41.6	19.4272	0.76	1.78	184	120	151.2	70.61	0.88	1.14	172	74	
D2	27.5	0.495	56.8	26.5256	0.55	1.62	139	319	69.6	32.503	1.2	1.41	147	57	
D3	26	0.468	63.8	29.7946	1.06	2.52	186	92	97.5	45.533	1.75	2.6	200	55	
D4	23.5	0.423	59.6	27.8332	0.86	0.96	154	114	89.4	41.75	1.38	1.89	162	60	
D5	30	0.54	70	32.69	1.04	1.02	218	174	*	*	*	*	*	*	

En el grupo de estudio que recibió 18mg/kg también hubo un aumento considerable de la urea, BUN y creatinina, presentando una letalidad de 20% a los 4 días y de 40% a los 5 días postinducción.

**TABLA 10. PERFIL BIOQUÍMICO DEL GRUPO DE ESTUDIO 5 (15mg/kg)**

No. RATÓN	PESO (g)	CISPLATINO 15 mg/ kg/ ip DOSIS (mg)	PREINDUCCIÓN						INDUCCIÓN DEL DAÑO RENAL CON CISPLATINO	72 HORAS POSTINDUCCIÓN					
			UREA	BUN	CRE	AUR	GLU	TRI		UREA	BUN	CRE	AUR	GLU	TRI
E1	38	0.57	50.53	23.6	0.2	2.52	116	120	76.23	35.6	1.2	4.92	102	58	
E2	34.5	0.5175	56.31	26.3	0.6	2.46	157	319	74.95	35	0.9	2.96	194	54	
E3	34.5	0.5175	66.16	30.9	0.7	2.19	182	92	71.52	33.4	0.7	4.58	176	62	
E4	34.3	0.5145	58.67	27.4	0.2	3.1	184	114	73.45	34.3	1.3	3.28	154	47	
E5	28.2	0.423	64.23	30	0.3	3.38	148	174	71.52	33.4	0.8	2.1	178	43	

Finalmente, con una dosis de 15mg/kg pudimos observar que el daño renal producido no fue tan significativo el BUN, la urea y la creatinina, y la letalidad disminuyó considerablemente a 20% a los 4 días y a 0% a los 5 días.

En la tabla 11 se resumen los datos de interés de los grupos de estudios presentándose los datos como media  $\pm$  Desviación estándar.

**TABLA 11. PERFIL BIOQUÍMICO DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO 72 HORAS POSTERIORES A LA INDUCCIÓN DEL DAÑO RENAL**

GRUPO	DOSIS (mg/kg)	BUN (mg/dl) $\pm$ SD	CREATININA (mg/dl) $\pm$ SD	LETALIDAD (5 DÍAS)
1	50	221 $\pm$ 102	2.53 $\pm$ 0.67	100%
2	35	86 $\pm$ 67.7	2.03 $\pm$ 0.23	100%
3	20	65 $\pm$ 53.4	1.3 $\pm$ 0.8	60%
4	18	47 $\pm$ 12.6	1.3 $\pm$ 0.3	40%
5	15	34 $\pm$ 0.87	0.9 $\pm$ 0.2	0%

Se tomó como dosis ideal para la IDR 18mg/kg, ya que con esta dosis nos aseguramos mediante análisis bioquímicos del daño renal, al presentarse una elevación de la creatinina y del BUN a las 72 hrs posteriores a la IDR y la letalidad presentada a los 5 días de post-IDR fue del 40%.

## Análisis bioquímico en los grupos de estudio

Una vez que se estandarizó la dosis ideal para la IDR con una letalidad menor de 40% a los 5 días de postinducción, se procedió a probar el tratamiento experimental de terapia celular con mESC para lo cual se dividieron dos grupos de estudio, grupo 1 (control, tratado con SSI) y grupo 2 (experimental, tratado con  $1 \times 10^6$  mESC). Los tratamientos fueron administrados a las 24 hrs, 7 y 13 días post-IDR, y a los días 3, 12 y 20 días post-IDR se les realizó un perfil bioquímico de 3 elementos (creatinina, BUN y glucosa). En la tabla 12 se muestran los parámetros normales de creatinina, BUN y glucosa en ratones sanos.

**TABLA 12. PARÁMETROS NORMALES DEL PERFIL BIOQUÍMICO**

ELEMENTO	mg/dl
Creatinina	0.2 - 0.9
BUN	8.0 - 33.0
Glucosa	62 - 175

Los resultados obtenidos en los grupos de estudio se muestran en la tabla 13, evidenciándose una elevación de creatinina y BUN tres días posteriores a la IDR en ambos grupos, sin presentarse cambios significativos en los niveles séricos de glucosa, el grupo control presentó un aumento en la creatinina de  $\bar{X} = 0.77$  mg/dl  $\pm$  0.14 a  $\bar{X} = 1.76$  mg/dl  $\pm$  0.73, mientras que el grupo experimental (tratado con mESC) de  $\bar{X} = 0.69$  mg/dl  $\pm$  0.11 a  $\bar{X} = 1.62$  mg/dl  $\pm$  0.74, sin embargo respecto al BUN el grupo control reportó un aumento de  $\bar{X} = 27.20 \pm 4.7$  mg/dl a  $\bar{X} = 50$  mg/dl  $\pm$  12.19, mientras que el grupo experimental de  $\bar{X} = 30.80$  mg/dl  $\pm$  4.13 a  $\bar{X} = 40.80$  mg/dl  $\pm$  2.16. A los días 12 y 20 posteriores a la inducción del daño, los valores séricos de creatinina y BUN fueron disminuyendo hasta alcanzar valores dentro de los parámetros normales al día 20, el grupo control presentó una creatinina de  $\bar{X} = 1.0$  mg/dl  $\pm$  0.2 y el grupo experimental  $\bar{X} = 1.04$  mg/dl  $\pm$  0.17, respecto al BUN el grupo control tuvo valores de  $\bar{X} = 23.3$  mg/dl  $\pm$  3.0 y el grupo experimental de  $\bar{X} = 28.4$  mg/dl  $\pm$  7.6 (Gráficas 7, 8 y 9). Aunque no se presentó significancia estadística

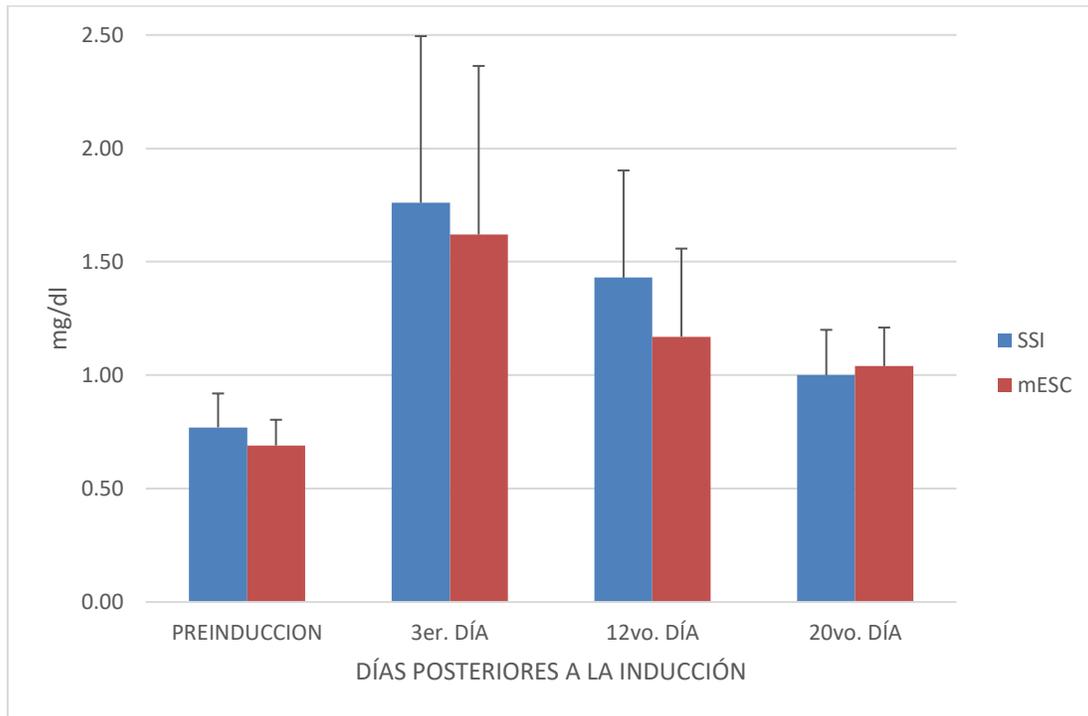
entre los grupos, los cambios más representativos se dieron a los 3 días posteriores a la IDR.

**TABLA 13. PERFIL BIOQUÍMICO DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO**

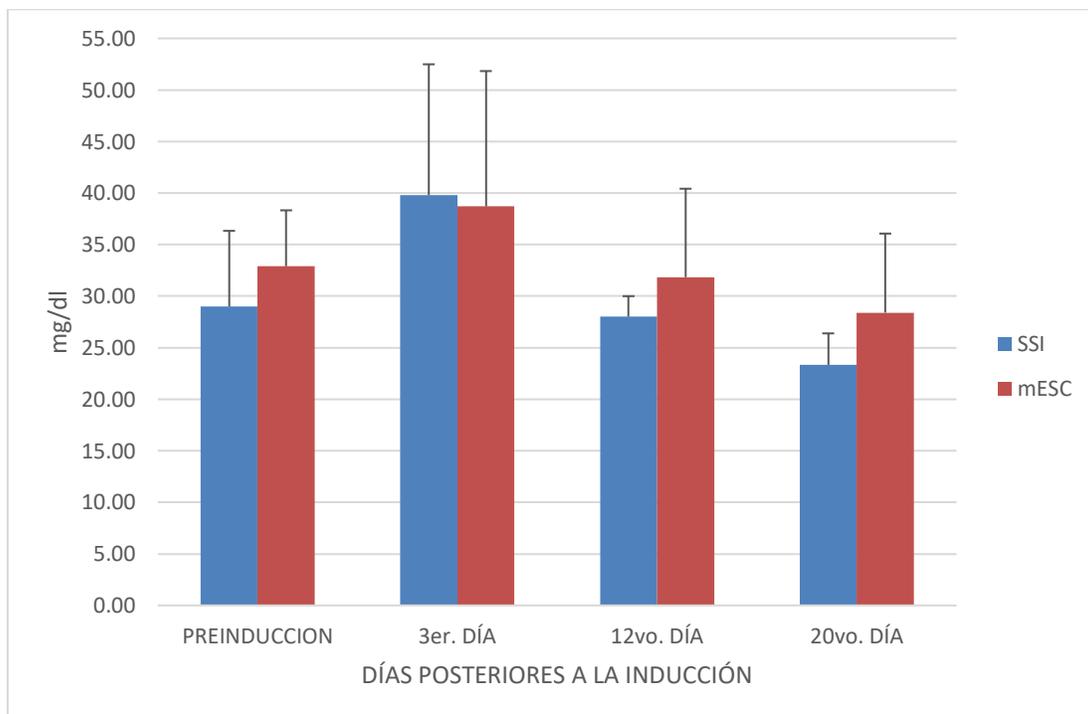
DATOS		PREINDUCCIÓN			24 Hrs	3er. DÍA			7mo. DÍA	12vo. DÍA			13vo. DÍA	20vo. DÍA		
GPO	RATÓN	CREAT. mg/dl	BUN mg/dl	GLUC mg/dl		CREAT. mg/dl	BUN mg/dl	GLUC mg/dl		CREAT. mg/dl	BUN mg/dl	GLUC mg/dl		CREAT. mg/dl	BUN mg/dl	GLUC mg/dl
GRUPO 1 (CONTROL)	R1	0.9	30	165	TRATAMIENTO	2.1	72	159	TRATAMIENTO				TRATAMIENTO			
	R2	0.8	27	180		1.8	38	180		1.8	28.0	160.0		0.8	20.0	148.0
	R3	0.6	22	120		*	36	*		0.9	30.0	133.0		1.2	24.0	152.0
	R4	0.6	30	165		1.2	48	165								
	R5	0.9	30	150		3.0	60	150								
	R6	0.9	27	180		0.9	45	150		1.6	26.0	128.0		1.0	26.0	144.0
	R7	0.6	24	120		2.1	39	156								
	R8	0.9	30	165		1.5	60	156								
	R9	0.9	34	222		1.5	42	165								
	R10	0.6	18	100		3.0	60	150								
	MEDIA	0.77	27.20	156.70		1.76	50.00	160.13		1.433	28.000	140.333		1.00	23.33	148.00
	SD	0.149	4.70	35.761		0.734	12.19	9.836		0.472	2	17.214		0.20	3.06	4.00
GRUPO 2 (MESC)	R11	0.6	32	120	TRATAMIENTO	1.4	38	124	TRATAMIENTO				TRATAMIENTO			
	R12	0.8	32	102		1	28	135								
	R13	0.6	32	132		1.8	45	225		1.4	34.0	88.0		*	*	*
	R14	0.6	30	112		3.3	63	156								
	R15	0.6	28	110		1.2	39	159		1.2	38.0	96.0		0.8	20.0	126.0
	R16	0.9	24	180		0.9	45	159		0.8	34.0	126.0		1.2	22.0	118.0
	R17	0.6	40	110		2.1	54	183		1.8	42.0	100.0		1.0	38.0	110.0
	R18	0.8	30	148		0.9	21	150		0.8	20.0	124.0		1.2	34.0	156.0
	R19	0.8	28	146		2.1	42	225								
	R20	0.6	32	130		1.5	33	156		1.0	23.0	123.0		1.0	28.0	130.0
	MEDIA	0.69	30.80	128.89		1.62	40.80	167.20		1.17	31.83	109.50		1.04	28.40	128.00
	SD	0.113	4.13	23.762		0.743	2.16	34.181		0.388	8.58	16.73		0.17	7.67	17.44

	Muerto
--	--------

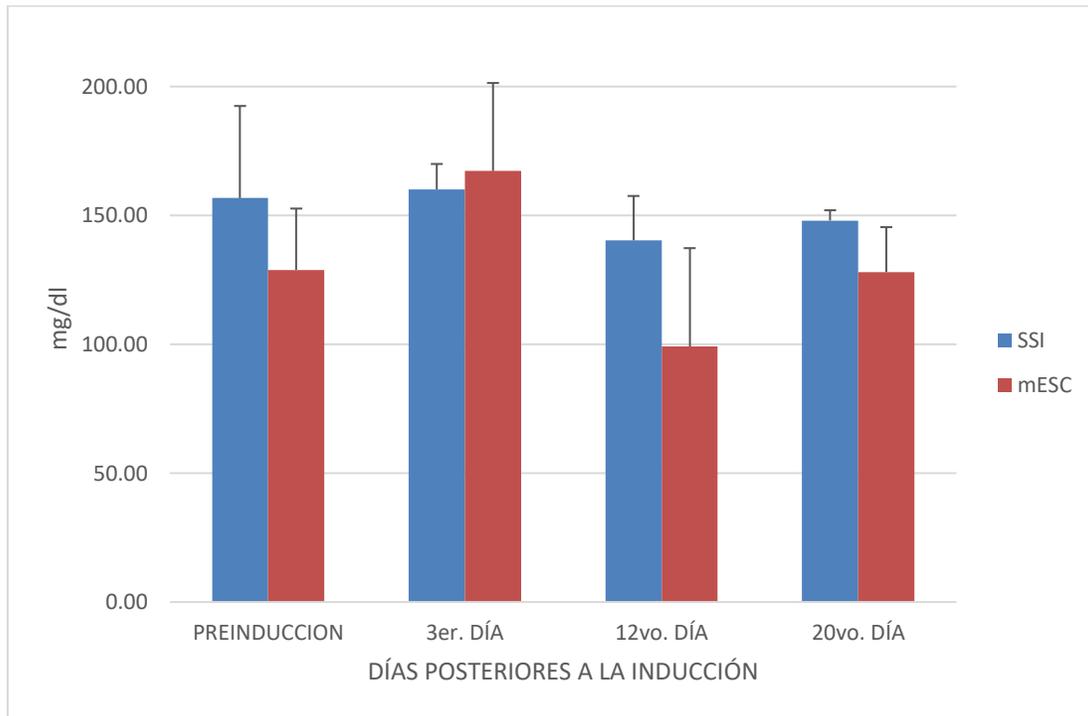
*	Muestra Insuficiente
---	----------------------



**Gráfica 7. Promedios de los valores séricos de creatinina.** La creatinina aumentó tanto en el grupo tratado con Solución Salina Isotónica (SSI) como en el grupo tratado con célula madre embrionarias de ratón (mESC) 3 días posteriores a la IDR, disminuyendo a los días 12 y 20., Las barras representan las medias  $\pm$  SD (  $p > 0.05$  ).



**Gráfica 8. Promedios de los valores séricos de BUN.** El BUN aumentó considerablemente en ambos grupos de estudio 3 días posteriores a la inducción del daño renal, disminuyendo a los días 12 y 20 hasta alcanzar sus valores normales. Las barras representan las medias  $\pm$  SD (  $p > 0.05$  ).



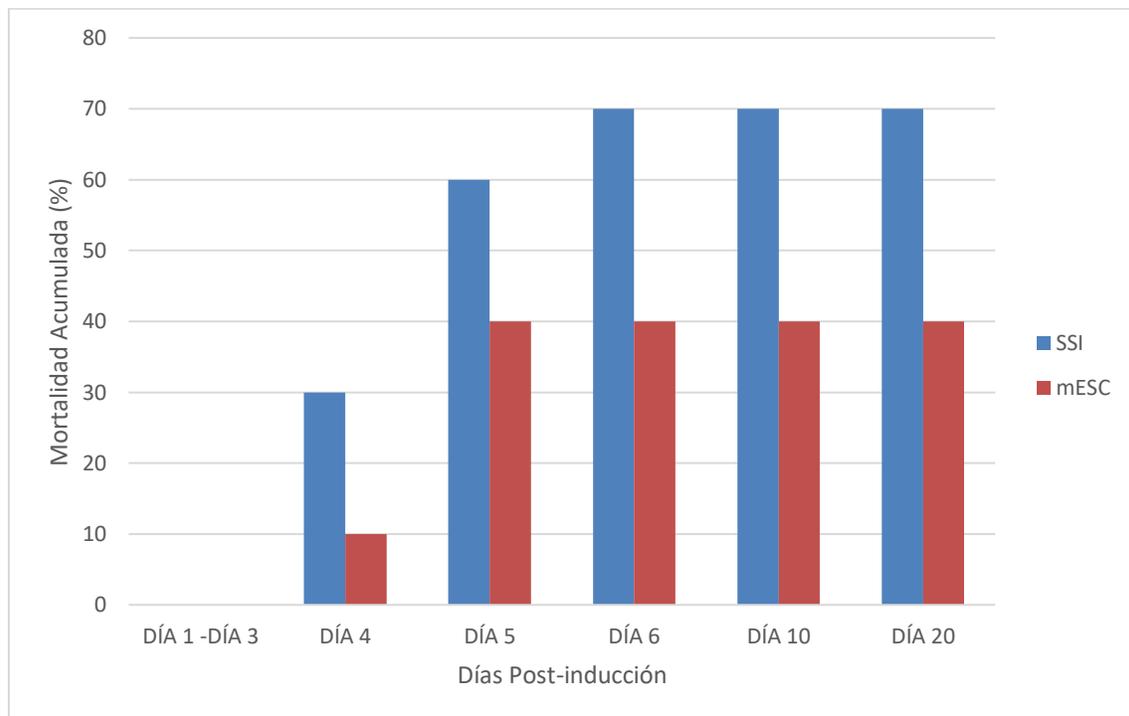
**Gráfica 9. Promedios de los valores séricos de glucosa.** No se observaron cambios importantes en los niveles séricos de glucosa a lo largo del tiempo en ninguno de los dos grupos. Las barras representan las medias  $\pm$  SD (  $p > 0.05$  ).

### Análisis de la mortalidad

Como se mencionó con anterioridad, no se presentaron cambios significativos en los niveles séricos de creatinina y BUN entre los grupos de estudio, sin embargo, a partir del día 4 se presentaron casos de mortalidad, la cual fue incrementando con el tiempo en ambos grupos de estudio, en la tabla 14 se muestran los casos de mortalidad presentados durante los 20 días de observación, presentándose una mortalidad acumulada más elevada en el grupo control (Gráfica 10).

**TABLA 14. CASOS DE MORTALIDAD**

Días de observación	MORTALIDAD	
	Grupo 1	Grupo 2
Día 1 – Día 3	0	0
Día 4	30	10
Día 5	60	40
Día 6	70	40
Día 10	70	40
Día 20	70	40



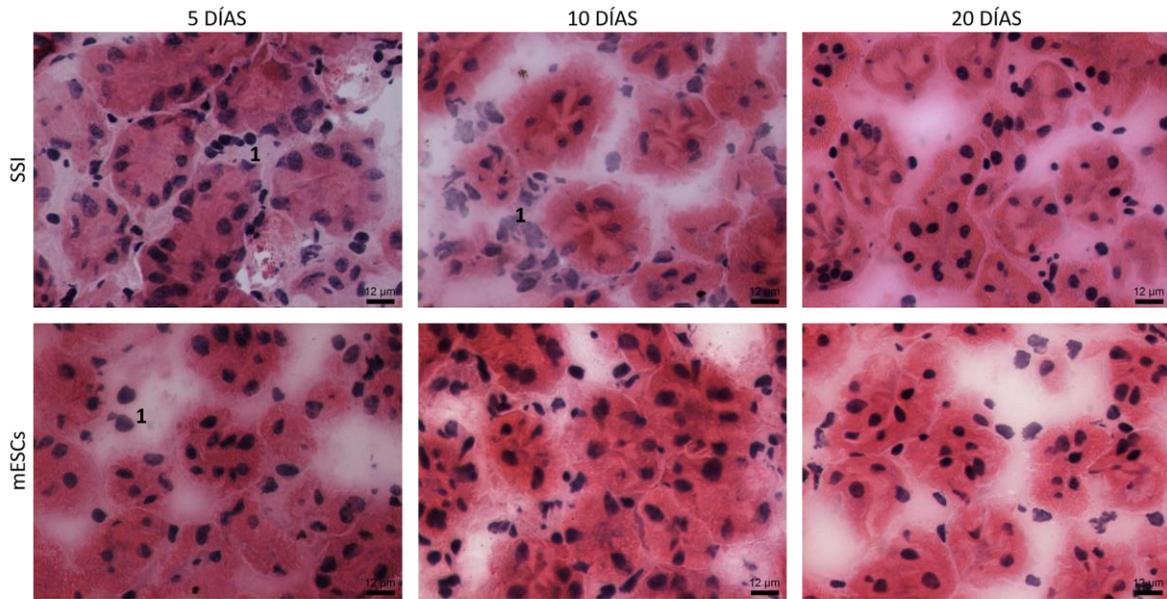
**Gráfica 10. Mortalidad acumulada en los grupos de estudio.** La mortalidad fue incrementando respecto al tiempo del daño renal, mostrándose una mortalidad más alta en el grupo tratado con Solución Salina Isotónica (SSI) ( $p < 0.001$ ).

### Análisis histopatológico

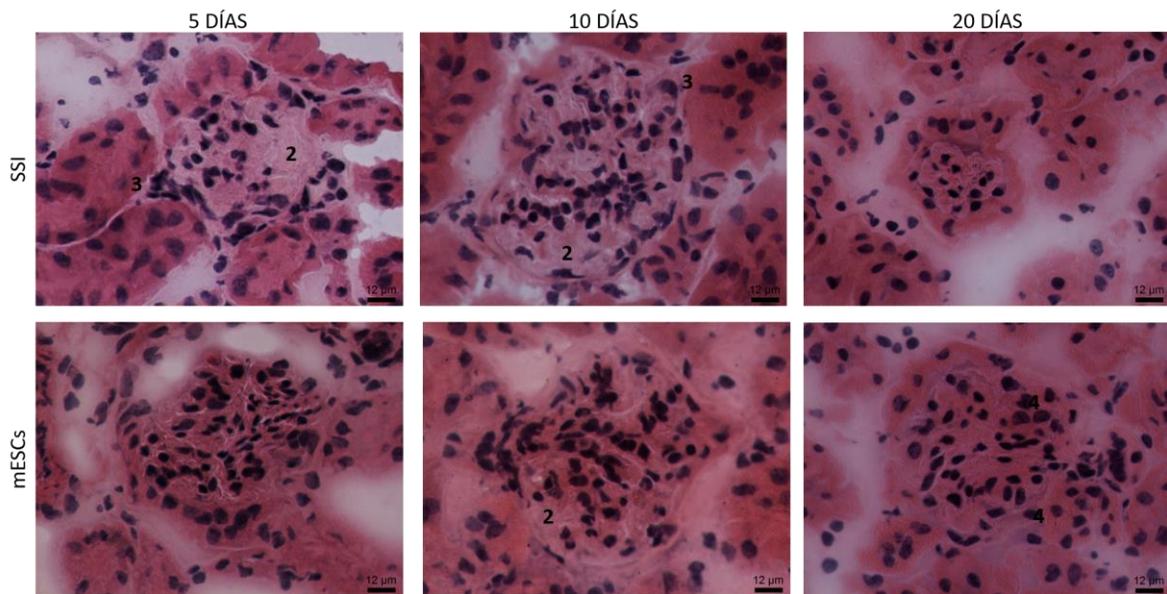
Una vez que los grupos de estudio cumplieron 20 días de IDR, se sacrificaron 3 animales de cada grupo a los 5 y 20 días posteriores a la inducción del daño, obteniéndose muestras histopatológicas de riñón. El análisis histopatológico de manera general mostró una nefritis intersticial (Figura 27) y una disminución en el número de los glomérulos directamente proporcional al tiempo de lesión. 5 días posteriores a la IDR, en los animales tratados con SSI (grupo control) en el sistema tubular se observó una nefritis intersticial caracterizada por infiltrado inflamatorio [1], observándose además una lesión tubular global ya que la totalidad de los túbulos se encontraron muy dilatados, presentándose descamación de células epiteliales en algunos túbulos (Figura 27). Por otro lado, también se identificó una glomeruloesclerosis focal segmentaria [2] con lesión de la punta [3] en el polo urinario, además de observarse en la mayoría de los podocitos y de las células endoteliales núcleos picnóticos (Figura 28). En los animales tratados con mESC,

aunque también se observó una nefritis intersticial, el infiltrado inflamatorio fue menor que en el grupo tratado con SSI, y de igual manera los túbulos se encontraron menos dilatados (Figura 27). Respecto a la microarquitectura glomerular, esta se encontró alterada, pero sin evidencia de glomeruloesclerosis o algún otro tipo de lesión, aunque algunos de los núcleos se encontraron picnoticos (Figura 28). Al día 10 de diferenciación, en el grupo tratado con SSI se observa una menor dilatación de los túbulos, sin embargo, el infiltrado inflamatorio aún es evidente (Figura 27), respecto a la microarquitectura glomerular aún se detectaron datos de glomeruloesclerosis focal segmentaria [2] con lesión de la punta [3] en el polo urinario, acompañado de pérdida de la microarquitectura (Figura 28). Por otro lado, en el grupo tratado con mESC aunque se observan datos de infiltrado inflamatorio, el sistema tubular no se encuentra dilatado, conservándose la microarquitectura del sistema tubular y de los glomérulos (Figura 27 y 28).

Finalmente, en el día 20 en el grupo tratado con SSI observamos que, aunque la dilatación tubular disminuyó (Figura 27), aun se encontraron datos de glomeruloesclerosis focal segmentaria (Figura 28), e inclusive fue posible identificar en algunos glomérulos colapso del penacho en forma casi global [4]. Por otro lado, en el grupo tratado con mESC, no se observó glomeruloesclerosis ni colapso del penacho glomerular, y aunque se evidencian algunos núcleos picnóticos, también fue posible distinguir algunos núcleos de cara abierta, así como cambios regenerativos caracterizados por núcleos grandes con nucléolos prominentes y binucleados [5].



**Figura 27. Microfotografías representativas del sistema tubular.** Se evidencia una mayor dilatación de los túbulos en el grupo control tratado con solución salina isotónica (SSI) que en el grupo experimental, tratado con células Madre Embrionarias de Ratón (mESC), de igual manera se observa un mayor infiltrado inflamatorio (1) a los 5 días en el grupo tratado con SSI.



**Figura 28. Microfotografías representativas de los glomérulos.** Al día 5 tanto en el grupo tratado con Solución Salina isotónica (SSI) como en el tratado con células madre embrionarias de ratón (mESC) se identificó una glomeruloesclerosis focal segmentaria (2), sin embargo, en el grupo tratado con SSI fue posible distinguir lesiones en la punta del polo urinario (3). A los 20 días posteriores a la inducción del daño renal en el grupo tratado con SSI se identificaron algunos glomérulos con colapso del penacho en forma casi global (4), pero en el grupo tratado con mESC aunque se observaron alteraciones en la microarquitectura esta se encontraba más conservada que en el grupo tratado con SSI, e inclusive se observaron algunos núcleos grandes con nucléolos prominentes y binucleados (5), sugestivos de datos regenerativos.

## CAPÍTULO VII

### **DISCUSIÓN**

Actualmente las terapias utilizadas para la enfermedad renal, son el reemplazo de la función renal con diálisis o trasplante; desafortunadamente, la diálisis se asocia a una morbilidad y mortalidad elevadas y, por otra parte, a pesar de los avances en el trasplante de riñón, la escasez de órganos de donantes limita el tratamiento, ya que el trasplante renal se encuentra restringido a donadores además del riesgo al rechazo inmune y necesidad de inmunosupresores de por vida (3, 9, 20, 44).

Es por esto que existe una gran inquietud en el desarrollo de nuevas terapias para la insuficiencia renal con la capacidad de sustituir la amplia gama de funciones renales, buscando reducir la morbilidad, mortalidad y el impacto económico global asociado con esta afección (19). Aunque se ha considerado que el riñón es un órgano incapaz de regenerarse, se están investigando en la actualidad nuevos tratamientos que mejoren la función renal (9), surgiendo nuevas propuestas terapéuticas en la medicina regenerativa, siendo el objetivo principal de este trabajo de investigación apoyar la investigación básica en el tratamiento de la FR en el campo de la medicina regenerativa. En este proyecto de investigación se diferenciaron mESC a CRD, mismas que fueron caracterizadas morfológica y biomolecularmente mediante PCR tiempo real, inmunofluorescencia y espectroscopia vibracional.

Para el desarrollo de este trabajo de investigación en primera instancia se cultivaron MEF de la línea STO y se arrestaron en su ciclo celular, basándonos en los trabajos de Smith y Hooper (1987); Smith y cols. (1988); Williams y cols (1988), que utilizaron para sus cultivos de mESC ésta línea celular STO, empleando además LIF recombinante en combinación con FBS, debido a que el LIF es una citocina secretada por los MEF que ayuda a mantener la autorrenovación y pluripotencialidad de las ESC (45, 46).

El cultivo de MEF se realizó con medio DMEM suplementado con FBS, el cual se cambiaba cada 2 días al igual que muchos autores que han cultivado fibroblastos tanto de ratón como humanos de diversas líneas celulares, entre ellos Keira y cols. (2008) y Clavijo y cols. (2007). Como esperábamos, la morfología observada fue fusiforme con prolongaciones citoplasmáticas, un núcleo oval cerrado, ligeramente achatado con 1-2 nucléolos, presentado adherencia a la placa de cultivo (46,47).

Una vez que se cultivaron los MEF se procedió a su arresto en su ciclo celular utilizando mitomicina C (10 g/ml), obteniendo un arresto del ciclo celular exitoso al igual que Hernández y cols. en el 2008 en su patente publicada en la organización mundial de la propiedad intelectual y a Turnes y cols. (48,49).

Posterior al arresto del ciclo celular de los MEF, se procedió al cultivo de la mESC siguiéndose el protocolo de ATCC que se citó anteriormente, sembrándose dichas células sobre una monocapa de MEF STO arrestados, como lo reportan Evans y cols. en 1990; Notariani y cols. 1991; Piedrahita y cols. en 1990, y Morizane en el 2009 (50, 51) con la diferencia que se complementó con LIF, con la finalidad de asegurar su pluripotencialidad e indiferenciación.

Los resultados de nuestros cultivos de ESC fueron muy semejantes a los que reportan Evans y Kaufman (1981); Thomas y cols. (1995), obteniéndose un crecimiento en colonias, debido a que las ESC se propagan por disociación enzimática de las colonias y una célula individual genera la formación de nuevas colonias, siendo estas además sensibles a las enzimas utilizadas para la disociación, incluidas la tripsina, como se ha reportado (52).

Posterior al cultivo de las mESC se procedió a su diferenciación a CRD. La diferenciación *in vitro* de estas células se realizó removiendo el medio de cultivo que contenía los factores que las mantienen indiferenciadas, principalmente el LIF, y a su vez, aplicando estímulos apropiados necesarios para su diferenciación como inductores y factores de diferenciación. En este trabajo se siguió el protocolo de Ryuji Morizane y colaboradores con algunas modificaciones (28), ya que ellos utilizaron los siguientes factores e inductores de diferenciación: Activina, GDNF, BMP7, Gremlin, GDF11 y obtuvieron Wnt-4 de medio condicionado a partir de NIH 3T3 transfectadas con CMVWnt4, en cambio nosotros utilizamos proteína

recombinante de ratón Wnt4 a razón de 10ng/ml; sin embargo, existen otros protocolos de diferenciación como el de Nishikawa y cols. (2012), quienes utilizaron activina A, BMP4, ácido retinoico y cloruro de litio, suplementado el medio con medio de células en cultivo de la yema uretral (41).

Respecto a la densidad celular con la que Morizane y cols. sembraron las ESC para iniciar la diferenciación a CRD (500 células / 30  $\mu$ l), al sembrarlas a esta densidad nos percatamos que no se formaban EBs, motivo por el cual estandarizamos la densidad celular adecuada y fue hasta que se sembraron 6000 células / 30  $\mu$ l cuando se formaron EBs desde las primeras 24 hrs del cultivo; dichos EBs se caracterizaron por formar agregados celulares tridimensionales que aumentaban de tamaño proporcionalmente con el tiempo, coincidiendo con los trabajos tanto de Ku y cols (2004) como Leahy (1999), quienes manifiestan que las mESC cuando son inducidas a un programa de diferenciación y en ausencia de factores anti diferenciación *in vitro*, forman agregados celulares tridimensionales llamados EBs (53,54) concordando también con las características morfológicas descritas por Itskovitz (2000). Inicialmente los EBs son paquetes celulares densos que están rodeados por una sola capa de células parecida a las endodérmicas, esta llega a ser cavitada y adicionalmente se acumula un fluido; el cuerpo embrionario cístico resultante es producto de una diferenciación espontánea, considerado como cuerpo embrionario maduro y con diversos tipos celulares (55), aunque en este trabajo no se llegó a obtener un EB maduro, porque se dirigió su diferenciación hacia CRD.

Una vez que ya se tenían protocolizados los métodos para cultivo, expansión y diferenciación de mESC, se procedió a cuantificar la expresión relativa de cada uno de los transcritos ( $\beta$ -actina, *Oct4*, *SOX2*, *WT1*, *PAX2*, y *Ksp*) comparándolos a los días 0, 10, 15 y 20 de diferenciación. En primer lugar como esperábamos, los marcadores de pluripotencia *Oct4* y *SOX2* se expresaron en las mESC (día 0 de diferenciación), ya que como lo han mencionado con anterioridad Takashi y Yamanaka (2006), y Chen y cols. (2008) durante la embriogénesis temprana, *Oct4* y *SOX2* se encuentran coexpresados en las células pluripotentes de la mórula, la masa celular interna, células del epiblasto y células germinales (55, 56, 57, 58). Sin embargo, como lo han mencionado en sus trabajos independientes Cavaleri y cols. (2006), y Kim y cols. (2005), la expresión de *Oct4* va disminuyendo cuando estas

células se diferencian, hasta que estas pierden su estado de pluripotencia y el gen es completamente suprimido (23, 55), resultados que coinciden con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación al dejar de expresarse el gen *Oct4* a partir del día 10 de diferenciación. Por otro lado, Imberti y cols. (2015) han citado que el gen *SOX2* es requerido para la expresión inicial de los genes de pluripotencia (43), y Wicklow y cols. han confirmado en su trabajo experimental que la expresión de *SOX2* está restringida a células del epiblasto E3.75 y que este gen es esencial en el mantenimiento de la expresión de genes de pluripotencia en la masa celular interna (59), por lo que en este trabajo al expresarse dicho gen en las mESC, corroboramos su estado de pluripotencia; sin embargo, observamos que la expresión de este gen fue en aumento hasta el día 15, disminuyendo su expresión al día 20, esto probablemente se deba a que *SOX2* tiene injerencia en la morfogénesis normal y la homeostasis de diversos tejidos, incluyendo las SC neurales, las células madre de la retina, papilas gustativas, cabello, folículos sensoriales en el oído y epitelios de tráquea, pulmón, esófago entre otros que se encuentran en estudio, como lo afirma Tompkins (2011) (60), por lo que diversos autores han afirmado que la expresión de este gen no se limita únicamente a células pluripotentes sino también a SC adultas.

Respecto a la expresión de *PAX2*, gen de vital importancia en la nefrogénesis que se mantiene expresado a lo largo del desarrollo embrionario renal, debido a que determina el territorio nefrogénico y desempeña un papel importante en el desarrollo del mesonefros y metanefros (27), observamos en nuestros resultados que la expresión de dicho gen aumentó al día 10 y fue disminuyendo considerablemente hasta el día 20, sin dejar de expresarse, resultado similar a los obtenidos por Imberti y cols. (2015), quienes reportan que la expresión de *PAX2* fue observada al día 6 y al día 12, disminuyendo al día 19 (43). Además, es importante mencionar que el protocolo de diferenciación utilizado en esta investigación potenció la expresión de *PAX2*, ya que se utilizaron GDNF, BMP7 y Activina, lo cual ha sido demostrado por Morizane y cols. (28). Sin embargo, Bruce et al. utilizó un protocolo diferente, sin incluir los factores antes mencionados, observando una menor expresión de *PAX2* (9). De igual manera nuestros resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Nishikawa y cols., quienes manifiestan que la expresión de *PAX2* aumento hasta

30 veces más al día 8 en comparación con las mESC (41); sin embargo, en nuestro resultado dicho gen se expresó hasta 98.73 veces más. Por otro lado, Narayan y cols. (2013) han reportado que *PAX2* se expresa en las células epiteliales precursoras renales y en las células epiteliales tubulares proximales del riñón cuando estas células se encuentran en cultivo (42); en este trabajo de investigación nosotros observamos que *PAX2* no dejó de expresarse aún en el día 20 de diferenciación, probablemente debido a que en el día 15 de diferenciación ya se contaban con células epiteliales precursoras renales y células epiteliales tubulares y estas al mantenerse en cultivo *in vitro* expresaron dicho gen.

La expresión del gen *WT1* es esencial en el desarrollo embrionario renal siendo su principal función regular el proceso de la transición mesénquima-epitelio, así como el desarrollo y maduración de los podocitos (61, 62). De acuerdo a Guo y cols. (2002)., su expresión se detecta en niveles bajos en el blastema metanéfrico pero incrementa en la formación de los cuerpos en “coma” y en “S” y, hasta que alcanza su diferenciación, disminuyendo su expresión excepto en los podocitos de los glomérulos maduros, en donde la expresión de este gen puede ser detectada a lo largo de la vida (63). Nuestros resultados muestran que el gen *WT1* se expresó en las mESC y aumento su expresión al día 10, tiempo en el que probablemente la diferenciación se guío hacia blastema metanéfrico de acuerdo a lo reportado por Guo; posteriormente su expresión aumento al día 15, tiempo que corresponde a la formación de los cuerpos en “coma” y en “S” y, finalmente, la expresión de dicho gen disminuyo al día 20, tiempo en el que de acuerdo a la maduración de las células en diferenciación, se obtuvieron células renales maduras (podocitos). De igual forma, nuestros resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Imberti y cols. (2015), reportándose en este trabajo que al día 0 se encuentra expresado dicho gen y aumenta su expresión gradualmente al día 6 y al día 12 (43). Así mismo concuerda con el reportado por Nishikawa y cols. (2012), quienes reportan la expresión del citado gen al día 12 con un aumento de la expresión al día 14 y un decremento al día 16 (41).

*Ksp* es un gen que se expresa exclusivamente en el riñón, ha sido inmunolocalizado en la membrana basolateral de las células epiteliales tubulares renales, además de ser un gen específico del tejido renal. La expresión de *Ksp* regula el desarrollo renal.

Igarashi y cols. (1999) han reportado que dicho gen se comienza a detectar a los 14 días postcoito, es decir después de la formación de los cuerpos en “coma” y en “S”, manteniéndose dicha expresión en el riñón adulto (64). En nuestros resultados detectamos la expresión de *Ksp*, concordando con lo estipulado por Igarashi, ya que la expresión de *Ksp* aumentó considerablemente al día 15, probablemente debido como se reportó anteriormente, a la formación de los cuerpos en “coma” y en “S”; de igual manera dicho gen se mantuvo expresado al día 20 de diferenciación, lo que correspondería la obtención de células adultas (células epiteliales tubulares).

Por lo que con la expresión de *WT1* y *Ksp* en las diferentes etapas de la diferenciación comprobamos la obtención blastema metanefrico, cuerpos en “S” y “coma” y de células epiteliales tubulares y podocitos

Los marcadores de ESC son moléculas expresadas específicamente en las células madre, sin embargo, diferentes tipos de células pueden compartir diferentes marcadores. En los últimos años, se han reportado una amplia gama de marcadores de superficie celular y marcadores moleculares genéricos, entre ellos, las proteínas de membrana son uno de los marcadores más importantes en el reconocimiento de ESC, por ejemplo SSEA1, el cual se expresa en la superficie de embriones murinos en la etapa de pre-implantación, así como en mESC y líneas germinales, además son característicos también de mESC algunos factores de transcripción como Oct4, Sox2 y Nanog (65), motivo por el cual en este trabajo de investigación se buscó la presencia de los marcadores SSEA1 y Oct4 en las mESC, demostrándose en nuestros resultados que las mESC en cultivo presentaron dichos marcadores, con lo se comprobó su estado de pluripotencia y estirpe celular, obteniendo resultados similares a los de Ginis y cols.(2004) en la caracterización de mESC de la línea D3, quienes detectaron dicha proteína mediante inmunofluorescencia SSEA-1(66); de igual manera, nuestros resultados fueron similares a los presentados por Czechanski y cols.(2014), quienes caracterizaron mESC mediante la inmunodetección de biomarcadores de pluripotencia (Oct4, Nanog y SSEA1) (67).

Respecto a los marcadores de CRD al igual que Nishikawa y cols., (2012) nosotros detectamos la expresión de PAX2, el cual es un marcador de mesodermo intermedio; aunque Nishikawa y cols. (2012) reportan la máxima expresión de este

marcador al día 6 de diferenciación (41), nosotros detectamos la expresión de esta proteína al día 20, esto probablemente debido a que *PAX2* no es sólo un factor de transcripción crucial en el desarrollo embrionario del riñón, si no que como lo han mencionado Qi y cols., la expresión de proteínas y de mRNA de *PAX2* es alta en la médula interna renal de ratón adulto y menor en la corteza renal, además, la proteína *PAX2* está presente en las células de los conductos colectores tanto en médula como en corteza, así como en la porción descendente del asa de Henle (68). De la misma manera, como se mencionó en la expresión génica, nosotros detectamos una mayor expresión de la proteína *PAX2* en este trabajo de investigación comparado con el protocolo de diferenciación de Bruce (9), debido a que los inductores de diferenciación utilizados (*GDNF*, *BMP7*, y *Activin*) incrementan la expresión de *PAX2* y *WT1*.

Por otro lado, Imberti y cols. (2015) reportaron que *WT1* y *PAX2* se detectan desde el día 6 y 12; posteriormente estos marcadores disminuyeron en el día 19 (43). Sin embargo, nuestros resultados muestran que *WT1* se mantuvo expresado incluso al día 18 de la diferenciación; destacando que Imberti y cols. (2015) obtuvieron células renales progenitoras, y como se mencionó antes *WT1* se expresa en los podocitos, y éste se ha utilizado como marcador de podocitos por muchos autores como Su y cols. (2010) (69). Por lo que al expresarse esta proteína al día 18 de diferenciación comprobamos la obtención de podocitos, es decir de células renales adultas.

Respecto a la E-cadherina, se sabe que es una proteína de adhesión celular localizada en las uniones adherentes que media las interacciones célula-célula y su expresión sirve como un marcador para la diferenciación del epitelio durante la transición epitelio-mesenquima, pero, Prozialeck y cols. (2004) demostraron en sus estudios que la E-cadherina se expresa predominante en el túbulo distal, conductos colectores y segmentos medulares (70). En consecuencia, la expresión de E-cadherina en los EBs obtenidos en este trabajo en el día 18 corrobora la obtención de células de riñón maduro. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ren y cols. (2010) quienes detectaron la expresión de E-cadherina en la diferenciación de mESC hacia linajes celulares renales utilizando medio condicionado de células de la yema ureteral *in vitro* (3).

Como se ha mencionado con anterioridad en el capítulo de antecedentes, se han propuesto diversos protocolos para la obtención de CRD a partir de mESC, siendo estas células caracterizadas mediante técnicas especializadas como inmunocitoquímica, citometría de flujo y análisis de marcadores moleculares, técnicas que son desarrolladas en largos periodos de tiempo, y requieren además una gran cantidad de células para su análisis, siendo necesaria dicha caracterización antes de que las células sean implantadas en modelos animales con daño renal. Motivo por el cual es necesario contar con una técnica eficiente, rápida y no invasiva, que facilite la identificación de las células y/o las etapas de maduración durante el proceso de diferenciación celular. Por lo que se utilizó la espectroscopia vibracional FTIR, ya que es una técnica empleada para obtener la huella dactilar molecular de una muestra biológica que absorbe la onda infrarroja de acuerdo con los enlaces químicos y estructurales de las moléculas, proporcionando información de la estructura específica de biomoléculas como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, a través de una serie de bandas identificables de grupos funcionales en la región electromagnética del infrarrojo medio (71).

Respecto a los resultados por espectroscopia FTIR realizada a las mESC y a las CRD, se observó que esta técnica permite obtener información de los principales grupos funcionales de las muestras, las cuales presentaron bandas de absorción relacionadas con lípidos, proteínas, aminoácidos, metil-metileno y moléculas fosforiladas.

El espectro obtenido de mESC fue muy similar al espectro de ESC reportado por Ami y cols. (2008), quienes demostraron que los cambios espectrales más significativos durante la diferenciación espontánea de ESC se producen en las bandas amida de proteína ( $1700$  hasta  $1500\text{ cm}^{-1}$ ), y en la región de ácido nucleico ( $1150$ - $850\text{ cm}^{-1}$ ), donde se encuentran fosfato y restos ribosa / desoxirribosa, así como la de glucógeno (40), cambios que también fueron detectados en este trabajo. Por otra parte, como se esperaba, la estructura secundaria de las proteínas de mESC cambió cuando la diferenciación a CRD tuvo lugar, revelando espectralmente la presencia de bandas intensas a  $1650\text{ cm}^{-1}$  y  $1540\text{ cm}^{-1}$  relacionadas con los grupos funcionales amida I y amida II de las proteínas respectivamente, lo que indica que diferentes proteínas se fueron expresando durante la diferenciación,

concordando con los resultados obtenidos por Ami y cols. (2008). Además, los espectros de la segunda derivada de CRD mostraron desplazamiento y aumento de la intensidad de la banda de  $\alpha$ -hélice a  $1650\text{ cm}^{-1}$ , probablemente debido a la superposición con las mismas bandas de las proteínas WT1, PAX2 y E-cadherina.

Es sabido que los circuitos transcripcionales centrales de las ESC están regulados por fosforilación, y la diferenciación de estas células se acompaña por la modulación activa de estos procesos. En este sentido Hoof y cols. (2004) han informado que durante la diferenciación inducida de SC, se identificaron 5222 proteínas, y 1399 de ellas fueron fosforiladas en 3067 residuos; y también han reportado que aproximadamente el 50% de estos sitios de fosforilación se regulan dentro de la primera hora de inducción de la diferenciación, revelando una compleja interacción de las redes de fosforilación que abarca diferentes vías de señalización y la actividad quinasa, concluyendo que entre las proteínas fosforiladas, la pluripotencia se asociaba a la proteína SOX2 (72). Además, Kim y cols. han declarado que la fosforilación de Nanog mediada por ERK1 es crítica para la baja regulación de Nanog, induciendo la diferenciación de ESC (73). En este trabajo, las bandas a  $1080\text{ cm}^{-1}$  relacionadas con las moléculas fosforiladas fueron más intensas en CRD, lo que sugiere la fosforilación y en consecuencia la diferenciación de mESC.

Como se mencionó antes, se mostró un aumento en la intensidad de la banda C=O a  $1745\text{ cm}^{-1}$  relacionada con lípidos en las CRD en el día 10 de diferenciación en comparación con mESC, posteriormente la intensidad de esta banda disminuyó en 15 y 20 días de diferenciación. Respecto a esto se sabe que la síntesis de fosfatidilcolina es un evento metabólico durante el crecimiento renal compensatorio a lo largo de desarrollo del riñón (74), lo que podría estar relacionado con el aumento de la intensidad de esta banda a lo largo de la diferenciación y su consecutiva disminución al frenarse el desarrollo renal. Además, Bargmann y cols. (1977) mencionan que existen normalmente inclusiones de lípidos en el riñón de algunos mamíferos, localizándose principalmente en el asa de Henle, siendo los principales componentes lípidos, triglicéridos, fosfoglicéridos y colesterol (75). Por otro lado, también se ha reportado que los lípidos endógenos del tejido son la principal fuente de ácidos grasos para la oxidación y la producción de ATP en el riñón. Todo lo antes mencionado apoya la importancia de la presencia de lípidos en las CRD.

Finalmente, El PCA es una técnica estadística que procesa las bandas espectrales FTIR y permite discriminar los diferentes datos obtenidos de las muestras, es decir, puede ser empleado para discriminar los linajes celulares, o bien los diferentes días de maduración de las células. Por esta razón, la bioespectroscopía comienza a ser una herramienta común en la detección o diagnóstico de laboratorio. Aunque hasta el momento, en la literatura no existen reportes sobre el análisis espectroscópico FTIR y sus PCA en la diferenciación de CRD.

En este trabajo de investigación, el uso de PCA nos permitió discriminar mESC de CRD de una manera práctica y directa. La aplicación de esta técnica podría ser útil para caracterizar este tipo de células en tiempos muy cortos. En el PCA se observaron dos grupos de células a los días 10, 15 y 20 de diferenciación, esto probablemente debido a características histológicas de tejido renal, aunque se necesitan otros ensayos para diferenciar células del glomérulo y túbulares.

La parte medular por la cual múltiples autores han buscado la diferenciación de SC a células renales, es contar con una alternativa de tratamiento en medicina regenerativa buscando el aumento de la funcionalidad, para lo cual es necesario contar con un modelo animal con FR. Analizando las ventajas y desventajas del uso de mESC en un estado indiferenciado *versus* CRD en modelos animales con daño renal.

Debido a la necesidad de contar con un modelo animal con FR y a las características y fácil manejo del Cis-Diamminedichloroplatinum como fármaco antineoplásico que produce nefrotoxicidad se seleccionó este fármaco para la estandarización de un modelo murino con FR.

La nefrotoxicidad del CDDP se le atribuye a la inflamación, estrés oxidativo, toxicidad tubular directa en forma de apoptosis y necrosis mediada por inflamación, sobrecarga de calcio, activación de fosfolipasa, agotamiento de glutatión reducido, inhibición de la función de la cadena respiratoria mitocondrial, apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial y disfunción mitocondrial (30, 76). En este sentido el uso de modelos animales para el entendimiento del daño renal, así como para la propuesta de tratamientos alternativos, son un punto de vital importancia en la investigación; y este antineoplásico ha sido utilizado por muchos grupos de

estudio para la IDR en ratones, como Lu y cols. (2008) quienes utilizaron el CDDP a una dosis de 30 mg/kg para la inducción de FR (77), o Aleksunes y cols. (2008) quienes utilizaron una dosis de 18 mg/kg con el mismo fin (2008) (78). Aunque diversas dosis han sido empleadas, el modelo de dosificación de CDDP estándar para ratones, es  $> 20$  mg/kg en ratones de 8 a 10 semanas de edad, destacándose que esta dosis es letal para el ratón, falleciendo a las 72 hrs (79).

En esta investigación nosotros probamos 5 dosis diferentes de CDDP (50, 35, 20, 18 y 15 mg/kg), con la finalidad de establecer la dosis de CDDP que más daño bioquímico ocasionara, de acuerdo a los niveles séricos de creatinina y BUN, pero al mismo tiempo que la letalidad nos permitiera hacer un seguimiento de al menos 20 días. Siendo nuestros resultados similares a los reportados por Mathe y cols (2006), quienes reportan que los animales que recibieron CDDP a dosis de 10 y 14 mg/kg sobrevivieron durante ocho días, mientras que en los grupos que recibieron 18, 22 y 26 mg/kg, las tasas de supervivencia fueron 8/10, 7/10 y 3/10 respectivamente (80); y en este trabajo de investigación nosotros observamos un mortalidad del 100% 5 días posteriores a la administración de CDDP a dosis de 50 y 35 mg/kg y del 60% y 40% 5 días posteriores a la IDR a una dosis de 20 y 18 mg/kg respectivamente.

Los valores basales para creatinina y BUN que nosotros reportamos en ambos grupos de estudio previo a la IDR fue de  $0.77$  mg/dl  $\pm 0.14$  y  $29.00$  mg/dl  $\pm 12.69$  para el grupo 1; y  $0.69$  mg/dl  $\pm 0.11$  y  $32.9$  mg/dl  $\pm 5.42$  para el grupo 2, valores que concuerdan con lo reportado por Takai y cols. (2015), BUN  $27.9 \pm 4.3$  mg/dl, creatinina,  $0.630 \pm 0.097$  mg/dl (81), de igual manera, los resultados son similares con los de Aleksunes y cols. (2008) quienes reportan un BUN plasmático control del 26 mg/dl.

Una vez que se indujo el daño renal, en este trabajo de investigación encontramos un aumento considerable de los niveles séricos de creatinina y BUN 3 días posteriores a la IDR, en el grupo 1 los valores para creatinina y BUN fueron de  $1.76$  mg/dl  $\pm 0.73$  y  $39.80 \pm 12$  respectivamente, y para el grupo 2,  $1.62$  mg/dl  $\pm 0.74$  y  $38.70$  mg/dl  $\pm 13.13$ , al respecto, Aleksunes y cols. utilizaron una dosis de 18 mg/kg, ip para la IDR, y 4 días posteriores a la inducción del daño reportaron un BUN

plasmático de 63 mg/dl (78). De igual manera, Ciarimboli y cols (2010) reportaron que a los cuatro días después de la aplicación de CDDP a 15 mg/kg, el BUN aumentó en 59 mg/dl  $\pm$  17 en comparación con el día -1 (82); Liu y cols. (2016) utilizaron una dosis de 20 mg/kg BUN, reportando un aumento significativo de BUN de 87.4 mg/dl  $\pm$  3.3 72 hrs posteriores a la inducción (83). Takai y cols. (2015) mostraron que los niveles de BUN y creatinina en suero obtenido 24 hrs después de la administración del CDDP fueron de BUN: 240  $\pm$  20 mg/dl, creatinina, 1,72  $\pm$  0,37 mg/dl (81). Como se aprecia en todos los trabajos de investigación antes citados hubo un aumento de BUN y de creatinina, aunque en diferentes grados, lo anterior probablemente debido a las diferentes cepas de ratones que se utilizaron para el fin, ya que Rabe y Schaefer (2016), han reportado que la elección de la cepa de ratón es esencial, ya que algunas cepas no son susceptibles al daño renal. Por ejemplo, los ratones de la cepa C57BL/6, parecen ser relativamente resistentes al desarrollo de proteinuria, glomerulosclerosis e hipertensión, y algunas otras cepas tienen sólo un gen de renina y una disminución de la actividad del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), como la cepa 129, lo cual provoca cambios bioquímicos en los resultados al momento de la IDR (84).

Es importante mencionar que ninguno de los trabajos antes mencionados como los de Aleksunes (2008), Ciarimboli (2010), Liu (2016) y Takai (2015), llevaron sus experimentos en el modelo animal más allá de 4 días posteriores a la IDR (78, 81, 82, 83). Sin embargo, en este trabajo, nosotros llevamos el modelo animal hasta el día 20, observándose desde el día 12 un decremento en los valores séricos de creatinina y BUN en los animales que continuaban vivos, alcanzando valores normales. Lo anterior probablemente debido a que como es sabido la FRA es reversible en más de la mitad de los casos que la adquieren (85), llegando a presentarse una regeneración y reparación completa en algunos casos (86), es decir, los animales que lograron sobrevivir a la dosis de 18mg/kg, presentaron una restauración en la función renal, motivo por el cual no se observa una significancia estadística de los valores séricos de creatinina y BUN entre los grupos de estudio, sin embargo, si se encontró una significancia estadística en la letalidad entre los grupos, encontrándose en todo momento una letalidad más elevada en el grupo tratado con SSI, lo cual nos hace pensar que las mESC mejoran la función renal en

etapas tempranas impidiendo un mayor daño en el riñón, con lo que mejora la supervivencia de los animales

Por otro lado, los cambios histopatológicos entre los grupos encontrados en este trabajo fueron muy significativos ya que como se comentó con anterioridad, en el grupo tratado con SSI, 5 días posteriores a la IDR, se observó una nefritis intersticial caracterizada por infiltrado inflamatorio, reportándose además una lesión tubular global con descamación de células epiteliales en algunos tubulos y glomeruloesclerosis focal segmentaria con presencia de células endoteliales con núcleos picnóticos; resultados que también concuerdan con lo reportado por Aleksunes y cols., quienes reportan degeneración, necrosis y desprendimiento de epitelio del túbulo proximal, además de células tubulares picnóticas y necróticas (78). De igual manera Takai y cols. (2015), así como Liu y cols. (2016) y Ciarimboli y cols. (2010) reportaron daño del tejido renal caracterizado por necrosis tubular y dilatación.

Sin embargo, a diferencia de Imberti y cols. (2014) quienes inyectaron SC pluripotentes inducidas humanas en ratones con daño renal inducido con CDDP y valoraron la función renal 4 días posteriores a la inducción del daño, reportaron que las iPSC no ejercieron ningún efecto protector sobre la función renal ni la histología renal (43). Nosotros encontramos que en el grupo tratado con mESC, aunque también se observó una nefritis intersticial, el infiltrado inflamatorio fue menor que en el grupo tratado con SSI, y de igual manera los túbulos se encontraron menos dilatados y respecto a la microarquitectura glomerular, esta se encontró alterada, pero sin evidencia de glomeruloesclerosis o algún otro tipo de lesión. Resultados que concuerdan con lo reportado por Villanueva y cols. (2011) quienes trataron con células madre de médula ósea a un modelo con daño renal ocasionado mediante nefrectomía en ratas, reportando que 5 semanas posteriores al tratamiento se observó una morfología microscópica cercana a lo normal (87).

Finalmente, en el día 20 en el grupo tratado con SSI observamos que, aunque la dilatación tubular disminuyó aún se encontraron datos de glomeruloesclerosis focal segmentaria, identificando algunos glomérulos colapsados. Por otro lado, en el grupo tratado con mESC, no se observó glomeruloesclerosis ni colapso del penacho

glomerular, distinguiéndose algunos núcleos de cara abierta, así como cambios regenerativos caracterizados por núcleos grandes con nucléolos prominentes y binucleados. Lo anterior probablemente debido a las propiedades regenerativas de las SC, al respecto Heng y cols. (2005) han manifestado que las ESC humanas funcionan como "catalizadores" biológicos para estimular la reparación y regeneración de tejidos (88), lo cual parece ser muy prometedor en el campo de la medicina regenerativa.

La principal fuerza estratégica de la terapia celular en la FR es la incorporación de células funcionales en un riñón dañado, teniendo como objetivo la reparación y regeneración del tejido. Sin embargo, debemos de ser acuciosos sobre las células a utilizar como tipo de terapia celular (89). Ya que se pueden emplear básicamente 3 tipos de células, células especializadas; es decir células ya maduras y diferenciadas, SC; en un estado indiferenciado, o bien células pre-diferenciadas, considerando en cada uno de ellas, sus perfiles génicos, proteicos e inmunológicos.

Los principales atractivos del uso de ESC como estrategia terapéutica son su potencialidad, que se refiere a la capacidad de diferenciarse en todas las capas germinales y convertirse en un tipo de célula específico, así como su baja inmunogenicidad cuando se cultivan *in vitro* y se reintroduce como un agente terapéutico. Aunque el fenotipo de las células diferenciadas puede no ser idéntico a su contraparte normal, el hecho de que trabajan *in vivo* plantea esperanzas de generar una terapia celular "a la carta" (90).

Es importante considerar que, si las células que van a ser implantadas se obtienen a partir de un proceso de diferenciación, un extenso estudio del genotipo y fenotipo debe hacerse, así como pruebas de histocompatibilidad entre las células implantadas y el hospedero. Sin embargo, a pesar del importante progreso en el ámbito de la medicina regenerativa, aún estamos lejos de utilizar cualquiera de sus técnicas en humanos, debido a que es necesario evaluar los efectos secundarios, la biodistribución, la dosificación, el tipo de administración, el vehículo de la terapia celular, así como la evaluación del tiempo de respuesta y de largo plazo. pero sin duda el hecho más importante ha sido el cambio en el paradigma del deterioro orgánico, la enfermedad y la regeneración.

## CAPÍTULO VIII

### **CONCLUSIONES**

La medicina regenerativa y la investigación básica han abierto una nueva puerta para el tratamiento de las enfermedades renales y de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente proyecto de investigación se concluyó lo siguiente:

De acuerdo a la expresión genética y proteica, se obtuvieron células renales que cursaron cronológicamente por las fases del desarrollo embriológico del riñón, ya que al día 10 se obtuvo mesénquima metanéfrico y blastema metanéfrico, mostrándose un aumento en la expresión de *PAX2*, al día 15 los resultados correspondieron a la obtención de cuerpos en coma evidenciándose un aumento en la expresión génica de *WT1* y *Ksp*; y a partir del día 18 se obtuvieron células renales adultas, ya que al día 20 se detectó la expresión el gen *Ksp*, y al día 18 se inmunodetectaron las proteínas *PAX2*, *WT1* y E-cadherina.

El análisis espectroscópico comprobó la diferenciación de mESC a CRD, al evidenciarse un aumento en la banda relacionada con moléculas fosforiladas en las CRD, lo que está relacionado con la fosforilación y la consecutiva diferenciación de mESC. Además de evidenciarse cambios en la estructura secundaria de las proteínas, caracterizado por la presencia de bandas intensas relacionadas con los grupos funcionales amida I y amida II, lo que indica que diferentes proteínas se fueron expresando durante la diferenciación.

Los resultados de PCA, a partir de los datos experimentales de infrarrojo nos permitieron discriminar mESC de CRD, así como el proceso de la diferenciación de una manera práctica y en tiempos cortos. El primer componente principal para las regiones glucógeno y otros carbohidratos y amida I nos permitió discriminar mESCs y CRD. Posteriormente entre las CRD se evidenciaron las tres etapas de diferenciación siguiendo un patrón radial de acuerdo con el tiempo de diferenciación en la región de glucógeno y otros carbohidratos, y en la región amida I se mostró un patrón lineal.

Los estudios bioquímicos no presentaron cambios significativos entre los animales con FR tratados con SSI y tratados con mESC, sin embargo, el tratamiento con mESC aumentó la sobrevida en el modelo murino con daño renal, ya que el 60% de los animales sobrevivió los 20 días posteriores a la IDR, contra el 30% de sobrevida en el grupo tratado con SSI.

El tratamiento con mESC promueve la regeneración del tejido renal, evidenciándose histopatológicamente una restauración en el tejido, al encontrarse menor dilatación tubular y glomérulos menos dañados en el grupo tratado con mESC. Encontrándose además datos sugestivos de regeneración como núcleos grandes con nucléolos prominentes y binucleados.

## **CAPÍTULO IX**

### **PERSPECTIVAS**

La medicina regenerativa ha surgido como una rama del área biomédica, ofreciendo opciones para enfermedades crónicas degenerativas incluyendo la FR, elevando con esto las metas utópicas que conducen a la sustitución de células o tejidos dañados y al aumento de la funcionalidad orgánica. Sin embargo, a pesar de los avances significativos, es necesario seguir investigando las ventajas y desventajas de la medicina regenerativa, pero sin duda el hecho más importante ha sido el cambio en el paradigma del deterioro orgánico, la enfermedad y la regeneración. Este trabajo de investigación es el fundamento para el desarrollo de nuevas investigaciones en el campo de la medicina regenerativa, se espera a corto plazo evaluar el tropismo de las SC, es decir, comprobar la migración de la mESC al sitio de lesión. Y a largo plazo evaluar el implante de CRD a partir de mESC en un modelo murino con FR.

Por otra parte, es importante mencionar que aún estamos lejos de utilizar este tipo de terapia celular en humanos, debido a que es necesario evaluar los efectos secundarios, la biodistribución, la dosificación, el tipo de administración, el vehículo de la terapia celular, así como la evaluación del tiempo de respuesta, entre otros estudios

## Artículos publicados

Mata-Miranda et al. *Biol Res* (2017) 50:14  
DOI 10.1186/s40659-017-0119-6

Biological Research

## RESEARCH ARTICLE

## Open Access



## Morphological, molecular and FTIR spectroscopic analysis during the differentiation of kidney cells from pluripotent stem cells

Monica Maribel Mata-Miranda<sup>1,2</sup>, Gustavo Jesus Vazquez-Zapien<sup>1,3</sup>, Marlon Rojas-Lopez<sup>1</sup>, Virginia Sanchez-Monroy<sup>4</sup>, David Guillermo Perez-Ishiwara<sup>4</sup> and Raul Jacobo Delgado-Macuil<sup>1\*</sup>

**Abstract**

**Background:** Kidney diseases are a global health problem. Currently, over 2 million people require dialysis or transplant which are associated with high morbidity and mortality; therefore, new researches focused on regenerative medicine have been developed, including the use of stem cells.

**Results:** In this research, we generate differentiated kidney cells (DKCs) from mouse pluripotent stem cells (mPSCs) analyzing their morphological, genetic, phenotypic, and spectroscopic characteristics along differentiation, highlighting that there are no reports of the use of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy to characterize the directed differentiation of mPSCs to DKCs. The genetic and protein experiments proved the obtention of DKCs that passed through the chronological stages of embryonic kidney development. Regarding vibrational spectroscopy analysis by FTIR, bands related with biomolecules were shown on mPSCs and DKCs spectra, observing distinct differences between cell lineages and maturation stages. The second derivative of DKCs spectra showed changes in the protein bands compared to mPSCs. Finally, the principal components analysis obtained from FTIR spectra allowed to characterize chemical and structurally mPSCs and their differentiation process to DKCs in a rapid and non-invasive way.

**Conclusion:** Our results indicated that we obtained DKCs from mPSCs, which passed through the chronological stages of embryonic kidney development. Moreover, FTIR spectroscopy resulted in a non-invasive, rapid and precise technic that together with principal component analysis allows to characterize chemical and structurally both kind of cells and also discriminate and determine different stages along the cell differentiation process.

**Keywords:** Pluripotent stem cells, Differentiated kidney cells, Vibrational spectroscopy, Fourier transform infrared, Principal components analysis

**Background**

Kidney diseases are a global public health problem, worldwide mortality rates between 50 and 80%. Currently, the leading cause of end-stage renal failure is diabetes [1, 2]. Over 2 million people now require renal replacement therapy, but this likely represents less than 10% of those who need [3, 4]. When a sufficiently extensive chronic renal injury occurs, whatever the cause, kidney function progressively declines until reaching

terminal renal failure with no treatment capable of reversing the process [5].

The kidney performs essential physiological functions such as the excretion of metabolic waste products and, homeostatic and synthesis functions. However, some of these roles are not compensated by current replacement therapy [5, 6].

Available treatments include replacement function by dialysis or transplant, but unfortunately, these therapies are associated with a high morbidity and mortality, and kidney transplantation is limited by the shortage of donor organs, immune rejection and lifelong treatment with immunosuppressive [3].

\*Correspondence: rdmacuil@yahoo.com.mx; rdalgadom@ipn.mx

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, CIBA-Tlaxcala, Instituto Politécnico Nacional, 90700 Tepetitla, Tlaxcala, Mexico  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2017. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

## REVIEW ARTICLE

# Potential Therapeutic Strategies of Regenerative Medicine for Renal Failure

Monica Maribel Mata-Miranda<sup>1,2</sup>, Raul Jacobo Delgado-Macuil<sup>2</sup>, Marlon Rojas-Lopez<sup>2</sup>, Ricardo Martinez-Flores<sup>1</sup> and Gustavo Jesus Vazquez-Zapien<sup>2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Escuela Médico Militar, Centro Militar de Ciencias de la Salud, Secretaría de la Defensa Nacional, Ciudad de México, C.P. 11200, México; <sup>2</sup>Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional, Tepetitla, Tlaxcala, 90700, México; <sup>3</sup>Laboratorio de Embriología, Escuela Médico Militar, Centro Militar de Ciencias de la Salud, Secretaría de la Defensa Nacional, Ciudad de México, C.P. 11200, México

**Abstract:** Kidney diseases are a public health problem worldwide. Available therapies include function replacement by dialysis or transplant, which are associated with a high morbidity and mortality. Likewise, none of these treatments compensate all kidney functions. There is a great concern in developing more effective therapies with the ability to replace the wide range of renal functions, so that, new studies on developing therapeutic strategies have focused on regenerative medicine. The aim of this paper is to review the new advances in regenerative medicine for renal failure treatment. Regenerative medicine comprises two therapeutic strategies: cell therapy and tissue engineering. Cell therapy techniques depend on cell and tissue cultures, with the aim to replace morphological structures, tissues, and functions. The main strategic strength of cell therapy in renal failure is the incorporation of additional cells in a damaged kidney, for which purpose different kind of Stem Cells (SCs) have been used such as Embryonic SCs, induced Pluripotent SCs, Multipotent SCs, Renal SCs, or drugs that increase survival and mobilization of SCs. Tissue engineering complements cell therapy combining techniques of biological sciences and engineering to create structures and devices as scaffolds, matrices or 3D biocompatible materials. Even though there is a significant advance in regenerative medicine strategies, we are far from using any of its techniques on health institutions, due to it is necessary to evaluate side effects, biodistribution, dosage, type of administration, vehicle of cell therapy, as well as the evaluation of response time and long-term studies, among other studies.

## ARTICLE HISTORY

Received: October 29, 2016  
Revised: January 12, 2017  
Accepted: March 10, 2017  
DOI:  
10.2174/1574888X12666170317163416

**Keywords:** Renal failure, regenerative medicine, cell therapy, tissue engineering.

## INTRODUCTION

Kidney diseases are a global public health problem, causing devastating consequences in society. Globally, the mortality rate is between 50% and 80%, and more than 2 million people receive renal replacement therapy, but this probably represents less than 10% of those who need it [1, 2]. There is an increase in this epidemiologic tendency correlated with the rise of longevity and the conditions that cause renal complications such as cardiovascular disease, arterial hypertension and diabetes [3].

Usually, Renal Failure (RF) is divided into acute and chronic, and these stages cover a broad range of etiologies. When elevated blood urea nitrogen (BUN) or alterations in the urinary parameters are developed in hours or days, it is an acute process; on the other hand, if renal disease signs are

prolonged up to several weeks, it represents a progressive process (subacute) and finally, when it is extended up to months or years it will take a chronic course and can be associated with acute exacerbations [4].

The kidney performs essential physiological functions such as excretion of metabolic waste, homeostatic functions, glutathione synthesis, ammoniogenesis, hormones and growing factors catabolism, immunologic regulation, as well as the production and regulation of multiple inflammation cytokines [5]. Although most kidney diseases do not have symptoms until later in their course, some of the physiological affectations above mentioned may cause nausea, vomiting, dyspnea, edema, muscle cramps, lack of appetite, dysuria, poor concentration, sleep disturbance, and constipation [6].

Available therapies for RF are the replacement of function with dialysis or transplant, but unfortunately, dialysis is associated with an elevated morbidity and mortality, and despite the progress in kidney transplant, the lack of organ donors limits the treatment, besides the immune rejection and the need for lifelong immunosuppressive therapy [7, 8].

\*Address correspondence to this author at the Laboratorio de Embriología, Escuela Médico Militar, Centro Militar de Ciencias de la Salud, Secretaría de la Defensa Nacional, Cerrada de Palomas S/N, Lomas de Sotelo, Miguel Hidalgo, Ciudad de México, 11200, México; Tel: +52 55 55 40 77 28 Exts. 1575, 1577; E-mail: [gus1202@hotmail.com](mailto:gus1202@hotmail.com)

[dx.doi.org/10.17488/RMIB.38.1.17](https://doi.org/10.17488/RMIB.38.1.17)

# Componentes Principales mediante Espectroscopia FTIR como Técnica de Caracterización Innovadora durante la Diferenciación de Células Madre Pluripotentes a Células Pancreáticas

## Principal Components by FTIR Spectroscopy as Innovative Characterization Technique during Differentiation of Pluripotent Stem Cells to Pancreatic Cells

M.M. Mata-Miranda<sup>1,2</sup>, C.I. Guerrero-Robles<sup>3</sup>, M. Rojas-López<sup>2</sup>, R.J. Delgado-Macui<sup>2</sup>, C.A. González-Díaz<sup>1,3</sup>, V. Sánchez-Monroy<sup>1,4</sup>, D. G. Pérez-Ishiwara<sup>4</sup>, G.J. Vázquez-Zapién<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>SEDENA, Centro Militar de Ciencias de la Salud, Escuela Médico Militar-Escuela Militar de Graduados de Sanidad, México.

<sup>2</sup>Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada-Tlaxcala, México.

<sup>3</sup>Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Medicina, México.

<sup>4</sup>Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, México.

### RESUMEN

Dos de los grandes retos en la biología de las Células Madre (CM) y la Medicina Regenerativa, son el control en la diferenciación de estas células y asegurar la pureza de las células diferenciadas, por lo que es necesario contar con técnicas rápidas, eficientes y precisas para la caracterización de CM y su diferenciación a diferentes linajes celulares. El objetivo de este trabajo fue analizar Células Madre Pluripotentes (CMP) y Células Pancreáticas Diferenciadas (CPD) mediante espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y Análisis de Componentes Principales (ACP). Para ello se diferenciaron CMP a CPD, caracterizando el proceso de diferenciación a los días 0, 11, 17 y 21 mediante microscopía óptica y espectroscopia vibracional. Los espectros FTIR se analizaron con el método multivariado de ACP, utilizando su segunda derivada en las regiones de proteínas, carbohidratos y ribosas. Los resultados indican que el ACP permite caracterizar y discriminar CMP y CPD en sus diferentes etapas de diferenciación en las regiones espectrales analizadas. Con lo anterior concluimos que el ACP permite caracterizar química y estructuralmente CMP y diferentes etapas de su diferenciación en una forma rápida, precisa y no invasiva.

**PALABRAS CLAVE:** Células Madre pluripotentes, Diferenciación, Espectroscopía FTIR, Componentes Principales.

## Presentación de trabajo en congreso



 BIT's 8th World Congress of Regenerative Medicine & Stem Cell-2015 Shanghai, China

**Title: Biomolecular Characterization of Differentiated Kidney Cells Types from Mouse Pluripotent Stem Cells**

**Dr. Monica Mata**  
Professor  
Escuela Medico Militar  
Mexico  
Collaborators: Marlon Rojas-Lopez, Raul J. Delgado-Macuil, David G. Perez-Ishiwara, Virginia Sanchez-Monroy, Claudia Martinez-Martinez and Gustavo J. Vazquez-Zapien.

**Abstract**

Kidney diseases are a world health problem. Actual therapies are associated with high morbidity and mortality; moreover, the shortage of donor organs, limits the treatment. New therapies with the ability to replace renal function need to be developed. In this work, we generated kidney cell types from mouse pluripotent stem cells (mPSC), analyzing along differentiation their morphological, genic, phenotypic, and spectroscopic characteristics. For this purpose, mPSC were exposed to kidney differentiation inducers. At day 0, 10 15 and 20 of differentiation, genetic (*oct-4*, *sox-2*, *pax-2*, *wt-1* and *pax-2*) and spectroscopic analysis by Fourier transform infrared in attenuated total reflection were made. Also, at day 20, *wt-1*, *pax-2* and E-cadherin proteins were immunodetected. The results showed that along differentiation embryonic bodies with typical morphology were formed; *pax-2* (metanephric mesenchyme development gen) increased its expression at

day 10, *wt-1* (essential kidney embryology development gen) and *ksp* (mature kidney gene) increased their expression until day 15. Subsequently, *wt-1*, *pax-2* and E-cadherin proteins were detected at day 20. mPSC spectroscopy analysis reveals the presence of an intense band at  $1644\text{ cm}^{-1}$  related with amide I functional group of proteins. On second derivative of the spectrum, several bands associated with secondary protein structure,  $\alpha\beta$ -sheets ( $1633\text{ cm}^{-1}$ ),  $\alpha$ -helices ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ),  $\beta$ -turns ( $1680\text{ cm}^{-1}$ ) and antiparallel  $\beta$ -sheets ( $1694\text{ cm}^{-1}$ ) were observed. Furthermore, mPSC second derivative spectra (10, 15 and 20 days) show a shift and broadening of the band of  $\alpha$ -helices at  $1650\text{ cm}^{-1}$  due to the overlapping with the bands of the *wt-1*, *pax-2* and E-cadherin proteins.

**Biography**

Dr. Monica Mata now is a Professor and Laboratory Head of Cell and Tissue Biology at Escuela Medico Militar, Mexico. She earned her B.Sc. in medicine at Escuela Medico Militar, she received her M.Sc. degree with honor in Biomedical Sciences from Escuela Militar de Graduados de Sanidad, and her M.Sc. in Education from Universidad Interamericana para el Desarrollo. Nowadays, she is Ph.D. student at Instituto Politecnico Nacional. Dr. Monica Mata has based her work on pluripotent stem cells applications and differentiation; on 2014, she and her research team were awarded with the XIII Biennial Prize of Ophthalmology in Mexico.

Posters

Otros trabajos del autor desarrollados durante el periodo doctoral

Artículos publicados

Rev. Sanid. Milit. Mar. 2014; 68(4) Jul.-Ago: 233-237

Artículo de revisión

## Investigación básica con células madre pluripotentes en la Escuela Médico Militar

Mayor M.C. Mónica Maribel Mata-Miranda,\*

Cap. 1/o. Q.B. Virginia Sánchez-Monroy,\*\* Mayor M.C. Gustavo Jesús Vázquez-Zapién\*\*\*

Escuela Médico Militar. Ciudad de México.

### RESUMEN

El estudio y uso de las células madre (SC, del inglés *stem cells*) en la terapia de reemplazo celular, ha establecido un gran paso a una nueva era en la medicina. Sin embargo, la ciencia aún se ha visto superada por diferentes ámbitos a la hora de decidir el lugar y el momento en que esta nueva alternativa se haga realidad.

Las SC son células inmaduras, autorrenovables y capaces de generar uno o más tipos de células diferenciadas y se clasifican de acuerdo con su potencial de diferenciación en totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales.

El trasplante de SC parece una herramienta prometedora para la regeneración de tejidos enfermos, dañados o defectuosos. Las células madre mesenquimales (MSC) ya se han utilizado para restaurar células hematopoyéticas desde hace más de 50 años, pero los rápidos adelantos en la investigación han planteado la posibilidad de usar otros tipos de células madre para el reemplazo celular y tisular, como las células madre embrionarias (ESC) pluripotentes en diabetes mellitus (DM).

En los Laboratorios de Investigación de la Escuela Médico Militar (EMM), recientemente se iniciaron trabajos de Investigación Básica para la caracterización y estandarización de cultivos celulares de ESC de ratón y su diferenciación a células pancreáticas tempranas.

El objetivo de este artículo es difundir las generalidades y aplicaciones de las SC, así como la Investigación Básica que se realiza en el Instituto Armado con estas células.

**Palabras clave:** Células madre, células madre embrionarias, pluripotencialidad, cuerpos embrionarios, células pancreáticas diferenciadas.

### *Basic research with pluripotent stem cells in the Military Medical School*

### SUMMARY

The study and use of stem cells (SC) in cell replacement therapy are setting a great transition for a new medicine era. However, different fields have overtaken science at the time to decide where and when this new alternative will come a reality.

The SC are immature cells, self-renewable and capable to generate one or more types of differentiated cell, according to their differentiation capacity they classified in: totipotential, pluripotential, multipotential and unipotential.

SC transplantation seems a promising tool for the regeneration of diseased, damaged or defective tissue.

Mesenchymal stem cells (MSC) have been used to restore hematopoietic cells for over 50 years, but the expedited advances in research, have raised the possibility to use another type of SC for cell and tissue replacement, as embryonic SC (ESC) in diabetes mellitus (DM).

In the Research Laboratory at Escuela Médico Militar (EMM), recently some basic research have been initiated for the characterization and standardization of mouse ESC cultures, and their differentiation into early pancreatic cell.

The purpose of this article is to spread the generalities and applications of SC, and the basic research that is done in the Armed Forces Institute with this cells.

**Key words:** Stem cells, embryonic stem cells, pluripotentiality, embryonic bodies, differentiated pancreatic cells.

\* Maestra en Ciencias Biomédicas, Jefe del Laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar y alumna de doctorado del Centro de Investigación en Biotecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional. \*\* Doctora en Ciencias con Especialidad en Biomedicina Molecular, adscrita a la Escuela Militar de Graduados de Sanidad y al Instituto Politécnico Nacional. \*\*\* Maestro en Ciencias Biomédicas, Jefe del Laboratorio de Embriología de la Escuela Médico Militar y alumno de doctorado del Centro de Investigación en Biotecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional.

Correspondencia: Dr. Gustavo Jesús Vázquez-Zapién  
Escuela Médico Militar, Laboratorio de Embriología, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, Cerrada de Palomas s/n Esq. Periférico, Col. Lomas de San Isidro, C.P. 11200, México, D.F. Correo-e: gus1202@hotmail.com

Recibido: Enero 29, 2014.

Aceptado: Mayo 16, 2014.

## Eficacia en la cicatrización de lesiones retinianas traumáticas al implantar células madre pluripotentes de ratón. Modelo experimental en ratas

Mayor M.C. Gustavo Jesús Vázquez-Zapién,\*

Mayor M.C. Luis Rubén Martínez-Nava,\*\* Mayor M.C. Mónica Maribel Mata-Miranda\*\*\*

Escuela Médico Militar. Ciudad de México.

### RESUMEN

**Objetivo.** Determinar la eficacia en la cicatrización del implante de células madre pluripotentes de ratón en un modelo murino con lesión retiniana traumática.

**Material y métodos.** Se cultivaron células madre embrionarias de ratón; posteriormente se implementó un modelo en rata con retinotomía con trocar de 27G. Se utilizaron cuatro grupos, cada uno con diez ratas *Rattus norvegicus* (40 ojos). Los grupos se trataron como sigue: Grupo Control no recibió tratamiento, Grupo 1 recibió 0.025 mL intravítreo de solución salina balanceada, Grupo 2 se le implantaron 20,000 células intravítreas y Grupo 3 recibió 50,000 células intravítreas resuspendidas en 0.025 mL de solución salina balanceada; se trataron a la primera, segunda y cuarta semanas posterior a la retinotomía. Tres meses después de la lesión se sometieron a estudio histopatológico.

**Resultados.** En todos los grupos se valoró histológicamente la respuesta inflamatoria e integridad anatómica, encontrando en el Grupo Control y Grupo 1 inflamación y alteración anatómica moderada, mientras que en los Grupos 2 y 3 la inflamación fue de escasa a nula, restaurándose la integridad anatómica.

**Conclusiones.** El implante de células madre embrionarias de ratón es eficaz para una mejor cicatrización de lesiones retinianas traumáticas al reducir la respuesta inflamatoria y restaurar la integridad anatómica.

*Efficacy in healing traumatic retinal lesions by implanting mouse pluripotent stem cells. Experimental rat model*

### SUMMARY

**Objective.** To determine the efficiency of the cicatrization after implanting mouse pluripotent stem cells in a murine model with a retinal injury.

**Material and methods.** Mouse embryonic stem cells were cultured; later on a rat model with retinotomy was implemented using a 27G trocar. 4 experimental groups were studied, each one containing 10 rats *Rattus norvegicus* (40 eyes). The groups received different treatments in a intravitreal way as follows: control group did not received any treatment, Group 1 received 0.025 mL of balanced salt solution, Group 2 received 20,000 cells resuspended in 0.025 mL of balanced salt solution and Group 3 received 50,000 cells resuspended in 0.025 mL of balanced salt solution. All the groups received the treatment at the first, second and fourth weeks after the retinotomy. Three months after the retinal injury and histopathological study was done.

**Results.** The inflammatory response and histological integrity were studied in all the groups. The findings were as follows: Control Group and Group 1 showed moderate inflammation and anatomical changes, moreover Groups 2 and 3 showed a low or null inflammation and the anatomical integrity was restored.

**Conclusions.** Intravitreal implantation of Mouse embryonic stem cells is effective for better cicatrization of traumatic retinal injuries in order to reduce the inflammatory response and the anatomical changes.

**Palabras clave:** Células madre; retina; lesión retiniana.

**Key words:** Stem cells; retina; retinal injury.

\* Maestro en Ciencias Biomédicas, Jefe del Laboratorio de Embriología de la Escuela Médico Militar y alumno de doctorado del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional. \*\* Especialista en Oftalmología, Jefe del Servicio de Oftalmología del Hospital Militar Regional de Tampico, Tamps. \*\*\* Maestra en Ciencias Biomédicas, Jefe del Laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar y alumna de doctorado del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional.

Correspondencia: Dra. Mónica Maribel Mata-Miranda  
Escuela Médico Militar, Laboratorio de Embriología, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, Cerrada de Palomas S/N Esq. Periférico, Col. Lomas de San Isidro, C.P. 11200, México, D.F.  
Correo e: mmcmaribel@gmail.com

Recibido: Mayo 24, 2014.  
Aceptado: Octubre 4, 2014.

RESEARCH

Open Access

# Histologic and spectroscopic study of pluripotent stem cells after implant in ocular traumatic injuries in a murine model

Gustavo Jesús Vázquez-Zapién<sup>1,2†</sup>, Marlon Rojas-López<sup>2†</sup>, Raúl Jacobo Delgado-Macuil<sup>2†</sup>, Luis Rubén Martínez-Nava<sup>3†</sup>, David Guillermo Pérez-Ishiwara<sup>2,4†</sup> and Mónica Maribel Mata-Miranda<sup>2,5\*†</sup>

## Abstract

**Introduction:** Ocular trauma is defined as a trauma caused by blunt or penetrating mechanisms on the eyeball and its peripheral structures, causing damage with different degrees of affection with temporary or permanent visual function compromise. Ocular trauma is a major cause of preventable blindness worldwide; it constitutes 7% of all corporal injury and 10% to 15% of all eye diseases. Regenerative medicine research has opened up the possibility to use stem cells as a source of cell replacement, so that experimental studies on embryonic stem cells and bone marrow stem cells have been carried out. In this study, we analyzed the histopathological and spectroscopic changes in ocular tissue with trauma, treated with mouse pluripotent stem cells.

**Methods:** Firstly, mouse embryonic stem cells were seeded. Subsequently, the obtained cells were implanted in a murine model of scleral and retinal damage at the first, second, and fourth weeks post-trauma. At week 12 post-trauma, the eyes were enucleated for histopathologic study (inflammatory response and histological integrity) and spectroscopic analysis by Fourier transform infrared spectroscopy in the attenuated total reflection configuration. Data were analyzed by one-way analysis of variance.

**Results:** Histopathological results showed that the experimental groups treated with stem cells presented a decrease in the inflammatory response, and the histological integrity was restored, which contrasted with the experimental group treated with saline solution. Moreover, in the spectroscopic analysis, characteristic bands of biological samples were observed in all tissues, highlighting in healthy tissues the presence of C = O bond at  $1,745\text{ cm}^{-1}$ , which was not observed in the injured and treated tissues. Also, the absorption spectrum of the tissues treated with embryonic stem cells showed bands whose intensity was high at around  $1,080$  to  $1,070\text{ cm}^{-1}$ . It has been reported that these bands are characteristic of pluripotent stem cells.

**Conclusions:** The implant of embryonic stem cells could be a useful therapeutic treatment after traumatic eye injuries or many other eye diseases to reduce the inflammatory response and restore histological integrity. Furthermore, the spectroscopic technique could be used as a complementary technique for detecting stem cell incorporation into various tissues.

\* Correspondence: [mmcmaribel@gmail.com](mailto:mmcmaribel@gmail.com)

†Equal contributors

<sup>2</sup>CIBA-Tlaxcala, Instituto Politécnico Nacional, Tepetitla, Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala 90700, Mexico

<sup>5</sup>Cell Biology Laboratory, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, Cerrada de Palomas S/N, Lomas de Sotelo, Delegación Miguel Hidalgo, México DF 11200, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



REVISIÓN

## Implante de condrocitos autólogos con potencial regenerativo en lesiones articulares



Monica Maribel Mata-Miranda<sup>a</sup>, Luis Enrique Paredes-González<sup>b</sup>,  
Claudia María Martínez-Martínez<sup>c</sup> y Gustavo Jesus Vázquez-Zapién<sup>d,\*</sup>

<sup>a</sup> Maestra en Ciencias Biomédicas, Mayor Médico Cirujano Jefe del Laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Escuela Médico Militar y alumna de doctorado del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, México

<sup>b</sup> Residente de la especialidad de Ortopedia y Traumatología, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, México

<sup>c</sup> Químico clínico, profesor titular de tiempo completo de la Escuela Médico Militar, México

<sup>d</sup> Maestro en Ciencias Biomédicas, Mayor Médico Cirujano Jefe del Laboratorio de Embriología de la Escuela Médico Militar y alumno de doctorado del Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada del Instituto Politécnico Nacional, México

Recibido el 24 de marzo de 2015; aceptado el 20 de octubre de 2015

Disponible en Internet el 27 de noviembre de 2015

### PALABRAS CLAVE

Lesión articular;  
Condrocitos;  
Implante

**Resumen** Las lesiones del cartílago articular son una de las principales causas de atención en los sistemas de salud y se han convertido en un problema real de salud pública, especialmente en países en los cuales la esperanza de vida y, consecuentemente, la patología articular han incrementado. El cartílago articular es un tejido altamente especializado que proporciona una superficie de unión en el extremo final de las articulaciones de los huesos que forman el cartílago. El único tipo celular del cartílago articular es el condrocito, el cual es una célula altamente diferenciada que tiene capacidad limitada de proliferación y migración, además de carecer de aporte sanguíneo, tejido nervioso y vasos linfáticos, lo que condiciona un bajo potencial de reparación. Las lesiones de cartílago articular generalmente conducen a degeneración progresiva de las articulaciones. A pesar de los grandes avances en ciencias básicas, ingeniería genética y de tejidos, estas lesiones siguen siendo un problema complejo ya que en la actualidad no existe ningún tratamiento que garantice plenamente resultados satisfactorios en el paciente a medio y largo plazos. El implante de condrocitos autólogos (ICA) es una opción terapéutica prometedora y eficaz para el manejo de lesiones del cartílago hialino, con buenos y, principalmente, duraderos resultados funcionales en el momento de compararlo con otras opciones terapéuticas. La obtención y expansión de condrocitos humanos son procedimientos iniciales para el posterior ICA, lo cual proveería de una fuente de reemplazo articular y regenerativa que evitaría la incapacidad de pacientes con lesiones condrales.

*Nivel de evidencia clínica:* Nivel IV

© 2015 Sociedad Colombiana de Ortopedia y Traumatología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [gus1202@hotmail.com](mailto:gus1202@hotmail.com) (G.J. Vázquez-Zapién).

## Effect of Resveratrol on Mitochondrial Activity in Differentiated Mature Adipocytes

Efecto del Resveratrol sobre la Actividad Mitocondrial en Adipocitos Maduros Diferenciados

Noriega-González, J. E.\*; Chirino, Y. L.\*\*; Mata-Miranda, M. M.\*\*\*;  
Vázquez-Zapién, G. J.\*\*\*\* & Sánchez-Monroy, V.\*\*\*\*\*

NORIEGA-GONZÁLEZ, J. E.; CHIRINO, Y. L.; MATA-MIRANDA, M. M.; VÁZQUEZ-ZAPIÉN, G. J. & SÁNCHEZ-MONROY, V.  
Effect of resveratrol on mitochondrial activity in differentiated mature adipocytes. *Int. J. Morphol.*, 33(3):1085-1092, 2015.

**SUMMARY:** Obesity has reached epidemic proportions, the World Health Organization (WHO) estimates that there are more than 1,000 million overweight adults world-wide. Furthermore, obesity is characterized as an overgrowth of white adipose tissue as a result of adipocyte hypertrophy and hyperplasia. Mitochondria is considered the source of energy within the adipocyte, since it contains the molecular machinery, and it is involved in a large number of metabolic pathways, besides the transformation of chemical energy into adenosine triphosphate. Mitochondria shortage and adipocyte dysfunction result in an excessive accumulation of triacylglycerol in the cytoplasm, which determines an imbalance between energy production and energy expenditure. Resveratrol (RSV) is a polyphenol found in different plants and its effects have been associated with mitochondrial biogenesis. An adipogenesis *in vitro* model (3T3-L1 preadipocytes) was used, and these cells were differentiated into mature adipocytes. Subsequently the effect of RSV on the adipocytes morphology, the lipid content and mitochondrial activity was evaluated using microscopic and flow cytometry techniques. The effect of RSV on differentiated mature adipocytes, was characterized by the decrease in lipid content and the consequently declination of the mitochondrial activity. 3T3-L1 preadipocytes retained the differentiation ability until passage 18. The RSV at doses of 25 and 50  $\mu$ M for 48 hours in differentiated mature adipocytes promoted the decreased in lipid content probably due to an increase in mitochondrial activity in the early hours of RSV exposure, causing the consequently declination of mitochondrial activity at the end of 48 hours.

**KEY WORDS:** Preadipocytes; Differentiated mature adipocyte; Mitochondrial activity; Resveratrol.

### INTRODUCTION

Obesity is defined as body mass index greater than 30 kg/m<sup>2</sup>, and it is becoming a major health problem in the world. Obesity has taken epidemic global dimensions; the World Health Organization estimates that there are more than 1,000 million overweight adults, of these about 300 million are obese (Kopelman, 2007). Social change and nutrition transition have turned obesity into a global epidemic.

Economic development, modernization, urbanization and globalization of food markets, are some of the elements that have contributed to the epidemic of obesity, besides the significant decrease in the physical activity, which is associated with the increased use of automated transport, the use of technology at home, among others (WHO, 2013).

Obesity is associated with premature death through the increased risk of many chronic diseases, including type 2 diabetes mellitus (DM2), cardiovascular disease and certain cancers, besides being related with respiratory distress syndrome, chronic musculoskeletal problems, skin diseases and infertility. Obesity is characterized as an overgrowth of white adipose tissue as a result of adipocyte hypertrophy and hyperplasia (Guh *et al.*, 2009). There are two kinds of human adipose tissue, white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT). The most abundant is the WAT, the same that is distributed throughout the body, it has the ability to expand massively, and it is a heterogeneous tissue since it contains diverse cell types, mostly white adipocyte. These adipocytes are surrounded by fibroblasts, endothelial cells, immune cells and nerves (Cristancho & Lazar, 2011).

\* Laboratorio de Embriología, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, México D.F., México.

\*\* Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepanitla, México.

\*\*\* Laboratorio de Biología Celular y Tissular, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, México D.F., México.

\*\*\*\* CIBA-Tlaxcala, Instituto Politécnico Nacional, Tepetitla, Tlaxcala, México.

\*\*\*\*\* Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, México D.F., México.

\*\*\*\*\* Programa Institucional de Biomedicina Molecular ENMyH, Instituto Politécnico Nacional, México D.F., México.

# Morphological, genetic and phenotypic comparison between human articular chondrocytes and cultured chondrocytes

Mónica Maribel Mata-Miranda<sup>1,2</sup> · Claudia María Martínez-Martínez<sup>1</sup> · Jesús Emmanuel Noriega-González<sup>3</sup> · Luis Enrique Paredes-González<sup>4</sup> · Gustavo Jesús Vázquez-Zapién<sup>2,3</sup>

Accepted: 12 April 2016  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

**Abstract** Articular cartilage is an avascular and aneural tissue with limited capacity for regeneration. On large articular lesions, it is recommended to use regenerative medicine strategies, like autologous chondrocyte implantation. There is a concern about morphological changes that chondrocytes suffer once they have been isolated and cultured. Due to the fact that there is little evidence that compares articular cartilage chondrocytes with cultured chondrocytes, in this research we proposed to obtain chondrocytes from human articular cartilage, compare them with themselves once they have been cultured and characterize them through genetic, phenotypic and morphological analysis. Knee articular cartilage samples of 10 mm were obtained, and each sample was divided into two fragments; a portion was used to determine gene expression, and from the other portion, chondrocytes were obtained by enzymatic disaggregation, in order to be cultured and expanded in vitro. Subsequently, morphological, genetic and phenotypic characteristics were compared between in situ (articular cartilage) and cultured chondrocytes. Obtained

cultured chondrocytes were rounded in shape, possessing a large nucleus with condensed chromatin and a clear cytoplasm; histological appearance was quite similar to typical chondrocyte. The expression levels of *COL2A1* and *COL10A1* genes were higher in cultured chondrocytes than in situ chondrocytes; moreover, the expression of *COL1A1* was almost undetectable on cultured chondrocytes; likewise, *COL2* and *SOX9* proteins were detected by immunofluorescence. We concluded that chondrocytes derived from adult human cartilage cultured for 21 days do not tend to dedifferentiate, maintaining their capacity to produce matrix and also retaining their synthesis capacity and morphology.

**Keywords** Cultured chondrocytes · Articular injuries · Characterized chondrocytes

## Introduction

Cartilage damage is a relatively common type of injury seen in today's clinical orthopedic practice. Articular cartilage is an avascular and aneural tissue with a limited capacity of regeneration, promoting its deterioration and consequently, the development and progression to osteoarthritis (OA) (Zhang et al. 2014).

OA is the most common chronic condition of the joints, affecting approximately 27 million of adults in USA during 2005, and definitely, it has an impact on society and health institutions because it represents a high cost in healthcare resources and diminishes patient's quality of life. According to some investigations, it is estimated that the expenses overpass 89 billion dollars per year (Esser and Bailey 2011).

✉ Gustavo Jesús Vázquez-Zapién  
gus1202@hotmail.com

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, 11200 Ciudad de México, Mexico

<sup>2</sup> CIBA-Tlaxcala, Instituto Politécnico Nacional, 90700 Tepetitla, Tlaxcala, Mexico

<sup>3</sup> Laboratorio de Embriología, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, Cerrada de Palomas S/N, Lomas de Sotelo, Miguel Hidalgo, 11200 Ciudad de México, Mexico

<sup>4</sup> Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, 11200 Ciudad de México, Mexico

## Research Article

# FTIR Spectroscopic and Molecular Analysis during Differentiation of Pluripotent Stem Cells to Pancreatic Cells

**Gustavo Jesus Vazquez-Zapien,<sup>1,2</sup> Monica Maribel Mata-Miranda,<sup>1,3</sup>  
Virginia Sanchez-Monroy,<sup>4,5</sup> Raul Jacobo Delgado-Macuil,<sup>1</sup>  
David Guillermo Perez-Ishiwara,<sup>1,5</sup> and Marlon Rojas-Lopez<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>CIBA-Tlaxcala, Instituto Politécnico Nacional, 90700 Tepetitla, TLAX, Mexico

<sup>2</sup>Laboratorio de Embriología, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, 11200 Ciudad de México, Mexico

<sup>3</sup>Laboratorio de Biología Celular y Tisular, Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, 11200 Ciudad de México, Mexico

<sup>4</sup>Laboratorio Multidisciplinario de Investigación, Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea, 11200 Ciudad de México, Mexico

<sup>5</sup>Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, 07320 Ciudad de México, Mexico

Correspondence should be addressed to Marlon Rojas-Lopez; marlonrl@yahoo.com.mx

Received 9 March 2016; Revised 12 July 2016; Accepted 20 July 2016

Academic Editor: Leonard M. Eisenberg

Copyright © 2016 Gustavo Jesus Vazquez-Zapien et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Some of the greatest challenges in stem cells (SCs) biology and regenerative medicine are differentiation control of SCs and ensuring the purity of differentiated cells. In this work, we differentiated mouse pluripotent stem cells (mPSCs) toward pancreatic cells characterizing this differentiation process by molecular and spectroscopic technics. Both mPSCs and Differentiated Pancreatic Cells (DPCs) were subjected to a genetic, phenotypic, and biochemical analysis by real-time quantitative PCR (RT-qPCR), immunocytochemistry, and Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy. Cultured mPSCs expressed pluripotent genes and proteins (*Nanog* and *SOX2*). DPCs expressed endodermal genes (*SOX17* and *Pdx1*) at day 11, an inductor gene of embryonic pancreas development (*Pdx1*) at day 17 and pancreas genes and proteins (*Insulin* and *Glucagon*) at day 21 of differentiation. Likewise, FTIR spectra of mPSCs and DPCs at different maturation stages (11, 17, and 21 days) were obtained and showed absorption bands related with different types of biomolecules. These FTIR spectra exhibited significant spectral changes agreeing with the differentiation process, particularly in proteins and nucleic acids bands. In conclusion, the obtained DPCs passed through the chronological stages of embryonic pancreas development and FTIR spectra provide a new biophysical parameter based on molecular markers indicating the differentiation process of mPSCs to specialized cells.

## 1. Introduction

Currently, world healthcare system is being overwhelmed by the increase in average life expectancy worldwide, leading to increase in the prevalence of several chronic degenerative diseases as well as their complications. Unfortunately, actual treatment options for most of these diseases do not slow any further deterioration or restore the function; rather they only treat the symptoms or partially replace the function, accumulating comorbidities and the consequent health deterioration.

Current stem cells (SCs) researches have opened new possibilities for the treatment of chronic diseases, and cell therapy now stands at the front-line of regenerative medicine and tissue engineering [1]. SCs can be used to improve healthcare, augmenting the regenerative potential of the body or for the development of new therapies [2].

An essential property of SCs is their potentiality, which refers to their capability to differentiate into different cell lineages under certain culture conditions. According to their origin and differentiation potential, SCs are classified as



## Certificate of Recognition

Conference Series LLC and the Editors of Journal of Stem Cell Research & Therapy, Journal of Tissue Science & Engineering and Journal of Regenerative Medicine applaud



Prof/Dr/Mr/Ms. **Monica Maribel Mata Miranda**

Instituto Politécnico Nacional, México

for her Poster Presentation  
at the "7<sup>th</sup> Annual Conference on  
Stem Cell and Regenerative Medicine"  
held during August 04-05, 2016 in Manchester, UK

Hazem Barmada

Mississippi Stem Cell Treatment Center, USA

Stem Cell Congress 2016

Coffee Break: 15:50-16:10 @ Outside Room

### Poster Presentations @ 16:10-17:00

- SCC-01** Title: Adhesion ability of human mesenchymal stem cells over expressing VLA-4 molecules via mRNA-ITGA-4 transfection  
**Anna Andrzejewska**, Mossakowski Medical Research Centre, Poland
- SCC-02** Title: Human adipose stem cells cultured with novel wood derived nanofibrillar cellulose  
**Raili Koivuniemi**, University of Helsinki, Finland
- SCC-03** Title: The treatments with a neurogenesis-promoting nutraceutical elicit cognitive improvement in an mouse model of Alzheimer's disease  
**Yung-Feng Liao**, Academia Sinica, Taiwan
- SCC-04** Title: Role of microrna in mesenchymal stem cell fate decisions  
**Bahareh Ghasemi**, King's College London, UK
- SCC-05** Title: Physiological and histological effects after implanting pluripotent stem cells in a murine model with anal canal injury  
**Monica Maribel Mata Miranda**, Instituto Politécnico Nacional, México

## Premios obtenidos durante el doctorado

**SOMIB**  
Sociedad Mexicana  
de Ingeniería Biomédica

**XXXIX**  
Congreso Nacional de  
Ingeniería Biomédica

La Sociedad Mexicana de Ingeniería Biomédica A.C.  
otorga el presente reconocimiento a:

CARLA I. GUERRERO-ROBLES, MÓNICA M. MATA-MIRANDA, CÉSAR A. GONZÁLEZ-DÍAZ, MARLON ROJAS-LÓPEZ, VIRGINIA SÁNCHEZ-MONROY, RAÚL J. DELGADO-MACUIL, DAVID. G. PÉREZ-ISHIWARA Y GUSTAVO J. VÁZQUEZ-ZAPIÉN.

Por su participación con el trabajo libre:

"Componentes Principales Mediante Espectroscopía FTIR como Técnica de Caracterización Innovadora durante la Diferenciación de Células Madre Pluripotentes a Células Pancreáticas" GANADOR DEL CONCURSO ESTUDIANTIL NIVEL POSGRADO.

en el XXXIX Congreso Nacional de Ingeniería Biomédica  
realizado del 25 al 28 de septiembre del 2016 en Mérida, Yucatán.

Ing. Elliot Vernet  
Presidente Somib

Dr. César A. González Díaz  
Presidente del Comité Científico Somib

La Sociedad Mexicana de Ingeniería Biomédica  
otorga el presente

**ICFORO**  
INTERNATIONAL CLINICAL ENGINEERING FORUM

**RECONOCIMIENTO**

a **Mónica M. Mata-Miranda**

Po haber obtenido el primer lugar en el concurso estudiantil "Mtro. Enrique Hernández Matos" con el trabajo *Análisis de Células Madre Pluripotentes Indiferenciadas y Fibroblastos a Través de Espectroscopía de Impedancia* del XXXVIII Congreso Nacional de Ingeniería Biomédica .  
Realizado del 29 al 31 de octubre de 2015.  
Mazatlán, Sinaloa, México

I.B. Elliot A. Vernet Saavedra  
Presidente SOMIB

I.B. Christian E. Vázquez Pizarro  
Director ICFORO

**SOMIB**  
Sociedad Mexicana  
de Ingeniería Biomédica



La Universidad Nacional Autónoma de México  
 El PROGRAMA UNIVERSITARIO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD  
 y la  
 ASOCIACIÓN PREMIO BIENAL DE OFTALMOLOGÍA

Otorgan el

# XIII PREMIO BIENAL DE OFTALMOLOGÍA

a:

Luis Rubén Martínez Nava, Gustavo Jesús Vázquez Zapién  
 Gabriel Antonio Ochoa Maynez, Mónica Maribel Mata Miranda



Por el desarrollo del trabajo: "Eficacia en la cicatrización de lesiones retinianas traumáticas al implantar células madre pluripotentes de ratón. Modelo experimental en ratón", realizado en la Escuela Militar de Graduados de Sanidad y Escuela Médico Militar de la Universidad del Ejército y Fuerza Aérea.

Ciudad Universitaria, México D.F. a 17 de junio de 2014.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Dr. Joaquín López-Sáenz  
 Coordinador del Programa Universitario

Dr. Tito Ramírez Luquín  
 Presidente de la Asociación

## BIBLIOGRAFÍA

1. Atkins RC. The epidemiology of chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005; 67: 14-18.
2. Levey A, Atkins R, Coresh J, et al. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives a position statement from kidney disease improving global outcomes. *Kidney Int* 2007; 72: 247-259.
3. Ren X, Zhang J, Gong X, Niu, et al. Differentiation of murine embryonic stem cells toward renal lineages by conditioned medium from ureteric bud cells in vitro. *Acta Biochim Biophys Sin* 2010;42(7):464-471.
4. Li Y and Wingert R. Regenerative medicine for the kidney: stem cell prospects & challenges. *Clin Transl Med* 2013;2(1):11-16
5. Boletín No. 1003 del 23-02-2016 de la cámara de diputados.
6. Tenorio M, Galeano C, Rodríguez N, et al. Diagnóstico diferencial de la insuficiencia renal aguda. *Nefro Plus* 2010;3(2):16-32
7. Mezzano S. and Aros C. Enfermedad renal crónica: clasificación, mecanismos de progresión y estrategias de renoprotección. *Rev Méd Chile* 2005; 133: 338-348
8. Ronald R. Acute Kidney Injury: Quoi de Neuf?. *Ochsner J.* 2014; 14(3):359–368.
9. Bruce S, Rea R, Steptoe A. et al. In vitro differentiation of murine embryonic stem cells toward a renal Lineage. *Differentiation.* 2007; 75:337–349
10. Norma Oficial Mexicana NOM-171-SSA1-1998, Para la práctica de hemodiálisis
11. Flaquer, Romagnani P, Cruzado J. Factores de crecimiento y regeneración renal. *Nefrología.* 2010;30(4):385-93.
12. Pollock C. Toward a bioartificial kidney: will embryonic stem cells be the answer?. *Kidney Int.* 2013; 83:543–545.
13. Lee P, Lin H, Jiang S, Lu P, et al. Mouse kidney progenitor cells accelerate renal regeneration and prolong survival after ischemic injury. *Stem cells* 2010;28:573–584.
14. Bajada S, Mazakova I, Ashton B, et al. Stem cells in regenerative medicine. *Topics in Tissue Engineering*, Eds. N Ashammakhi, R Reis, & F Chiellini 2008; vol. 4.
15. Carrel A. Contributions to the study of the mechanism of the growth of connective tissue. *J Exp Med* 1913;18(3):287–298.
16. Kang J. Regenerative medicine research: an open access translational medicine journal. *Regen Med Res* 2013;1(1):1.
17. Lamas J. Medicina regenerativa aplicada al tratamiento de las patologías musculoesqueléticas. *Reumatol Clin* 2014;10(3):139–140.
18. Zheng L and Cheung L. Stem cells in destiny. *Stem cell and regenerative medicine*, Betham e books 2010; 140-148.

19. Brodie J and Humes H. Stem cell approaches for the treatment of renal failure. *Pharmacol Rev* 2005;57(3):299–313.
20. Ma H, Cherg S, Yang Y. Stem cell and renal disease. *Academia Arena* 2009;1(1):57-61.
21. Vazquez-Zapien G, Sanchez-Monroy V, Chirino Y, Mata-Miranda MM. Caracterización morfológica, génica y proteica en la diferenciación de células madre embrionarias de ratón a células pancreáticas tempranas. *Int J Morphol* 2013;31(4):1421-1429.
22. Graf T. Historical origins of transdifferentiation and reprogramming. *Cell Stem Cell*. 2011;9:504-516.
23. Kim D and Dressler G. Nephrogenic Factors Promote Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Renal Epithelia. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(12):3527–3534, 2005.
24. Cherñawsky D, Sequeira M, Gó A. Bases moleculares del desarrollo renal *Arch Latin Nefr Ped*. 2002;2(1)
25. Fernández N, Figueroa V, Pérez J. WT-1. Expresión en la nefrogenesis. *Urol colomb*. 2009; 17(3):113-120.
26. Micu C, Micu B, Schmidt A et al. Anatomy and ontogeny of kidney development. *HVM Bioflux*. 2103; 5(1)34-39.
27. Murer L, Benetti E y Artifoni L. Embryology and genetics of primary vesico-ureteric reflux and associated renal displasia. *Pediatr Nephrol*. 2007;22: 788–797.
28. Morizane R, Monkawa T, Itoh H. Differentiation of murine embryonic stem and induced pluripotent stem cells to renal lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;390(4):1334–1339.
29. Porteous S, Torban E, Cho N, et al. Primary renal hypoplasia in humans and mice with PAX2 mutations: evidence of increased apoptosis in fetal kidneys pf Pax 1Neu +/- mutant mice. *Human Mol Gen*. 2000. 9(1) 1-11.
30. Singh AP, Junemann A, Muthuraman A, et al. Animal models of acute renal failure. *Pharmacol Rep*. 2012; 64(1): 31–44
31. Alderden R, Hal M, Hambley T. The Discovery and Development of Cisplatin. *J Chem Education*. 2006;83(5): 728-734.
32. Zhang L, Hanigan M. Role of Cysteine S-Conjugate neta-lyase in the Metabolism of Cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;306(3): 988–994.
33. Chirino Y, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverrí J. Peroxynitrite decomposition catalyst ameliorates renal damage and protein nitration in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *BMC Pharmacol*. 2004; 4:20.
34. Zhon H, Miyaji T, Kato A, et al. Attenuation of cisplatin-induced acute renal failure is associated with less apoptotic cell death. *J Lab Clin Med*. 1999; 134:649-658
35. Hanigan M, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms *Cancer Ther*. 2003;1: 47–61.

36. Ueki M, Ueno M, Morishita J, et. Al. D-Ribosa Ameliorates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity by Inhibiting Renal Inflammation in Mice. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2013;229: 195-201.
37. Lamberti A, Sanges C, Arcari P. FT-IR spectromicroscopy of mammalian cell cultures during necrosis and apoptosis induced by drugs. *Spectroscopy*. 2010; 24: 535–546.
38. Cao J, Ng E, McNaughton D, et al. The Characterisation of Pluripotent and Multipotent Stem Cells Using Fourier Transform Infrared Microspectroscopy. *J. Mol. Sci.* 2013;14: 17453-17476.
39. Barth A. The infrared absorption of amino acid side chains *Progress in Biophysics & Molecular. Biology.* 2000;74: 141–173.
40. Ami D, Neri T, Natalello A, et al. Embryonic stem cell differentiation studied by FT-IR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 2008; 1783: 98–106
41. Nishikawa M, Yanagawa N, Kojima N, et al. Stepwise renal lineage differentiation of mouse embryonic stem cells tracing in vivo development *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;417(2): 897–902.
42. Narayanan K, Schumacher k, Tasnim F, et al. Human embryonic stem cells differentiate into functional renal proximal tubular–like cells. *Kidney Int.* 2013; 83(4): 593–603.
43. Imberti B, Tomasoni S, Ciampi O, et al. Renal progenitors derived from human iPSCs engraft and restore function in a mouse model of acute kidney injury. *Sci Rep.* 2015;6: 1-7.
44. Li Y, Wingert R. Regenerative medicine for the kidney: stem cell prospects & challenges. *Clin Transl Med.* 2013;2(1):11.
45. Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A: Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 1998; 12(13): 2048-2060.
46. Keira S, Ferreira L, Gragnani A. Experimental model for fibroblast culture. *Acta Cir Bras* 2004; 19:11-15.
47. Clavijo M, Gomez D, Gomez C. Adipogenesis in vitro de células 3T3-L1 . *Rev Fac Med* 2007; 15(2):1-7.
48. Hernandez S, Bartulos E, Davila P, Jiménez A. Uso de catecolaminas para la diferenciación de células madre a cardiomiocitos. *Organización mundial de la propiedad intelectual.* 2010. WO2010/018297 A1.
49. Turner W, McCloskey K. Rapid fibroblast Removal from high density human embryonic stem cells cultures. *J Vs Exp* 2012; 28:(68).
50. Evans M, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292:154-156.
51. Wolf E, Bream G. *Biología de la reproducción. Sección desarrollo y aplicaciones de las células embrionarias primordiales. Biología de la reproducción, primera edición, Argentina: Minerales paraíso Sa., 2001. 168-186.*

52. Hui H. Glucagon Like Peptide-1 Directed Human Embryonic Stem Cell Differentiation Into Insulin-Producing Cells Via Hedgehog, cAMP, and PI3K pathway. *Pancreas* 2010; 39(3):315-322.
53. Ku T, Zhang N, Kubo A, et al. Committing Embryonic Stem cells to Early Endocrine Pancreas in Vitro. *Stem Cells*. 2004; 22:1205-1217.
54. Leahy A, Xiong J, Kuhnert F, et al. Use of developmental markers genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid formation. *Jour exp Zoo*. 1999; 284:67-81.
55. Dvash T, Mayshar Y, Darr H, et al. Temporal gene expression during differentiation of human embryonic stem cells and embryoid bodies. *Hum Reprod* 2004; 19(12):2875-2883.
56. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126 (4): 663-6676.
57. Chen X, Xu H, Yuan et al. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell*. 2008; 133(6): 1106-1117.
58. Chew J, Loh Y, Zhang W, et al. Reciprocal Transcriptional Regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 Complex in Embryonic Stem Cells *Mol Cell Biol*. 2005; 25(14): 6031–6046.
59. Lanza R. Essentials of stem cell biology, elseiver 2da edition 2009 cap 8 pag 50-58
60. Tompkins D, Besnard V, Lange A. Sox2 Activates Cell Proliferation and Differentiation in the Respiratory Epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45(1): 101–110.
61. Fanni D, Fanos V, Monga G, et al. Expression of WT1 during normal human kidney development. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011;24(2): 44-47.
62. Kreidberg J. WT1 and kidney progenitor cells Organogenesis. 2010; 6(2): 61-70.
63. Guo JK, Menke AL, Gubler MC, et al. WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Hum Mol Genet*. 2002; 11(6): 651–659.
64. Igarashi P, Shashikant CS, Thomson RB, et al. Ksp-cadherin gene promoter. II. Kidney-specific activity in transgenic mice. *Am J Physiol*. 1999; 277(4): 599-610.
65. Zhao W, Ji X, Zhang F, et al. Embryonic stem cell markers. *Molecules*. 2012; 17(6): 6196-6236.
66. Ginis I, Luo Y, Miura T, et al. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*. 2004; 269(2): 360–380.
67. Czechanski A, Byers C, Greenstein I, et al. Derivation and characterization of mouse embryonic stem cells from permissive and nonpermissive strains. *Nat Protoc*. 2014; 9(3): 559–574.

68. Cai Q, Dmitrieva NI, Ferraris JD, et al. Pax2 expression occurs in renal medullary epithelial cells in vivo and in cell culture, is osmoregulated, and promotes osmotic tolerance. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2005; 102(2): 503–508.
69. Su J, Li SJ, Chen ZH, et al. Evaluation of podocyte lesion in patients with diabetic nephropathy: Wilms' tumor-1 protein used as a podocyte marker. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010; 87(2): 167-175.
70. Prozialeck WC, Lamar PC, Appelt DM. Differential expression of E-cadherin, N-cadherin and beta-catenin in proximal and distal segments of the rat nephron. *BMC Physiol*. 2004; 4: 1-14.
71. Mata-Miranda M, Guerrero-Robles C, Rojas-López M, et al. Componentes Principales mediante Espectroscopia FTIR como Técnica de Caracterización Innovadora durante la Diferenciación de Células Madre Pluripotentes a Células Pancreáticas. *Rev Mex ling Biomed*. 2017; 38(1) 225-234.
72. Hoof D, Muñoz J, Braam SR, et al. Phosphorylation dynamics during early differentiation of human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009; 5(2): 214-226.
73. Kim SH, Kim MO, Cho YY, et al. ERK1 phosphorylates Nanog to regulate protein stability and stem cell self-renewal. *Stem Cell Res*. 2014; 13(1): 1-11.
74. Martínez M (ed). *Tratado de nefrología*, 2nd edn. Norma, Madrid, España, 1993, pp 189-220.
75. Bargmann W, Krisch B, Leonhardt H. Lipids in the proximal convoluted tubule of the cat kidney and the reabsorption of cholesterol. *Cell Tissue Res*. 1977; 177(4): 523-538.
76. Oh GS, Kim HJ, Shen A, et al. Cisplatin-induced Kidney Dysfunction and Perspectives on Improving Treatment. *Electrolyte Blood Press*. 2014; 12(2): 55–65.
77. Lu LH, Oh DJ, Dursun B, et al. Increased macrophage infiltration and fractalkine expression in cisplatin-induced acute renal failure in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 324(1): 111-117.
78. Aleksunes LM, Augustine LM, Scheffer GL, et al. Renal xenobiotic transporters are differentially expressed in mice following cisplatin treatment. *Toxicology*. 2008; 250(2-3): 82-88.
79. Sharp CN, Doll MA, Dupre TV, et al. Repeated administration of low-dose cisplatin in mice induces fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016; 310(6): 560-568.
80. Máthé A, Komka K, Forczig M, et al. The effect of different doses of cisplatin on the pharmacokinetic parameters of cefepime in mice. *Lab Anim*. 2006; 40(3): 296-300.
81. Takai N, Abe K, Tonomura M, et al. Imaging of reactive oxygen species using [3H]hydromethidine in mice with cisplatin-induced nephrotoxicity. *EJNMMI Res*. 2015; 5(1): 116.

82. Ciarimboli G, Deuster Dirk, Knief A, et al. Organic Cation Transporter 2 Mediates Cisplatin-Induced Oto- and Nephrotoxicity and Is a Target for Protective Interventions. *Am J Pathol.* 2010; 176(3): 1169–1180.
83. Liu M, Jia Z, Sun Y, et al. A H<sub>2</sub>S Donor GYY4137 Exacerbates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Mice. *Mediators Inflamm.* 2016; 2016: 8145785.
84. Rabe M, Schaefer F. Non-Transgenic Mouse Models of Kidney Disease. *Nephron.* 2016; 133(1): 53-61.
85. Nony PA, Schnellmann RG. Mechanisms of renal cell repair and regeneration after acute renal failure. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 304(3): 905-912.
86. Sun DF, Fujigaki Y, Fujimoto T, et al. Mycophenolate mofetil inhibits regenerative repair in uranyl acetate-induced acute renal failure by reduced interstitial cellular response. *Am J Pathol.* 2002; 161(1): 217-227.
87. Villanueva S, Ewertz E, Carrión F, et al. Mesenchymal stem cell injection ameliorates chronic renal failure in a rat model. *Clin Sci (Lond).* 2011; 121(11): 489-499.
88. Heng BC, Liu H, Cao T. Transplanted human embryonic stem cells as biological 'catalysts' for tissue repair and regeneration. *Med Hypotheses.* 2005; 64(6):1085-1088.
89. Brodie JC, Humes HD. Stem cell approaches for the treatment of renal failure. *Pharmacol Rev.* 2005; 57(3): 299–313.
90. Thomas Graf. Historical origins of transdifferentiation and reprogramming. *Cell Stem Cell.* 2011; 9:504-6.