



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Efectos biomoleculares en la implantación de células madre
embrionarias en un modelo murino de insuficiencia renal aguda.**

T E S I S

Que para obtener el título de:
Licenciado en Bioquímica Diagnóstica.

Presenta:

Carlos Eduardo Bernal Barquero

ASESORES:

Dr. en C. Gustavo Jesús Vázquez Zapién

M. en C. Maritere Domínguez Rojas

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

TINAJERO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTEZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Efectos biomoleculares en la implantación de células madre embrionarias en un modelo murino de insuficiencia renal aguda.

Que presenta el pasante: **Carlos Eduardo Bernal Barquero**
Con número de cuenta: **311285631** para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de Abril de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Ma. Esther Revuelta Miranda	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Gustavo y a la Dra. Mónica, por toda su experiencia, su tiempo y por sobre todo, la amistad que me brindaron; por la confianza y la paciencia que tuvieron conmigo, por todos los buenos momentos. Estoy en deuda con ustedes, muchas gracias por todo.

A mi asesora y profesora Maritere, porque desde sus clases he recibido la inspiración para hacer un trabajo como este, y porque me ha ayudado mucho en la realización de este proyecto. ¡Muchas gracias profesora!

A mi prima Pati y su esposo Enrique, a Janita y a Sara, porque amorosamente me abrieron las puertas de su casa cuando lo necesité, porque son y fueron una familia para mí mientras me encontraba lejos de mi hogar. No podré pagar con nada sus atenciones, gracias por siempre.

A mi tío y padrino el cnel. Francisco, quien ha sido un gran ejemplo para mi toda mi vida y que gracias a todo su apoyo pude realizar este trabajo. Te debo mucho tío, gracias.

A Melissa, porque colaboró importantemente para la realización de este proyecto, y porque con ella todo se vuelve más divertido. Gracias por todo tu apoyo Mel.

DEDICATORIAS

A mi madre, Alicia, quien no ha escatimado esfuerzo alguno y ha sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme; quien con ilusión ha trabajado para convertirme un hombre de provecho; quien ha sido incondicionalmente el apoyo que he necesitado siempre. Este trabajo te lo dedicó a ti mamá, porque el mérito también es tuyo, y porque no hay otra persona a quien le deba más en esta vida que a ti. Te amo.

A mi tía Mara, porque gran parte de lo que soy también te lo debo a ti, porque al imaginar mis logros los imagino compartiéndolos contigo, y porque has sido siempre el motor por el cual he logrado muchas cosas, el consejo oportuno, el abrazo que me hace falta. Por esto y más, gracias por siempre tía.

Por último, al más importante de todos: a Dios. Porque sin Él yo estaría perdido. Con su paternal amor me ha conducido y hablado desde el vientre de mi madre, y ha respondido de forma especial en todas mis oraciones, imprimiendo en mí una huella indeleble de su imagen y su ternura. Porque me ha amado hasta el extremo y ha cumplido todos los anhelos de mi corazón. No merezco nada de ti Señor, pero gracias por tanto amor.

1 Pedro 1:24-25. “Todo hombre es como la hierba, y su grandeza como la flor de la hierba; la hierba se seca y la flor se cae, pero la palabra del Señor, permanece por siempre.”

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
RESUMEN.....	V
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El riñón.....	1
1.1.1 Anatomía externa.....	1
1.1.2 Anatomía interna.....	1
1.1.3 La nefrona.....	2
1.2 Histología de la nefrona y el túbulo colector.....	3
1.3 Generalidades de la fisiología renal.....	5
1.4 La insuficiencia renal aguda.....	6
1.4.1 Tratamientos para la insuficiencia renal.....	7
1.5 Medicina regenerativa.....	9
1.5.1 Terapia celular con células madre.....	10
1.6 Generalidades sobre el cisplatino.....	11

1.6.1 Mecanismos de Nefrotoxicidad del Cisplatino (CDDP).....	12
1.7 El papel de p53 en la Nefrotoxicidad Inducida por CDDP.....	14
1.7.1 Evidencia de la participación de p53 en la Nefrotoxicidad Inducida por CDDP.....	15
1.7.2 Regulación Transcripcional de p53 en la Nefrotoxicidad Inducida por CDDP.....	16
1.8 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	17
1.8.1 La teoría sobre la espectroscopía infrarroja.....	17
1.8.2 Espectroscopía Infrarroja aplicada al análisis de muestras de interés biológico.....	24
1.8.3 Métodos de análisis de datos.....	29
1.8.4 FTIR aplicado al estudio de Insuficiencia Renal Aguda (IRA).....	31
2. JUSTIFICACIÓN.....	33
3. HIPÓTESIS.....	34
4. OBJETIVOS.....	35
4.1 Objetivo general.....	35
4.2 Objetivos específicos.....	35
5. METODOLOGÍA.....	36
5.1 Modelo murino de lesión renal.....	37
5.1.1 Modelos de estudio.....	37

5.1.2 Administración de CDDP.....	38
5.2 Obtención de muestras sanguíneas.....	39
5.3 Obtención de riñones.....	40
5.3.1 Criocortes.....	41
5.3.2 Tinción de cortes histopatológicos.....	42
5.3.3 Análisis histopatológico.....	43
5.4 Inmunohistoquímica y microscopía de fluorescencia.....	43
5.5 Micro-espectroscopia vibracional.....	44
5.5.1 Tratamiento espectral y análisis multivariado.....	45
5.6 Cultivo de Fibroblastos Embrionarios de Ratón (MEF).....	46
5.6.1 Arresto celular de los MEF.....	47
5.7 Cultivo de Células Madre Embrionarias de Ratón (mESC).....	48
5.7.1 Descripción morfológica.....	48
6. RESULTADOS.....	49
6.1 Análisis sanguíneo de los grupos de estudio.....	49
6.2 Análisis histopatológico.....	49
6.3 Inmunohistoquímica y microscopía de fluorescencia para p53.....	53
6.4 Micro-espectroscopía vibracional.....	55

6.4.1 Región de lípidos y proteínas.....	58
6.4.2 Región de ácidos nucleicos y carbohidratos.....	60
6.5 Expansión de MEF.....	62
6.5.1 Bloqueo del ciclo celular de los MEF.....	63
6.5.2 Expansión de las mESC.....	63
7. DISCUSIÓN.....	65
8. CONCLUSIONES.....	90
9. PERSPECTIVAS.....	91
10. REFERENCIAS.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS

CDDP. Cis-diaminodicloroplatino.

FTIR. Espectroscopia infrarroja por transformada de fourier.

IRA. Insuficiencia renal aguda.

MEF. Fibroblastos embrionarios de ratón.

mESC. *mouse Embryonic Stem Cells*.

NTA. Necrosis tubular aguda.

TCRR. Técnicas continuas de reemplazo renal.

Ctr1. *Copper transporter*.

OCT2. *Organic cation transporter*.

GST. *Glutathione-S-transferase*.

GGT. *Gamma glutamyl transpeptidase*.

ATR. *Attenuated total reflection*.

IRE *Internal reflection element*.

SG. *Savitzki-Golay*.

H-E. Hematoxilina y eosina.

SSI. Solución salina isotónica.

IDR. Inducción de daño renal.

SNV. *Standart Normal Variate*.

GEFyS. Glomeruloesclerosis focal y segmentaria.

TC. Túbulos de corteza

G. Glomérulos

TM. Túbulos de médula.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de aductos de CDDP.....	13
Figura 2. Vías de señalización de muerte celular inducida por CDDP.....	14
Figura 3. Vías de señalización de p53 que conducen a la apoptosis en células tubulares durante la nefrotoxicidad por CDDP.....	17
Figura 4. El espectro electromagnético.....	18
Figura 5. Regiones del infrarrojo en el espectro electromagnético.....	19
Figura 6. El espectro infrarrojo del octano, observado en transmitancia y absorbancia.....	21
Figura 7. Vibraciones moleculares de flexión y estiramiento del grupo -CH ₂	22
Figura 8. Curva de energía para un enlace vibrante (izquierda) y energía limitada al modelo mecánico cuántico (derecha).....	23
Figura 9. Espectro biológico típico que muestra las regiones de los principales compuestos biológicos (3,000-800 cm ⁻¹).....	26
Figura 10. Los tres principales modos de muestreo por micro-espectroscopía IR.....	27
Figura 11. Espectros de FTIR de células madre pluripotentes de ratón (mPSCs) y células de riñón diferenciadas (DKCs) medidas en la región de la huella biológica (1,800-800 cm ⁻¹).....	31
Figura 12. Diferenciación de los componentes del glomérulo mediante imágenes FTIR de alta definición.....	32
Figura 13. Diagrama experimental del proyecto.....	36
Figura 14. Línea del tiempo de los grupos de estudio.....	38
Figura 15. Administración de CDDP vía intraperitoneal.....	39
Figura 16. Obtención de muestra sanguínea.....	40
Figura 17. Extracción quirúrgica de riñones de ratón.....	41

Figura 18. Obtención de cortes histológicos.....	42
Figura 19. Técnica histológica.....	43
Figura 20. Microfotografía del sistema tubular y glomerular de ratones sanos.....	51
Figura 21. Microfotografía del sistema tubular y glomerular al día 4.....	51
Figura 22. Microfotografía del sistema tubular y glomerular al día 8.....	52
Figura 23. Microfotografía del sistema tubular y glomerular de ratones implantados con mESC.....	52
Figura 24. Controles negativos en riñón de ratón sano.....	53
Figura 25. Inmunodetección de p53 en tejido renal al día 4.....	54
Figura 26. Inmunodetección de p53 en tejido renal al día 8.....	55
Figura 27. Espectro FTIR de riñón e imágenes micro-espectroscópicas asociadas.....	57
Figura 28. Espectro FTIR de riñón de las bandas asociadas a proteínas y lípidos.....	58
Figura 29. Espectro FTIR de riñón de las bandas asociadas a proteínas y lípidos.....	59
Figura 30. Espectro FTIR de riñón de las bandas asociadas a ácidos nucleicos y carbohidratos.....	60
Figura 31. Espectro FTIR de riñón de las bandas asociadas a ácidos nucleicos y carbohidratos.....	61
Figura 32. Cultivo celular de fibroblastos embrionarios de ratón.....	62
Figura 33. Cultivo celular de mESC.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grados de libertad para moléculas lineales y no lineales.....	22
Tabla 2. Comparación de los modos de muestreo en mcro-FTIR.....	27
Tabla 3. Perfil bioquímico para los grupos de estudio.....	49
Tabla 4. Números de onda analizados en los espectros de los cortes histológicos de riñón.....	56

RESUMEN

La insuficiencia renal aguda (IRA) es un síndrome que se caracteriza por la disminución abrupta (horas a días) de la filtración glomerular, resultando en la incapacidad para la excreción de productos nitrogenados y para mantener la homeostasis de líquidos y electrolitos. Los tratamientos para la IRA consisten en el reemplazo sustitutivo de la función renal, sin embargo, estas técnicas están asociadas a una alta morbilidad y mortalidad y no representan un tratamiento definitivo para esta enfermedad.

Según un estudio realizado por la Secretaría de Salud en el 2010, se destacaba que cada año se sumaban al menos, 40,000 nuevos casos de insuficiencia renal en el país. Por lo tanto, es necesario explorar nuevas alternativas de tratamiento para los pacientes nefrópatas, que permitan incrementar su calidad de vida, reducir las complicaciones y costos del tratamiento. Como nueva opción terapéutica, las terapias regenerativas empleando terapia celular con células madre o troncales, han demostrado que las células madre embrionarias (ESC) son una valiosa fuente celular con actividad regenerativa para la enfermedad renal.

Objetivo. Estudiar los efectos del implante de ESC de ratón (mESC) en un modelo murino con IRA mediante análisis bioquímico, histológico, fenotípico y espectroscópico infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) para evidenciar la efectividad del tratamiento con estas células.

Materiales y Métodos. Se conformaron tres grupos experimentales compuestos por 10 ratones machos de 8-12 semanas: un grupo constituido por ratones sanos,

otro con IRA, y el último con IRA tratados con implante de mESC. La inducción de IRA se realizó con una dosis de 18 mg de cisplatino/kg de peso. Se comprobó el estado de IRA mediante muestras séricas de ácido úrico y creatinina a los 4 y 8 días post-inducción. Se extrajeron ambos riñones de cada ratón a los días 4 y 8 post-inducción para el análisis histológico, fenotípico y espectroscópico mediante tinción H-E, inmunodetección de la proteína p53 y micro-espectroscopia FTIR respectivamente.

Resultados. Los ratones tratados con implante de mESC evidenciaron una disminución de los valores de creatinina y ácido úrico en comparación con los ratones con IRA. El análisis histopatológico permitió observar microestructuras glomerulares y tubulares más conservadas en el grupo tratado con mESC en comparación al grupo con IRA. Así mismo, la inmunocitoquímica para p53 reveló una disminución en la expresión de esta proteína proapoptótica en los ratones tratados con mESC en comparación a los ratones que no recibieron tratamiento. Finalmente, el análisis por micro-espectroscopia FTIR reveló diferencias significativas entre los grupos de ratones sanos, enfermos y tratados con mESC, evidenciando cambios biomoleculares a nivel de lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos.

Conclusiones. El implante de mESC disminuyó los niveles de biomarcadores relacionados con lesión renal. Nuestros resultados revelan la efectividad terapéutica de las ESC en un modelo murino con IRA por nefrotoxicidad, y plantean la posibilidad de desarrollar tratamientos contra enfermedades renales en el campo de la medicina regenerativa.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 El riñón.

1.1.1 Anatomía externa.

Los riñones son órganos pares, de color rojizo y con forma de alubia, situados en los flancos, entre el peritoneo y la pared posterior del abdomen. Como su localización es posterior con respecto al peritoneo de la cavidad abdominal, se consideran órganos retroperitoneales. Los riñones se localizan entre la última vértebra torácica y la tercera vértebra lumbar, donde están protegidos en forma parcial por la undécima y duodécima costilla (Tortora y Derrickson, 2013).

Cada riñón está cubierto por tres capas de tejido. La capa más profunda o cápsula renal, es una lámina lisa y transparente de tejido conectivo denso irregular, que se continúa con la capa externa del uréter. Esta lámina sirve como barrera contra los traumatismos y ayuda a mantener la forma del órgano. La capa intermedia o cápsula adiposa, es una masa de tejido adiposo que rodea la cápsula renal. También protege al riñón de los traumatismos y lo sostiene con firmeza en su sitio, dentro de la cavidad abdominal. La capa superficial o fascia renal es otra capa de tejido conectivo denso irregular que fija el riñón a las estructuras que lo rodean y a la pared abdominal. En la superficie interior de los riñones, la fascia renal es profunda con respecto al peritoneo (Tortora y Derrickson, 2013).

1.1.2 Anatomía interna.

Un corte frontal del riñón muestra dos regiones distintas: un área superficial, de color rojo claro, llamada corteza renal, y una región profunda, de color pardo rojizo, denominada médula renal. La médula renal está compuesta por entre 8 y 18 pirámides renales de forma cónica. La base (extremo más ancho) de cada

pirámide se dirige hacia la corteza renal y su vértice (extremo más angosto), llamada papila renal, se orienta hacia el hilio. La corteza renal es el área de textura lisa que se extiende desde la cápsula hasta las bases de las pirámides renales y hacia los espacios entre ellas. Se divide en una zona cortical externa y una zona yuxtamedular interna. Estas porciones de la corteza renal que se extienden entre las pirámides renales se denominan columnas renales. Un lóbulo renal consta de una pirámide renal, la región suprayacente de la corteza y la mitad de cada columna renal adyacente (Tortora y Derrickson, 2013).

Juntas, la corteza y las pirámides renales de la médula constituyen el parénquima o porción funcional del riñón. Dentro del parénquima se encuentran las unidades funcionales del riñón, alrededor de 1 millón de estructuras microscópicas, las nefronas.

1.1.3 La nefrona.

Las nefronas son las unidades funcionales de los riñones. Cada nefrona consta de dos partes: un corpúsculo renal, donde se filtra el plasma sanguíneo, y un túbulo renal, hacia el que pasa el líquido filtrado. Los dos componentes del corpúsculo renal (red capilar) son el glomérulo y la cápsula glomerular (de Bowman), que es una bolsa epitelial en forma de copa de pared doble, que rodea los capilares glomerulares. El plasma sanguíneo se filtra en la cápsula glomerular y luego el líquido filtrado ingresa en el túbulo renal, que contiene tres sectores principales. En el orden en el que el líquido los recorre, estos sectores son: 1) el túbulo contorneado proximal, 2) el asa de Henle y 3) el túbulo contorneado distal (Tortora y Derrickson, 2013).

El corpúsculo renal y ambos túbulos contorneados se encuentran dentro de la corteza renal, mientras que el asa de Henle se extiende hacia la médula renal, y gira en forma de U y luego regresa a la corteza renal.

Los túbulos contorneados distales de diversas nefronas desembocan en un solo túbulo colector. Los túbulos colectores luego se unen y convergen en varios cientos de conductos papilares grandes, que drenan a su vez en los cálices menores. Los conductos colectores y los capilares se extienden desde la corteza de la médula hacia la pelvis renal, de manera que un riñón tiene alrededor de 1 millón de nefronas, pero un número mucho menor de conductos colectores y aún menor de conductos papilares (Tortora y Derrickson, 2013).

1.2 Histología de la nefrona y el túbulo colector.

La pared de la cápsula glomerular, el túbulo renal y los conductos están compuestos por una capa simple de células epiteliales. Sin embargo, cada parte tiene características histológicas distintivas que reflejan sus funciones específicas:

Cápsula glomerular. La cápsula glomerular o de Bowman está constituida por las capas visceral y parietal. La capa visceral está compuesta por células epiteliales pavimentosas simples modificadas, llamadas podocitos. Las numerosas proyecciones en forma de pie de estas células (pedicelos) rodean la capa simple de células endoteliales de los capilares glomerulares y forman la pared interna de la cápsula. La capa parietal de la cápsula glomerular está formada por epitelio pavimentoso simple y constituye la pared externa de la cápsula. El líquido filtrado a través de los capilares glomerulares entra en el espacio capsular, que se encuentra entre las dos capas de la cápsula glomerular y se considera la luz de la vía urinaria (Tortora y Derrickson, 2013).

Túbulo renal y túbulo colector. En el túbulo contorneado proximal, hay células epiteliales cúbicas simples con un borde en cepillo prominente formado por microvellosidades en su superficie apical. Estas microvellosidades aumentan la superficie para la absorción y la secreción de la misma manera que las del intestino delgado. La rama ascendente del asa de Henle y la primera parte de la rama ascendente (la porción ascendente delgada) están compuestas por epitelio pavimentoso simple. La porción ascendente gruesa del asa de Henle está compuesta por epitelio cúbico simple o cilíndrico bajo (Tortora y Derrickson, 2013). En cada nefrona, la porción final de la rama ascendente del asa de Henle contacta con la arteriola aferente que nutre ese corpúsculo renal. Como las células cilíndricas del túbulo en esa región están muy juntas, se las conoce como mácula densa. A lo largo de la mácula densa, las paredes de la arteriola aferente (y a menudo de la arteriola eferente) contienen fibras musculares lisas modificadas denominadas células yuxtaglomerulares. Junto con la mácula densa, constituyen el aparato yuxtaglomerular, el cual ayuda a regular la tensión arterial dentro de los riñones. El túbulo contorneado distal comienza a una corta distancia, después de atravesar la mácula densa. En la última porción del mismo y dentro de los túbulos colectores, se presentan dos tipos celulares diferentes. La mayoría son células principales, que tienen receptores tanto para la hormona antidiurética como para la aldosterona, las dos hormonas responsables de la regulación de sus funciones. El segundo tipo de célula, que se presenta en menor número, corresponde a las células intercaladas, que participan en la homeostasis del pH sanguíneo. Los túbulos colectores drenan en conductos papilares grandes, revestidos por epitelio cilíndrico simple (Tortora y Derrickson, 2013).

1.3 Generalidades de la fisiología renal.

Para producir orina, las nefronas y los túbulos colectores desarrollan tres procesos básicos: filtración glomerular, reabsorción tubular y secreción tubular (Tortora y Derrickson, 2013).

Filtración glomerular. Es el primer paso en la producción de orina. El agua y la mayor parte de los solutos del plasma atraviesan la pared de los capilares glomerulares, donde se filtran e ingresan en la cápsula de Bowman y luego, en el túbulo renal

Reabsorción tubular. A medida que el líquido filtrado fluye a lo largo de los túbulos renales y los túbulos colectores, las células tubulares reabsorben cerca del 99% del agua filtrada y diversos solutos útiles. El agua y los solutos regresan a la sangre mientras esta fluye a través de los capilares peritubulares y los vasos rectos.

Secreción tubular. A medida que el líquido filtrado fluye a lo largo de los túbulos renales y túbulos colectores, las células tubulares secretan otras sustancias como desechos, fármacos y compuestos iónicos presentes en concentraciones excesivas, hacia el líquido filtrado. Se advierte que la secreción tubular elimina sustancias de la sangre.

El mal funcionamiento en las estructuras funcionales del riñón puede ser a causa del daño que puedan sufrir por factores de distinta índole, y esto a su vez puede conllevar al desarrollo de distintas enfermedades (Tortora y Derrickson, 2013).

1.4 La insuficiencia renal aguda.

La insuficiencia renal aguda (IRA) es un síndrome que se caracteriza por la disminución abrupta (horas a días) de la filtración glomerular, que resulta en la incapacidad del riñón para excretar productos nitrogenados y para mantener la homeostasis de líquidos y electrolitos. Esta alteración en la función renal ocurre con lesión renal en los túbulos, vasos, intersticio y glomérulos (Díaz de León y Briones, 2013).

Según el informe de egresos hospitalarios del Sistema Nacional de Salud del 2002, la IRA es una de las principales causas de atención hospitalaria, ocupa el cuarto lugar en hombres con 55,033 casos y el décimo en mujeres con 50,924 casos, lo que representa una tasa de 115.0 y 101.5 por 100,000 habitantes en hombres y mujeres respectivamente. La mortalidad hospitalaria en población masculina representa el décimo lugar con 1,972 casos y una tasa de 155.8 por 100,000 habitantes, mientras que en mujeres ocupa el octavo lugar con 1,743 defunciones, una tasa de 62.5 por 100,000 habitantes (Díaz de León y Briones, 2013). Así mismo, en el estudio “Epidemiología de la Insuficiencia Renal en México”, dado a conocer por la Secretaría de Salud en el 2010, se destacaba que cada año se sumaban, al menos, 40,000 nuevos casos de Insuficiencia Renal en el país. Y debido a una falta de prevención, este padecimiento ha tenido un rápido crecimiento en los últimos años (11% anual) (Méndez, 2010).

La IRA puede ser debida a disminución de la perfusión renal sin daño celular, por isquemia, nefrotoxicidad, obstrucción renal tubular, alteraciones tubulointersticiales o glomerulares. Las causas de la IRA se dividen en tres grandes grupos: pre-renales, renales o intrínsecas y pos-renales (Díaz de León y Briones, 2013).

La IRA intrínseca se asocia con lesión en el parénquima renal, generalmente como resultado de lesión en un sitio primario (túbulos, intersticio, vasos o glomérulo). Desde el punto de vista clínico-patológico las causas de IRA intrínseca pueden dividirse en: 1) enfermedades de los grandes vasos renales, 2) enfermedades de la microcirculación renal y glomérulos, 3) IRA isquémica y nefrotóxica y 4) enfermedades tubulointersticiales (Díaz de León y Briones 2013).

La mayoría de los casos se deben a isquemia o a nefrotoxicidad, ambos mecanismos culminan en la necrosis tubular aguda (NTA), la cual es una entidad anatomoclínica que se caracteriza morfológicamente por destrucción de las células del epitelio tubular y clínicamente por la pérdida de la función renal. La NTA originada por isquemia o por nefrotoxicidad comparte fenómenos fisiopatológicos esenciales como la lesión tubular, así como trastornos graves y duraderos del riego sanguíneo (Díaz de León y Briones, 2013).

La NTA nefrotóxica tiene una incidencia elevada en pacientes de la tercera edad y en aquellos con insuficiencia renal crónica preexistente. Los agentes nefrotóxicos pueden dividirse en exógenos o endógenos. Las sustancias exógenas son generalmente fármacos o agentes de radiocontraste; fármacos como aciclovir, aminoglucósidos, anfotericina B, pentamida, isofosfamida, carboplatino y cisplatino inducen NTA provocando daño túbulo-epitelial directo y obstrucción intratubular (Díaz de León y Briones, 2013).

1.4.1 Tratamientos para la Insuficiencia Renal.

El primer eslabón en el tratamiento de la IRA es actuar sobre la causa. En la IRA renal por nefrotoxicidad se han ensayado, con mayor o menor éxito en animales, un sinnúmero de tratamientos que en el ser humano no han resultado ventajosos:

antagonistas de la endotelina, péptido natriurético atrial, dopamina, calcio-antagonistas, diuréticos del asa, anticuerpos, etc. Hoy en día, la terapéutica vigente implica el uso de Técnicas Continuas de Reemplazo Renal (TCRR) que están claramente indicadas para: el manejo de los líquidos (oliguria/anuria, necesidad de aporte elevado -nutrición- u otras situaciones de sobrecarga hidrosalina o edema de pulmón); la corrección de problemas electrolíticos y de pH (hiperpotasemia: $[K] > 6,5$ mEq/L; alteraciones del sodio; acidosis metabólica severa: $pH < 7,2$); y/o el tratamiento de alteraciones clínicas secundarias a la uremia (miopatía, encefalopatía o pericarditis) (Gaínza, 2012).

Las TCRR están consideradas como un importante avance tecnológico para tratar a los pacientes que presentan IRA, permitiendo una mayor calidad depurativa y un mejor control de las complicaciones, así como, un aumento en la seguridad física del paciente. Las TCRR se definen como una terapia extracorpórea de purificación de la sangre en un intento de sustituir la función renal durante un periodo de tiempo determinado y de manera continuada durante las 24 horas del día (García *et al.*, 2005).

Entre las técnicas contempladas en este rubro se encuentra la diálisis peritoneal y la hemodiálisis intermitente. Esta última es una terapia extracorpórea, principalmente difusiva, donde el agua y el soluto son transportados hacia el líquido de diálisis a través de una membrana semipermeable. El líquido de diálisis es una solución de composición variable que se utiliza para facilitar la difusión de solutos dentro del compartimiento no sanguíneo del hemofiltro, donde la sangre y el dializante fluyen a contracorriente (García *et al.*, 2005). Mientras que en la diálisis peritoneal se utiliza una membrana peritoneal.

A pesar de que dichas técnicas representan el principal tratamiento contra la insuficiencia renal, están asociadas a una alta morbilidad y mortalidad (Bruce *et al.*, 2007). Así mismo, como alternativa de tratamiento se encuentra el trasplante renal, que, según la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, lo definió en el 2001 como la transferencia de un órgano, tejido o células de una parte del cuerpo a otra, o de un individuo a otro y que integren al organismo; este trasplante puede ser de donadores vivos o de cadáver, sin embargo, se encuentra limitado al número de donadores disponibles y al rechazo por parte del sistema inmunológico del receptor.

Por lo tanto, es necesario explorar nuevas alternativas de tratamiento para los pacientes renales, que permitan incrementar su calidad de vida, reducir las complicaciones y costos del tratamiento, y así mismo, asegurar la regeneración del tejido y la función renal.

1.5 Medicina regenerativa.

Conceptualmente, aunque el término “medicina regenerativa” incluye la creación artificial de órganos y su posterior implante, en su definición más realista hace referencia al conjunto de procesos destinados a reparar o reemplazar un tejido o la función de un órgano mediante la estimulación e inducción de su propia autorregeneración. Esquemáticamente, esta disciplina engloba 2 estrategias terapéuticas: las fundamentadas en el uso de células vivas o terapias celulares y las basadas en la ingeniería tisular utilizando diferentes andamiajes con matrices y materiales biocompatibles que solos o en combinación dan soporte y facilitan la reparación del daño tisular. Entre las terapias celulares pueden diferenciarse 2

tipos de productos: los basados en células maduras, injertos o implantes y los que utilizan células madre o progenitoras (Lamas, 2014).

1.5.1 Terapia celular con células madre.

Como una nueva opción terapéutica, las terapias regenerativas para el riñón han sido ampliamente investigadas desde el aspecto de la biología de células madre (*stem cells*, SC), biología del desarrollo e ingeniería de tejidos (Maeshima *et al.*, 2014).

Las SC embrionarias o adultas, por definición se caracterizan por su auto renovación y potencialidad, peculiaridades que les permiten dar lugar a más SC y diferenciarse en varios linajes celulares en condiciones apropiadas. Según su potencialidad, las células madre embrionarias (*embryonic stem cells* ESC) se clasifican como totipotentes y pluripotentes, las cuales pueden diferenciarse en las tres líneas germinales. Las células madre no embrionarias o adultas se consideran multipotentes y unipotentes, y su potencial de diferenciación está restringido (Mata *et al.*, 2017).

Las ESC se obtienen a partir de la masa celular temprana llamada blastocisto, y se caracterizan por su capacidad de mantener sus propiedades proliferativas en un estado indiferenciado por un periodo de cultivo prolongado y diferenciar en diferentes tipos de células somáticas (Sykova *et al.*, 2013).

Entre las características principales de las ESC se encuentran la de diferenciar selectivamente en otros tipos celulares, dependiendo esto en parte de factores de diferenciación y crecimiento que imitan el entorno de un linaje celular particular (Kim *et al.*, 2005); la baja inmunogenicidad, que ofrece la posibilidad de evitar complicaciones al utilizarlas cuando son reintroducidas como agente terapéutico,

debido a la ausencia de células presentadoras de antígenos dentro de los metanefros antes de una determinada etapa del desarrollo, niveles reducidos de expresión de los principales antígenos de histocompatibilidad clase I y II y niveles bajos de expresión de citocinas, quimiocinas y moléculas efectoras citolíticas propias del tejido en estado adulto, así como su capacidad de auto renovación ilimitada, debida a su alta actividad telomerasa (Bruce *et al.*, 2007).

Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos que impulsan el crecimiento y la diferenciación de los progenitores renales representa el paso clave para explotar su potencial con fines terapéuticos.

1.6 Generalidades sobre el Cisplatino.

El cis-diaminodicloroplatino (II) (o cisplatino (CDDP)) es un fármaco antineoplásico usado en el tratamiento de muchos tipos de cáncer en órganos sólidos, incluyendo la cabeza, cuello, pulmón, testículo, ovario y mama (Miller *et al.*, 2010).

Estudios clínicos han demostrado que aproximadamente un tercio de los pacientes que usan este antineoplásico, sufren lesiones renales días después del tratamiento con CDDP, con una reducción en la tasa de filtración glomerular, aumento del nitrógeno ureico y creatinina en sangre, así como desequilibrio electrolítico (Jiang y Dong, 2008).

Por otro lado, estudios en los últimos años han identificado dos diferentes transportadores de membrana capaces de transportar al CDDP al interior de las células: Ctr1 (*copper transporter 1*) y OCT2 (*organic cation transporter 2*) (Fig. 2). Ctr1 es un transportador de cobre que también es capaz de mediar la captación de CDDP en células de mamíferos. Ctr1 se expresa altamente en el riñón adulto y la

proteína se localiza en la membrana basolateral del túbulo proximal (Miller *et al.* 2010). Por otro lado, es interesante observar que se pueden encontrar altos niveles de expresión de OCT2 en el segmento S3 de los túbulos proximales, donde precisamente se localiza el efecto nefrotóxico del CDDP (Ludwig *et al.*, 2004).

Estudios en ratas y ratones indican que el CDDP experimenta una activación metabólica en el riñón a una toxina más potente. Este proceso comienza con la formación de conjugados de glutatión en la circulación, tal vez mediada por GST (*glutathione-S-transferase*). Esto da pie a la formación de una potente toxina, según indican los estudios realizados en ratas y ratones. A medida que los conjugados de glutatión pasan a través del riñón, se escinden por la GGT (*gamma glutamyl transpeptidase*) expresada en la superficie de las células del túbulo proximal, para formar conjugados de cisteinil-glicina. Los conjugados de cisteinil-glicina son metabolizados por aminodipeptidasas que se expresan en la superficie de las células del túbulo proximal, para formar conjugados de cisteína (Miller *et al.*, 2010). Aunque las toxicidades por CDDP incluyen ototoxicidad, gastrotoxicidad, mielosupresión y reacciones alérgicas, la nefrotoxicidad, es el principal efecto limitante en la dosis de este antineoplásico.

1.6.1 Mecanismos de Nefrotoxicidad del CDDP.

Uno de los objetivos celulares del CDDP es el DNA nuclear. En un medio acuoso, los ligandos cloruro de CDDP se reemplazan por moléculas de agua generando un electrófilo cargado positivamente. En su forma acuosa, el CDDP pasa a formar $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ y $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ una vez dentro de la célula. La baja

concentración celular de iones cloruro facilita este proceso. El átomo de platino del CDDP forma enlaces covalentes con las posiciones N7 de las bases de purina para formar enlaces cruzados intracatenarios principalmente 1,2 o 1,3 (Fig. 1) y un número menor de enlaces cruzados intercatenarios deteniendo así la síntesis y la replicación del DNA en células que proliferan rápidamente (Wang *et al.*, 2005).

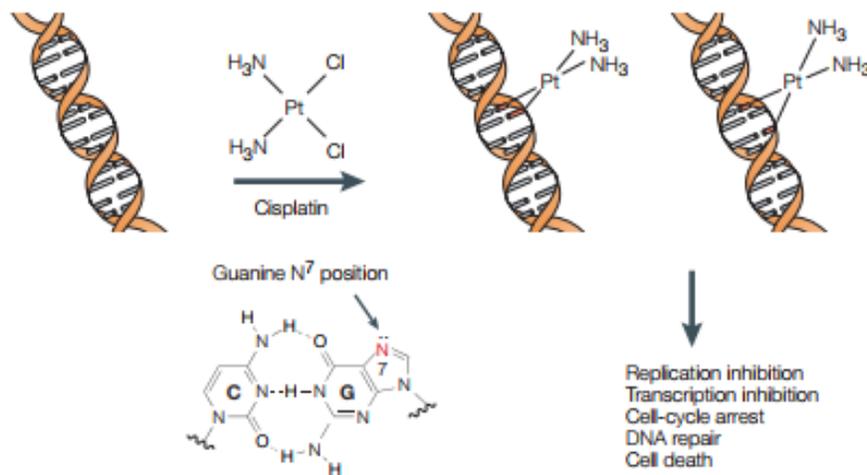


Figura 1. Formación de aductos de CDDP.

Tomada de Wang *et al.*, 2005.

Sin embargo, se sugiere que el DNA mitocondrial u otros objetivos mitocondriales, son quizás más importantes que el daño del DNA nuclear en la muerte celular inducida por CDDP. Para generar tales efectos a nivel mitocondrial, el CDDP se hidroliza para generar un metabolito cargado positivamente que se acumula preferentemente dentro de las mitocondrias cargadas negativamente. Por lo tanto, la sensibilidad de las células al CDDP parece estar en correlación con la densidad mitocondrial y el potencial de la membrana mitocondrial. Esta observación puede explicar la particular sensibilidad del túbulo proximal renal a la toxicidad del CDDP,

ya que este segmento presenta una de las más altas densidades de mitocondrias en el riñón (Miller *et al.*, 2010).

1.7 El papel de p53 en la Nefrotoxicidad Inducida por CDDP.

Como se había mencionado anteriormente, uno de los objetivos celulares del CDDP es el DNA nuclear, y es la interacción de este antineoplásico con el material genético, lo que hace que sus mecanismos por los cuales induce nefrotoxicidad sean tan complejos e impliquen múltiples moléculas y vías de señalización (Fig. 2).

Entre las moléculas de interés, p53 ha ganado atención en los últimos años como un mediador importante de la muerte celular inducida por CDDP. El gen supresor de tumores p53 induce la detención del ciclo celular o la apoptosis en respuesta al daño al DNA, activación de oncogenes e hipoxia (Miller *et al.*, 2010).

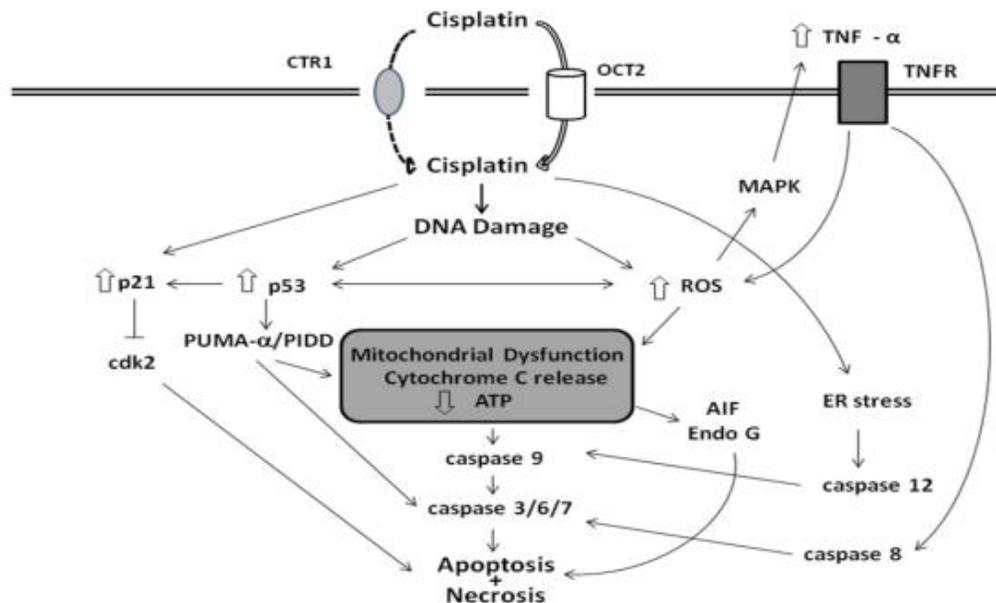


Figura 2. Vías de señalización de muerte celular inducida por CDDP. El CDDP entra en las células epiteliales renales a través de los transportadores OCT2 y, en menor medida, Ctr1. El CDDP causa daño al DNA nuclear y mitocondrial y producción de especies de reactivas de oxígeno (ROS) que conducen a la activación tanto de las vías mitocondriales como no mitocondriales de apoptosis y necrosis.

Tomada de: Miller *et al.*, 2010.

1.7.1 Evidencia de la participación de p53 en la Nefrotoxicidad Inducida por CDDP.

En un estudio realizado por Cummings y Schnellmann en 2002, se demostró por inmunofluorescencia, el aumento en la expresión nuclear de p53 en células del túbulo proximal de conejo, 4 h después del tratamiento con CDDP.

Otro estudio que confirma la participación de p53 en la nefrotoxicidad del CDDP utilizando modelos *in vitro* es el publicado por Jiang y cols. en el 2004. Ellos emplearon cultivos de células tubulares proximales de rata, donde quedó demostrado que p53 se fosforila rápidamente y se regula positivamente después del tratamiento con CDDP, antes del inicio de la apoptosis celular. La activación de p53 no fue inhibida ni por carbobenzoxi-Val-Ala-Asp-fluorometilcetona, ni por Bcl-2, aunque ambos suprimieron la apoptosis celular inducida por CDDP, indicando que la activación de p53 no era consecuencia de la muerte celular. La pifitrina α , por otro lado, bloqueó la activación de p53 y, a su vez, atenuó la activación de caspasas y la apoptosis. Los resultados sugirieron que la activación de p53 puede ser una señal temprana para la apoptosis de células tubulares renales inducida por CDDP. Así mismo, la apoptosis inducida por CDDP fue inhibida en un ratón con una mutación puntual en el sitio de unión al DNA para p53, demostrando que los efectos proapoptóticos de p53 en respuesta al CDDP dependen en gran medida de su actividad transcripcional hacia genes diana.

Tres años después, un estudio realizado por Wei y cols. en ratones C57BL/6, demostró por inmunoanálisis, un aumento de la proteína p53 en muestras de corteza y médula renal después del tratamiento con CDDP. El aumento comenzó

a partir del día 2 y se intensificó al día 3. Paralelamente a la acumulación de p53, había fosforilación de p53 que fue acompañada por el desarrollo de lesión renal aguda. Este análisis por inmunofluorescencia evidenció la acumulación de p53 y su fosforilación principalmente en el núcleo de la célula cortical renal. En este mismo estudio, se demostró también que la nefrotoxicidad inducida por CDDP disminuyó considerablemente en ratones deficientes para el gen de p53; comparando con animales de la cepa salvaje, los ratones deficientes en p53 mostraron una mejor función renal, menos daño tisular y menos células apoptóticas.

Es por tanto de gran importancia repasar las moléculas por las cuales p53 desencadena sus efectos apoptóticos, y particularmente, los estudios que han demostrado dichos efectos en la nefrotoxicidad provocada por CDDP.

1.7.2 Regulación Transcripcional de p53 en la Nefrotoxicidad Inducida por CDDP.

Es bien sabido que existen diversos genes que contienen promotores con sitios de unión a p53, estos genes bien pueden sufrir una activación transcripcional, o en caso contrario, ser reprimidos. En estos genes se encuentran algunos con actividad apoptótica a través de diversas vías de señalización, y se ha demostrado que varios de estos son regulados por p53 durante la nefrotoxicidad inducida por CDDP (Fig. 3). A continuación, se dan algunas generalidades de los genes por los cuales p53 es capaz de inducir la muerte celular por apoptosis.

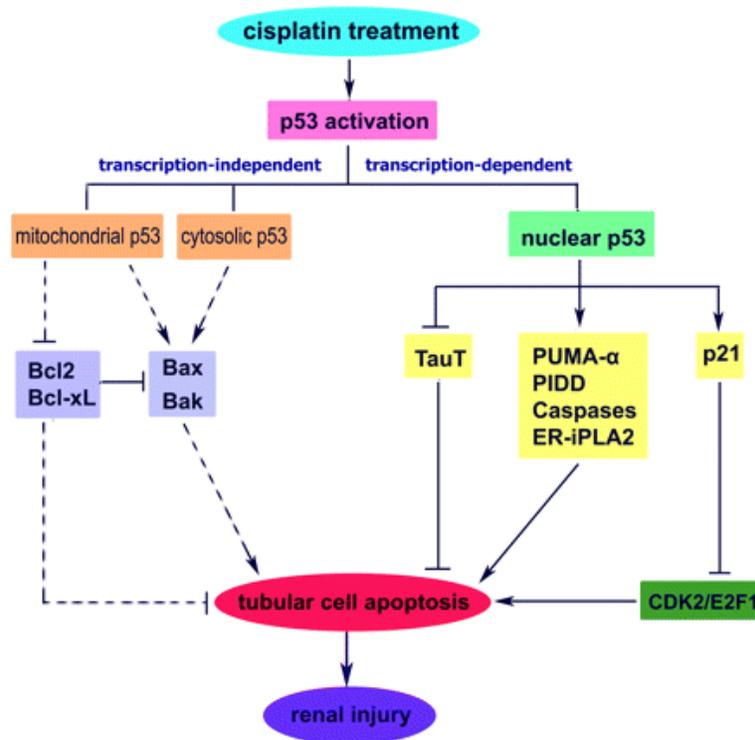


Figura 3. Vías de señalización de p53 que conducen a la apoptosis en células tubulares durante la nefrotoxicidad por CDDP. Al activarse p53 en respuesta al tratamiento con CDDP, se da a su vez una activación transcripcional de genes proapoptóticos donde destacan PUMA- α , PIDD, caspases y ER-iPLA2; de la misma forma se reprimen genes antiapoptóticos, tales como p21 y el transportador de taurina (TauT). Además, se sabe que p53 también puede inducir la apoptosis mediante mecanismos independientes de la transcripción a través de interacciones con proteínas de la familia Bcl-2 en mitocondrias y / o el citosol. Líneas sólidas, apoyadas por datos experimentales; líneas discontinuas, para ser probado.

Tomada de: Jiang y Dong, 2008.

1.8 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).

1.8.1 La teoría sobre la espectroscopía infrarroja.

Infrarrojo (IR) se refiere a la parte del espectro electromagnético entre la región visible y las microondas. El espectro electromagnético se refiere a los tipos aparentemente diversos de la energía radiante (Fig. 4), cada uno de los cuales puede ser considerado como una onda o partícula que se desplaza a la velocidad de la luz (Infrared Spectroscopy: Theory, 2002).

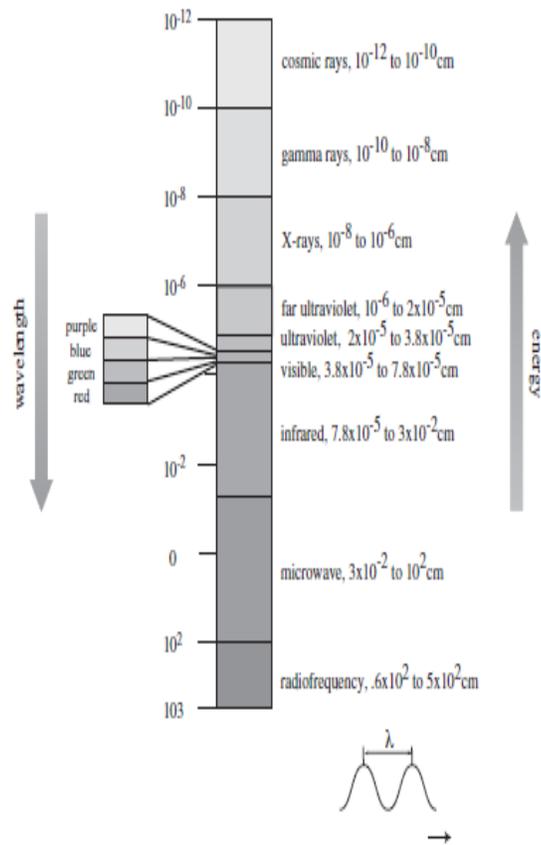


Figura 4. El espectro electromagnético.

Se puede observar que la luz infrarroja se sitúa entre la longitud de onda de 7.8×10^{-5} cm y 3×10^{-2} cm.

Tomada de: Infrared Spectroscopy: Theory, 2002

Para entender la espectroscopía IR, es necesario tener claros algunos conceptos: el número de ondas que a una velocidad constante pasan por un determinado punto cada segundo se le llama frecuencia (ν). Mientras menor sea la longitud de onda (λ), más ondas pasarán cada segundo, siendo por lo tanto mayor la frecuencia, y cuando λ es mayor, menos ondas pasarán y por tanto la frecuencia será menor, por lo que, a la velocidad de la luz (c), la frecuencia será inversamente proporcional a λ . De tal forma, se tiene que:

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

donde la velocidad de la luz es igual a 3×10^{10} cm/seg

La frecuencia (ν) se mide en Hz, donde 1 Hz = 1 ciclo/seg, mientras que la longitud de onda a menudo se mide en cm (centímetros).

Las radiaciones de mayor frecuencia tendrán también mayor energía, ya que la energía (E) es igual a la frecuencia multiplicada por la constante de Planck (h). La energía será, por lo tanto, $E = h\nu$. De tal manera se tiene que:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

donde la constante de Planck es $h = 6.626 \times 10^{-34}$ (Joules)(segundo)

Obsérvese que la energía es directamente proporcional a la frecuencia e inversamente proporcional a longitud de onda.

La región IR se divide en tres regiones: la IR cercana, media y distante (Fig. 5). La región IR media es de mayor utilidad práctica para el químico orgánico (Infrared Spectroscopy: Theory, 2002).

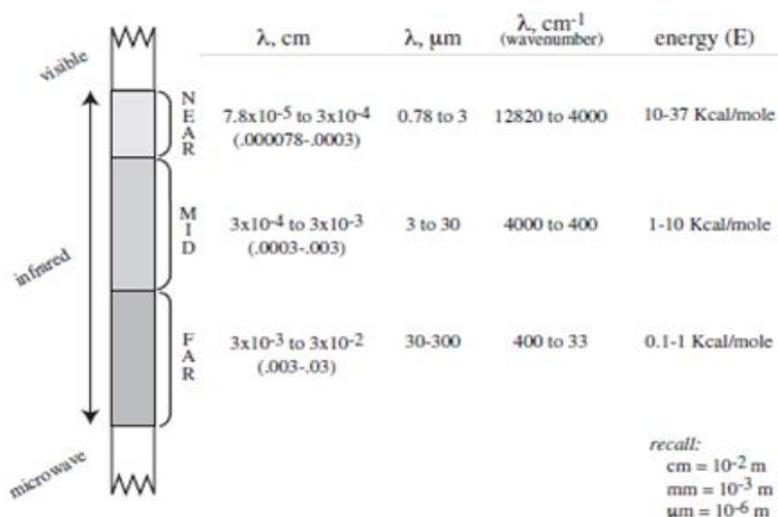


Figura 5. Regiones del infrarrojo en el espectro electromagnético. La región media del infrarrojo es la que se localiza entre las longitudes de onda entre 3×10^{-4} cm y 3×10^{-3} cm

Tomada de: Infrared Spectroscopy: Theory, 2002

Los espectros IR son regularmente reportados en número de onda, y el número de onda es el inverso de la longitud de onda en centímetros:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda}$$

Por lo tanto:

$$E = hc \bar{\nu}$$

En números de onda, el rango medio de IR es de $4000 - 400\text{cm}^{-1}$. Un aumento en el número de onda corresponde a un aumento de la energía.

Para realizar mediciones en espectrómetros de luz IR, esta tiene que ser absorbida por moléculas orgánicas y convertida en energía de vibraciones moleculares. Cuando la energía radiante coincide con la energía de una vibración molecular específica, se produce la absorción. El número de onda, trazado en el eje X, es proporcional a la energía; por lo tanto, las vibraciones de energía más altas están a la izquierda. El porcentaje de transmitancia (% T) se representa en el eje Y. La absorción de la energía radiante está representada por una "depresión" en la curva: cero de transmitancia corresponde al 100% de absorción de luz a esa longitud de onda (Steele, 2017).

$$\text{Absorbancia} = -\log_{10} \left(\frac{I}{I_0} \right)$$

donde I_0 = intensidad de radiación de referencia,
I = intensidad de radiación de la muestra.

Las intensidades de banda también se pueden expresar como absorbancia (A), y la absorbancia es el logaritmo, de base 10, del recíproco de la transmitancia:

$$A = -\log_{10} \left(\frac{1}{T} \right)$$

Como se ilustra en el espectro del octano (Fig. 6), incluso las moléculas orgánicas simples pueden arrojar complejos espectros infrarrojos. Tanto como la complejidad y el número de onda de los picos en el espectro aportan información acerca de la molécula en estudio (Infrared Spectroscopy: Theory, 2002).

Los números de onda (o frecuencias) a los que cada molécula orgánica absorbe radiación, dan información de los grupos funcionales presentes en la molécula. Ciertos grupos de átomos absorben energía, y por lo tanto, dan lugar a bandas en frecuencias similares. Existen tablas que correlacionan las frecuencias con los grupos funcionales.

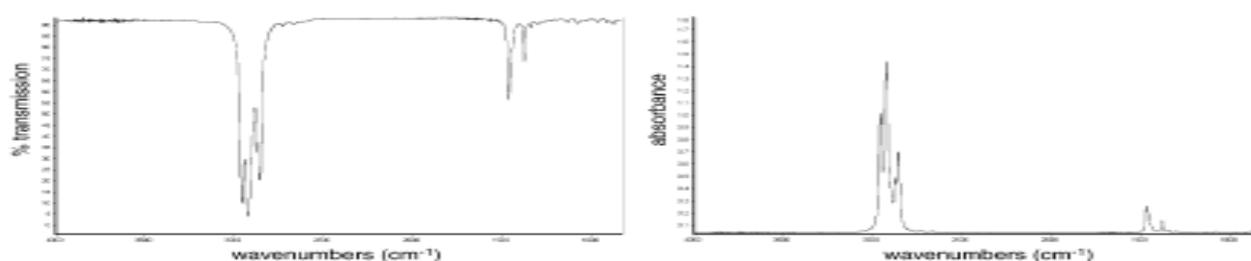


Figura 6. El espectro infrarrojo del octano, observado en transmitancia y absorbancia.
Nótese que aparece el mismo espectro tanto en absorbancia (derecha) como en transmitancia (izquierda).
Tomada de: *Infrared Spectroscopy: Theory, 2002.*

Por otro lado, existen dos tipos de vibraciones moleculares: de tensión o estiramiento, que pueden ser simétricas o asimétricas, y de flexión, que pueden ser tijereteo, de balanceo, de aleteo o de torsión. Una molécula que consta de n átomos tiene un total de $3n$ grados de libertad, que corresponden a las coordenadas cartesianas de cada átomo en la molécula. En una molécula no lineal, 3 de estos grados son rotacionales y 3 son traslacionales y los restantes corresponden a vibraciones fundamentales; en una molécula lineal, 2 grados son

rotacionales y 3 son traslacionales (Infrared Spectroscopy: Theory, 2002). El número neto de vibraciones fundamentales para moléculas no lineales y lineales es, por lo tanto:

Tabla 1. Grados de libertad para moléculas lineales y no lineales.
Tomada de: Infrared Spectroscopy: Theory, 2002

<i>molecule</i>	<i>degrees of freedom</i>
nonlinear	$3n - 6$
linear	$3n - 5$

El cálculo revela que una molécula simple como propano (C₃H₈), tiene 27 vibraciones, y por lo tanto, se pueden predecir 27 bandas en un espectro infrarrojo (Infrared Spectroscopy: Theory, 2002).

Las vibraciones moleculares del grupo -CH₂, y sus correspondientes frecuencias se ilustran en la siguiente figura:

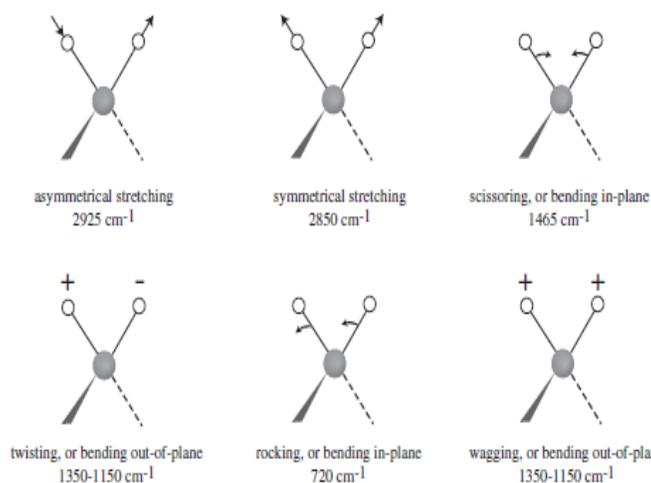


Figura 7. Vibraciones moleculares de flexión y estiramiento del grupo -CH₂.
Tomada de: Infrared Spectroscopy: Theory, 2002

En cuanto a las vibraciones de estiramiento, existe una ley llamada la Ley de Hooke, la cual permite aproximar la frecuencia de estiramiento de un enlace. En

esta aproximación, dos átomos y el enlace de conexión se tratan como un oscilador compuesto de dos masas (átomos) unidas por un resorte. Según la ley de Hooke, la frecuencia de la vibración del resorte está relacionada con la masa y la constante de fuerza del resorte (κ) mediante la siguiente fórmula:

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{\kappa}{m}}$$

donde: κ = la constante de la fuerza, m = masa, v = frecuencia de la vibración

En el oscilador armónico clásico (Fig. 8), $E = \frac{1}{2}\kappa x^2 = hv$ x es el desplazamiento del enlace. Por lo tanto, la energía o la frecuencia dependen de hasta qué punto se estira o comprime el enlace, que puede ser cualquier valor. Si este modelo simple fuera cierto, cualquier molécula podría absorber energía de cualquier longitud de onda (Infrared Spectroscopy: Theory, 2002).

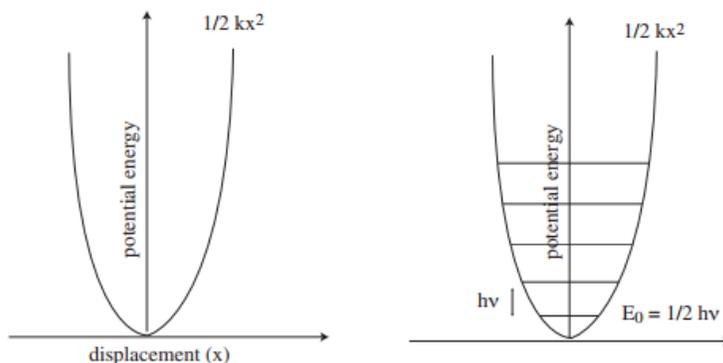


Figura 8. Curva de energía para un enlace vibrante (izquierda) y energía limitada al modelo mecánico cuántico (derecha).

Tomada de: *Infrared Spectroscopy: Theory, 2002*

Sin embargo, el movimiento vibratorio está cuantizado y debe seguir las reglas de la mecánica cuántica, por lo que la única fórmula que encaja con las transiciones en los niveles de energía es la siguiente:

$$E = \left(n + \frac{1}{2}\right) h\nu$$

donde ν = frecuencia de la vibración, n = número cuántico (0, 1, 2, 3, ...)

El nivel de energía más bajo es $E_0 = 1/2 h\nu$, el siguiente más alto es $E_1 = 3/2 h\nu$. De acuerdo con la regla de selección, sólo se permiten transiciones al siguiente nivel de energía; por lo tanto, las moléculas absorberán una cantidad de energía igual a $3/2 - 1/2 h\nu$ o $h\nu$. Esta regla no es inflexible, y ocasionalmente se observan transiciones de $2h\nu$, $3h\nu$ o superiores. Éstas corresponden a bandas denominadas armónicas en un espectro IR. Son de menor intensidad que las bandas de vibración fundamentales (Steele, 2017).

1.8.2. Espectroscopía infrarroja aplicada al análisis de muestras de interés biológico.

El uso del FTIR para el análisis de muestras biológicas permite el estudio no invasivo de la composición bioquímica y funcionalidad celular de la muestra, con una orientación diagnóstica.

Aunque no es estrictamente una técnica microscópica, en sentido convencional el FTIR permite la construcción de imágenes del tejido o la arquitectura celular por el paso de datos espectrales a través de una variedad de algoritmos computacionales. Dado que estas imágenes se construyen a partir de espectros de *fingerprints*, la finalidad de su uso es obtener información sobre el estado de salud subyacente de la muestra analizada (Baker *et al.*, 2014).

Como se mencionaba anteriormente, las distintas formas de vibración molecular son cuantitativamente medibles por espectroscopía IR, donde los enlaces moleculares con un momento dipolar eléctrico que puede cambiar por desplazamiento atómico debido a vibraciones naturales son IR activos. Para estudiar materiales biológicos, la región más importante es la región de huella biológica o *fingerprint* (600-1,450 cm^{-1}) así como la región de amida I y amida II (amida I / II) (1,500-1,700 cm^{-1}). La región de mayor número de onda (2,550-3,500 cm^{-1}) está asociada con vibraciones de estiramiento tales como S-H, C-H, N-H y O-H, mientras que las regiones de menor número de onda corresponden típicamente a vibraciones de flexión y *fingerprint* de carbono. Juntas, estas regiones comprenden una huella bioquímica de la estructura y función de especímenes celulares estudiados (Baker *et al.*, 2014). En la figura 9 se muestra un ejemplo de espectro IR de muestra biológica.

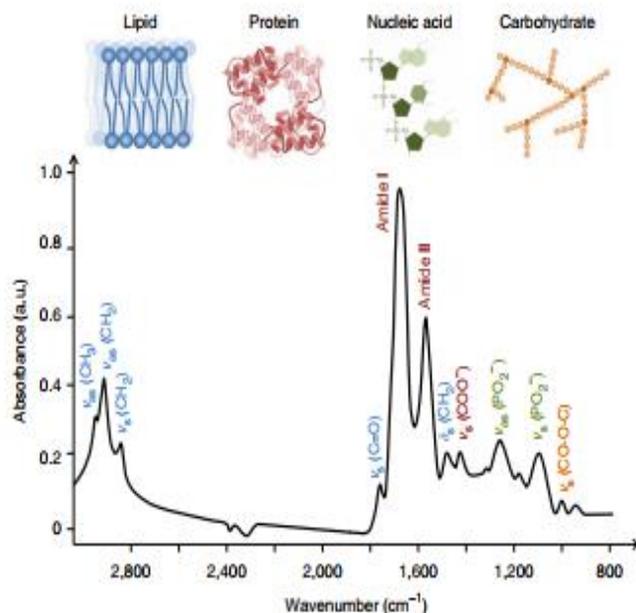


Figura 9. Espectro biológico típico que muestra las regiones de los principales compuestos biológicos (3,000-800 cm^{-1}) El espectro corresponde a una muestra de carcinoma de mama humano (carcinoma ductal in situ). La muestra fue crioseccionada (8 μm de espesor) y montada en laminnillas de BaF2 (1 mm de espesor) antes de la micro-espectroscopia IR. Equipo: Bruker IR scope II, diámetro circular de la abertura $\sim 60 \mu\text{m}$; a.u., unidades arbitrarias

**ν = vibraciones de estiramiento, δ = vibraciones de flexión,
S = vibraciones simétricas y as = vibraciones asimétricas.**

Tomada de: Baker *et al.*, 2014.

Los tres tipos de muestreos espectroscópicos IR más importantes (Fig. 10) son la transmisión, la reflectancia y la ATR (*attenuated total reflection*). En el modo de reflectancia, la muestra se coloca en una superficie reflectora para IR y las mediciones son generadas por un haz que pasa a través de la muestra y refleja desde el sustrato (es decir, el material de la superficie reflectante) a través de la muestra (Baker *et al.*, 2014). En el modo de transmisión, el haz atraviesa la muestra y el sustrato, mientras que en ATR, se utiliza un cristal que cuenta con un alto índice de refracción llamado IRE (*Internal Reflection Element*) y actúa como transmisor del haz infrarrojo, este último cuando penetra en el cristal crea una reflexión total interna, dando lugar a una onda evanescente sobre la superficie del

crystal. La muestra que está encima del cristal recibe esta onda evanescente y se realiza la medición.

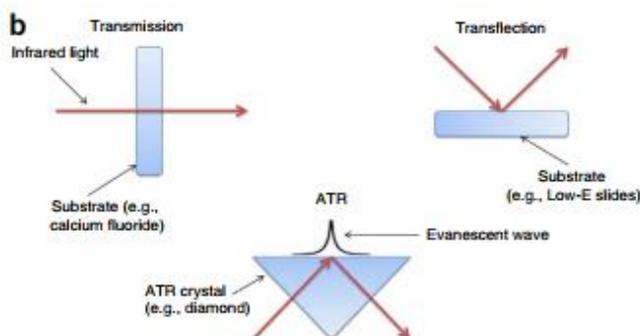


Figura 10. Los tres principales modos de muestreo por micro-espectroscopía IR. Tomada de Baker, et al., 2014.

Cada modo ofrece comodidad para algunas muestras y desafíos para otras, así como ventajas y desventajas que pueden apreciarse en la siguiente tabla:

Tabla 2. Comparación de los modos de muestreo en micro-FTIR. Adaptada de (Baker, et al. 2014).

Modo de muestreo	Tipo de muestra	Ventajas	Desventajas
ATR	Tejidos, células y muestras líquidas.	SNR (<i>signal to noise ratio</i>) alta. Dispersión reducida. Área de análisis recomendable para muestras acuosas con un sustrato apropiado. Mayor resolución espacial.	Puede destruir la muestra debido a la presión que aplica. El aire entre la muestra y el IRE puede afectar los espectros. Se requiere un grosor mínimo para la muestra (~ 2,3 μm) Interacciones de la muestra y el IRE puede conducir a alteraciones por ejemplo, en la estructura proteica.
Transmisión	Tejidos, células individuales, componentes celulares y muestras líquidas.	Alta resolución espacial. No destruye la muestra preparada. Permite la adquisición de espectros en partes específicas de la muestra.	SNR más baja que ATR. El grosor de la muestra debe ser dos veces mayor que para la transflectión para lograr la misma absorbancia. Se requiere una mayor preparación de la muestra y del aparato.
Reflectancia	Tejidos, células individuales, componentes	Alta resolución espacial. No destruye la muestra preparada. Permite la adquisición de	Puede dar lugar a ondas estacionarias SNR más bajo que ATR. Se requiere una mayor preparación

	celulares y muestras líquidas.	espectros en partes específicas de la muestra.	de la muestra y del aparato. El grosor aproximado de la muestra 1-4 mm.
--	--------------------------------	--	---

Los tipos de muestras que pueden ser analizadas abarcan desde células vivas en suspensión, fijadas con formol o muestras de tejidos embebidos en parafina.

Entre los estudios que se han realizado con Espectroscopía FTIR se encuentran: Caracterizar el proceso de diferenciación de células madre pluripotentes a células pancreáticas diferenciadas (Vázquez *et al.*, 2016), estudio de tumores benignos y malignos en cáncer de próstata (Gazi *et al.*, (2010), y análisis de proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos para caracterizar la jerarquía celular de intestinos humanos (Walsh *et al.*, 2009). Los alcances de esta técnica son sumamente prometedores, y ofrece la facilidad de obtener resultados en muy poco tiempo.

Así mismo, el análisis por espectroscopía infrarroja permite también el estudio de biofluidos tales como orina, saliva, suero o sangre entera; debido a que las muestras líquidas no requieren de preparación alguna para ser analizadas por FTIR, es recomendable su uso en el entorno clínico ya que estas regularmente se obtienen de forma rápida y no invasiva. Un posterior análisis por métodos computacionales de dichos biofluidos, permite la clasificación de diferentes compuestos presentes en dichas muestras y la posible identificación de biomarcadores de interés (Gajjar *et al.*, 2013). Esta técnica ya se emplea en distintas áreas de la ciencia tales como toxicología ambiental (Llabjani *et al.*, 2012), la industria de los alimentos (Gómez-De-Anda *et al.*, 2012), taxonomía (Ami *et al.*, 2004), entre otras.

Por otro lado, el FTIR además de permitir la identificación espectroscópica de diversos compuestos, también permite estudiar tejidos complejos y muestras

heterogéneas con el uso de microscopía (micro-espectroscopia). Para que esto sea posible, al microscopio se encuentra acoplado un detector que permite obtener espectros puntuales individuales de una región específica de la muestra; y una cámara digital que permite la visualización de la muestra, con la finalidad de guiar la búsqueda manual través de la laminilla y localizar una región de interés, de esta forma se puede seleccionar una sola célula y hacer espectros de diferentes regiones en la célula seleccionada. A esto se le denomina mapeo, y aunque consume mucho tiempo, los espectros puntuales a menudo tienen una alta SNR lo que resulta en espectros de alta calidad, ya que la resolución espacial está limitada por las aperturas IR. De esta forma, al generar estos mapas, se pueden comparar regiones específicas celulares, entre diferentes células. La intensidad de la absorbancia en cada punto espectral dentro del mapa se convierte en una imagen de calor, donde se detectan las zonas de la célula con mayor presencia del compuesto en estudio (Baker *et al.*, 2014).

Existen diversos enfoques para analizar los datos obtenidos por FTIR y el método utilizado depende en gran medida de la naturaleza de los datos y de la información que se requiere. Los métodos más simples representan un análisis de los picos específicos, lo que implica la correlación de las posiciones de los picos con los espectros de referencia, así como la comparación de las intensidades de los picos, la integración de las áreas de los picos y la medición de los cambios en los picos.

1.8.2 Métodos de análisis de datos.

Para el análisis de los datos obtenidos se puede aplicar un pre-procesamiento, el cual tiene como objetivo mejorar la solidez y la precisión de los subsiguientes análisis multivariados, y aumentar la interpretabilidad de los datos mediante la

corrección de los problemas asociados con la adquisición de datos espectrales. Entre los métodos de pre-procesamiento, se encuentra la corrección espectral, normalización y otras manipulaciones. Las opciones de los métodos de preprocesamiento dependen del objetivo del análisis, del estado físico de la muestra y la potencia de las computadoras disponibles. Todos estos tienen la finalidad de reducir el ruido en los espectros IR. Otra opción es descomponer los espectros mediante el análisis de componentes principales, y luego reconstruirlos a partir de sólo algunos de sus componentes principales descartando así aquellos que representan principalmente el ruido (Baker *et al.*, 2014). El análisis de componentes principales permite reducir la dimensionalidad de las variables, partiendo de una base de datos con muchos perfiles espectroscópicos, a una con un número menor, perdiendo la menor cantidad posible de información buscando combinaciones lineales de las variables originales. Al mismo tiempo, los gráficos de puntuación ayudan a comprender la estructura de correlación, formando grupos y trayectorias, lo que permite discriminar diferencias en las muestras (Mata *et al.*, 2017).

Así mismo, se suele aplicar la segunda derivada a los datos de absorbancias de los espectros usando el algoritmo SG (*Savitzki-Golay*), que tiene la ventaja de eliminar las bandas superpuestas. Se ha demostrado que las características topográficas de la muestra y sus efectos, se pueden minimizar introduciendo espectros de segunda derivada en el modelo de clasificación; una mejor segregación de las categorías normales frente a varias enfermedades facilita el posible diagnóstico histopatológico espectroscópico (Baker *et al.*, 2014).

1.8.4 FTIR aplicado al estudio de Insuficiencia Renal Aguda (IRA).

Anteriormente, ya se habían destacado las ventajas del uso de la micro-espectroscopía como una técnica no invasiva, rápida, que no necesita reactivos, y que arroja información valiosa sobre la composición bioquímica de un tejido o células, y que tenía un gran potencial diagnóstico en diversas áreas de la ciencia. La finalidad de usar esta técnica en esta investigación es permitir encontrar diferencias significativas entre el tejido renal sano, el afectado por daño renal agudo inducido con CDDP, y el tratado con células madre.

En la Figura 11, se puede apreciar que las bandas de lípidos, típicamente se localizan a 1,744 números de onda, mientras que la banda asociada a carbohidratos, está aproximadamente en 1,000 números de onda.

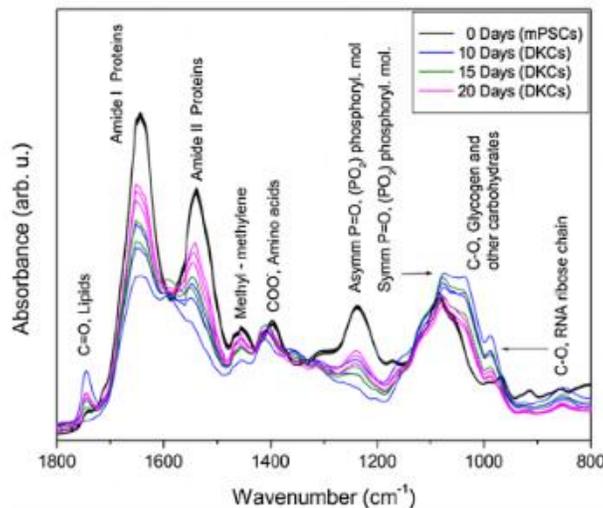


Figura 11. Espectros de FTIR de células madre pluripotentes de ratón (mPSCs) y células de riñón diferenciadas (DKCs) medidas en la región de la huella biológica (1,800-800 cm⁻¹).

Se observan varias bandas de absorción de lípidos, proteínas, moléculas fosforiladas y ácidos nucleicos (N = 3)

Tomada de: Mata *et al.*, 2017.

Por otro lado Sreedhar y cols en el 2015 publicaron el espectro infrarrojo típico de una muestra de riñón sano medido por FTIR, con la finalidad de identificar diferencias en las partes que conforman al glomérulo (Fig. 12).

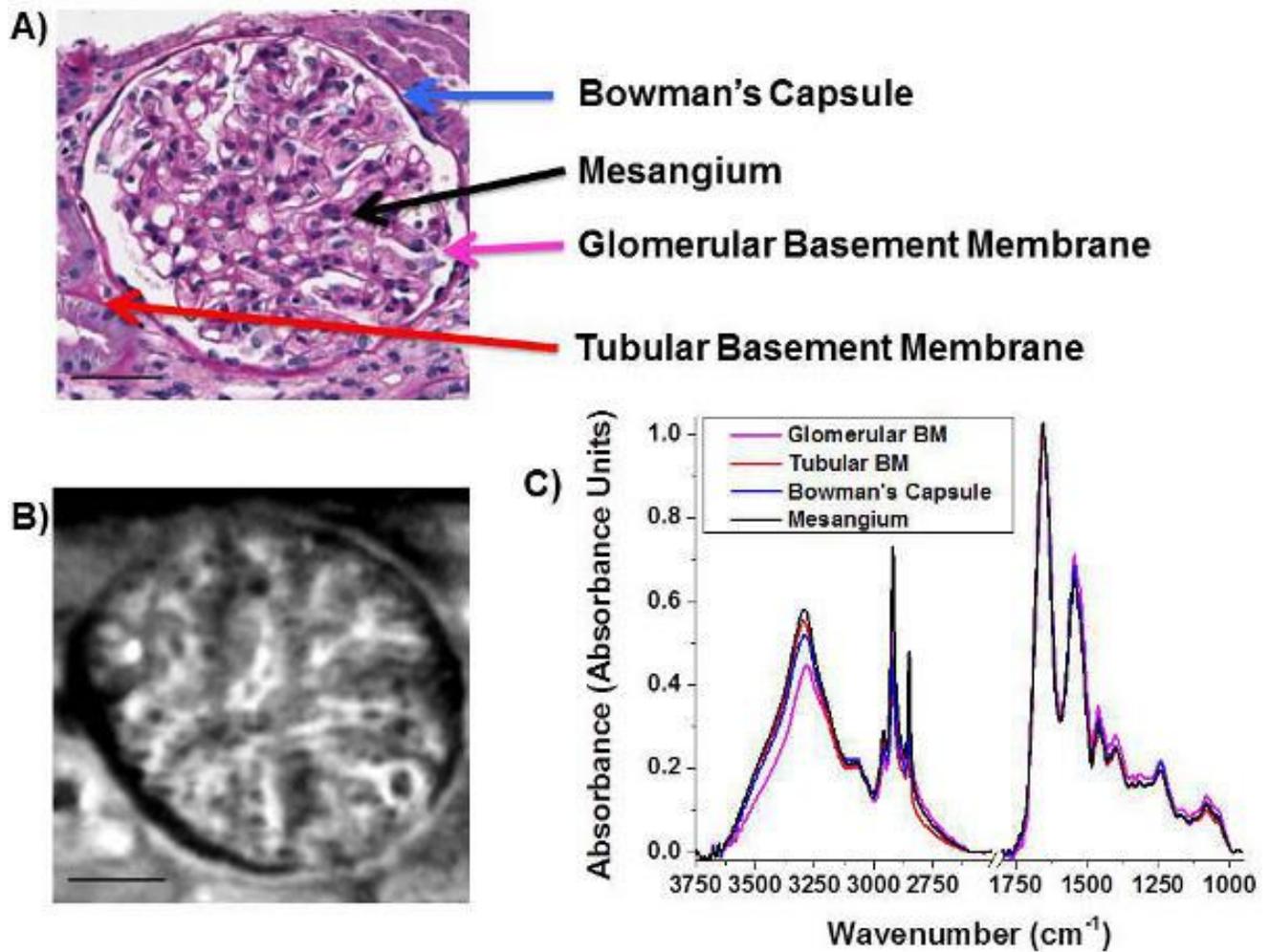


Figura 12. Diferenciación de los componentes del glomérulo mediante imágenes FTIR de alta definición. (A) Muestra teñida con ácido periódico de Schiff con las etiquetas de las partes del glomérulo a analizar. (B) Imagen FTIR de alta definición de la región de estiramiento asimétrica de CH₂ (objetivo 36X) de una muestra del mismo riñón teñido. (C) Partes marcadas en (A) analizadas usando la imagen FTIR en (B) para poder diferenciar químicamente las cuatro partes del glomérulo.
Tomada de: Sreedhar *et al.*, 2015.

Es de esta forma que, mediante el análisis de las diferencias entre los espectros de las muestras, como se puede aplicar el uso del FTIR para el diagnóstico clínico, y en este trabajo, se esperan ver diferencias en las muestras de los riñones de ratones con diferentes tratamientos.

2. JUSTIFICACIÓN.

La IRA está caracterizada por un rápido declinamiento de la tasa de filtración glomerular, que va de horas a días, lo que da lugar a la retención productos nitrogenados y anormalidades electrolíticas.

En un estudio dado a conocer por la Secretaría de Salud en el 2010, se reporta que cada año se suman al menos 40,000 nuevos casos de Insuficiencia Renal en el país, con una tasa de crecimiento del 11% anual en los últimos años. El tratamiento actual para la IRA no representa una mejora definitiva en el estado de salud del paciente.

Por lo tanto, es necesario explorar nuevas alternativas de tratamiento para los pacientes renales, que permitan incrementar su calidad de vida, reducir las complicaciones y costos del tratamiento, y así mismo, asegurar la regeneración del tejido y la función renal. En este sentido, las terapias regenerativas para el riñón representan una nueva opción terapéutica que ha sido ampliamente investigada desde el aspecto de la biología de células madre, obteniendo excelentes resultados en la restauración de la función renal.

3. HIPÓTESIS.

Si las células madre embrionarias revierten los efectos biomoleculares que se generan en la insuficiencia renal aguda inducida por cisplatino, entonces podrán ser propuestas como terapia celular para el tratamiento de esta enfermedad.

4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivo general.

Estudiar los efectos del implante de ESC de ratón (mESC) en un modelo murino con insuficiencia renal aguda (IRA) mediante análisis bioquímico, histológico, fenotípico y espectroscópico infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), para evidenciar la efectividad del tratamiento con estas células.

4.2 Objetivos particulares.

- Determinar los niveles de ácido úrico y creatinina en suero, haciendo uso de un equipo automatizado de química clínica, con la finalidad de saber si existen cambios en los niveles de estos metabolitos por el implante de mESC en un modelo murino con IRA.
- Estudiar la histopatología del riñón, tiñendo cortes histológicos de riñón con la técnica de hematoxilina y eosina, para evaluar los efectos benéficos a nivel histológico del implante de mESC en un modelo murino con IRA.
- Analizar la expresión proteica de p53, mediante inmunohistoquímica y microscopia de fluorescencia, con la finalidad de evidenciar cambios en su expresión en un modelo murino de IRA tratado con mESC.
- Evaluar espectroscópicamente cambios bioquímicos en el tejido renal, usando FTIR, para demostrar que el implante de mESC en un modelo murino con IRA produce cambios bioquímicos detectables por esta técnica.

5. METODOLOGÍA.

El presente proyecto se desarrolló en tres fases: en la primera fase se realizó con muestras de ratones sanos los análisis bioquímicos clínicos, el análisis histopatológico, la inmunohistoquímica para p53 y la obtención de los espectros por micro-espectroscopia FTIR. En la segunda fase, las tres técnicas antes mencionadas se aplicaron para el análisis de muestras de ratones con IRA, y por último en la tercera fase, se desarrollaron los cultivos celulares de MEF y mESC, para implantarlos en ratones con IRA y realizar nuevamente las tres técnicas.

La metodología del proyecto se resume en el siguiente diagrama:

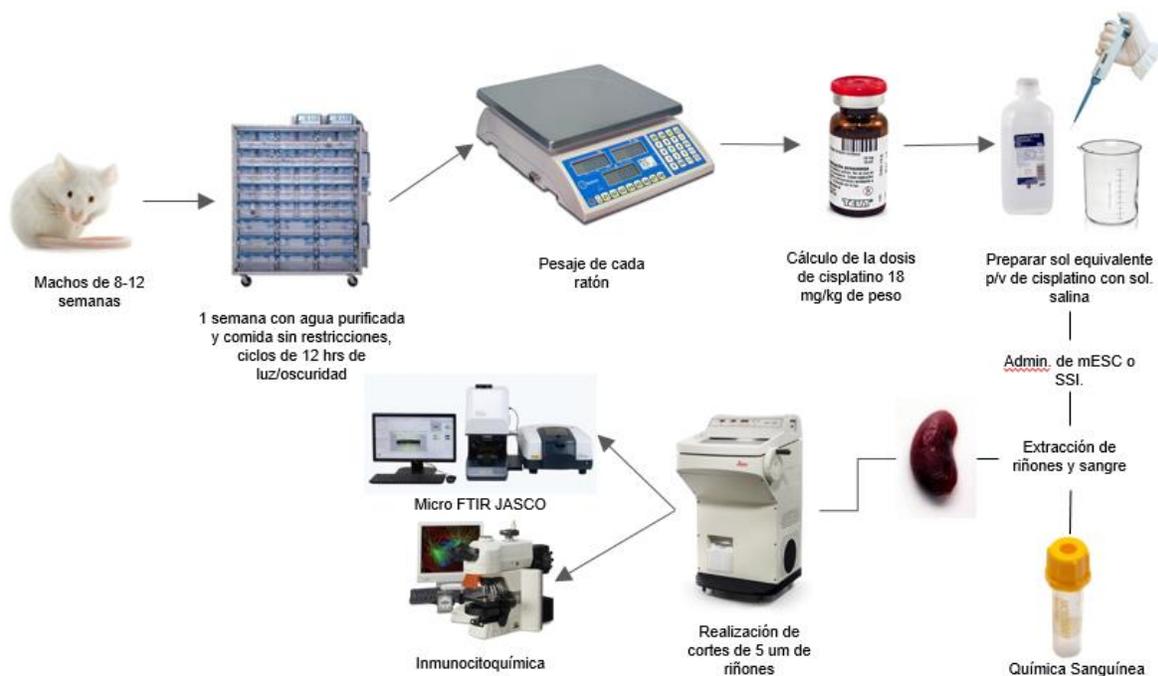


Figura 13. Diagrama experimental del proyecto de los grupos control y experimental.

5.1 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 8-12 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 RAC autoventiladas, manteniéndose con ciclos de 12 h de luz/oscuridad, con humedad controlada (50–60%) y condiciones de temperatura constante (21 ± 1 °C).

Para el desarrollo de la investigación, se conformaron 3 grupos de estudio: sano constituido por 5 animales, control constituido por 10 animales y experimental constituido por 10 animales; a todos los integrantes del grupo control y experimental se les indujo lesión renal con una sola dosis de CDDP de 18 mg/kg; al grupo control se le administró solución salina isotónica (SSI), mientras que al experimental se le administraron células madre en una concentración de 1×10^6 mESC resuspendidas en SSI.

5.1.1 Modelos de estudio.

A todos los ratones de cada grupo se le realizó un perfil bioquímico de 2 elementos (creatinina y ácido úrico); un riñón de cada ratón se destinó para hacer criocortes usados en el análisis histopatológico, inmunohistoquímica y microFTIR siguiéndose la línea de tiempo que se muestra en la figura 14.

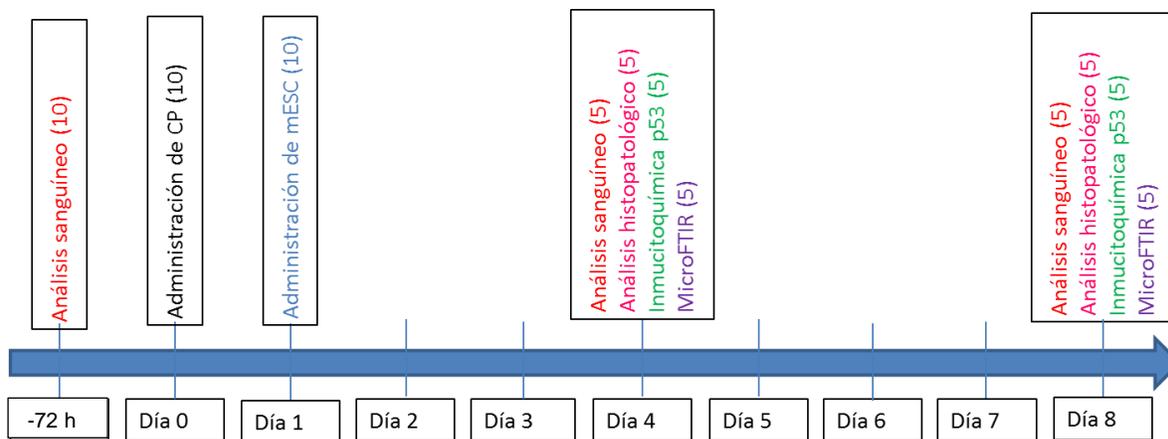


Figura 14. Línea del tiempo de los grupos de estudio. Se llevó a cabo la realización de las técnicas en los tres grupos de estudio siguiendo esta línea del tiempo. Entre paréntesis aparece el número de ratones utilizado en cada técnica.

5.1.2 Administración CDDP.

Para la Inducción de Daño Renal (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 con el peso de cada ratón se calcularon las dosis de CDDP administrándose 18 mg/kg, 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, 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 (Fig. 15). 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.



Figura 15. Administración de CDDP vía intraperitoneal. Se coloca al ratón en 90° con relación al experimentador, y se punciona el cuadrante inferior izquierdo.

5.2 Obtención de muestras sanguíneas.

A cada uno de los animales se les extrajo sangre periférica 72 h antes de la IDR y posteriormente a los 4 y 8 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 (Fig. 16). 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 2 elementos (creatinina y ácido úrico) en un equipo de química clínica analítica (discrete random analyser modelo MINI; Química Clínica Aplicada).

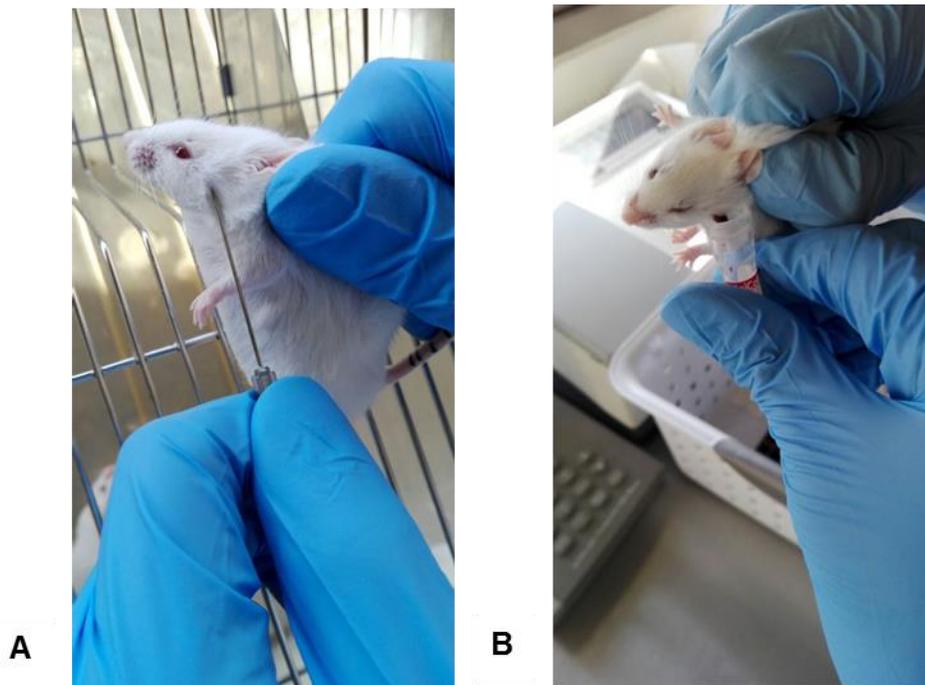


Figura 16. Obtención de muestra sanguínea. A. Localización de la vena facial del ratón. B. Recolección de sangre en tubos Microtainer.

5.3 Obtención de riñones.

Para la obtención de los riñones se sacrificaron 5 ratones a los 4 y 8 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 extraídos (Fig. 17).



Figura 17. Extracción quirúrgica de riñones de ratón. Exposición de los riñones en la cavidad retroperitoneal.

5.3.1 Criocortes

Una vez obtenidos los riñones se realizaron cortes con un criostato de pie (ECO SHEL) a una temperatura de -30°C , para lo cual los órganos 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 (Fig. 18), fijando las muestras con paraformaldehído (Sigma, cat: P6148) al 4% y ácido pícrico (Sigma, cat: 197378) al 0.15% en solución amortiguadora de fosfatos

(PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente, lavándose 2 veces con PBS al término de la fijación.

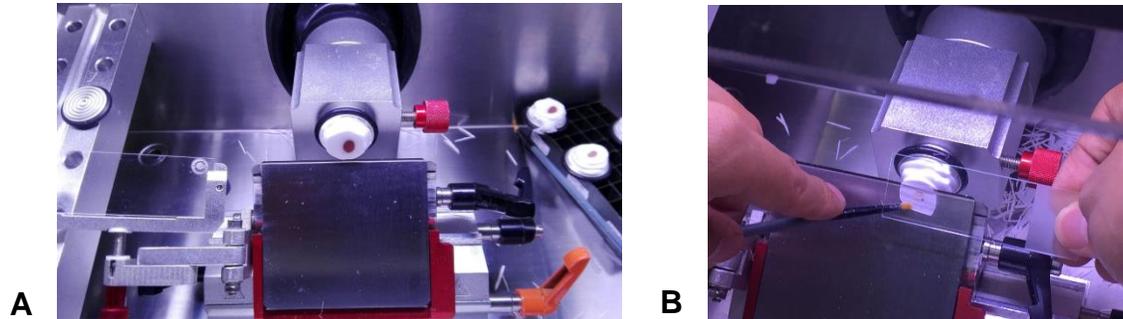


Figura 18. Obtención de cortes histológicos. A. Montaje de los riñones en posición anatómica en el brazo del cristato. B. Obtención de criocortes.

5.3.2 Tinción de los cortes histopatológicos.

Una vez que se fijaron los cortes histológicos de riñón, se procedió a realizar una tinción de los mismos con Hematoxilina (HYCEL DE MÉXICO, cat: 738) y Eosina (HYCEL DE MÉXICO, cat: 692) 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 (Fig. 19).

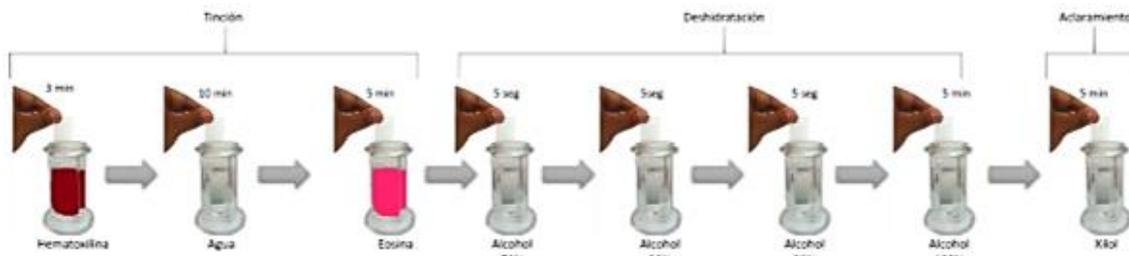


Figura 19. Técnica histológica. Pasos para la tinción, deshidratación y aclaramiento de las muestras histopatológicas.

5.3.3 Análisis histopatológico.

Se obtuvieron tres cortes de cada riñón, donde se analizaron 10 campos en cada uno, con microscopía óptica de campo claro, 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.

5.4 Inmunohistoquímica y microscopía de fluorescencia

Se colocaron tres cortes histológicos en una laminilla de vidrio, y se fijaron 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.

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 μ l de proteína bloqueadora (Dako, cat: X0909) durante 20 minutos para inhibir tinciones no específicas. Concluido el tiempo se eliminó el exceso de líquido y se procedió a realizar el marcaje con el anticuerpo (Ab) primario contra p53 (Pab 1801: sc-98) en las preparaciones histológicas para la titulación, adicionando 4 μ L del Ab primario en 4 muestras haciendo dos diluciones, 1:50 y 1:200.

El Ab anti p53 se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Y pasados los tiempos establecidos, se lavaron las preparaciones dos veces con PBS.

Finalmente, se realizaron las diluciones correspondientes del Ab secundario conjugado contra ratón (Alexa flúor 647) realizándose diluciones 1:200 y 1:300 de este. El Ab secundario conjugado se incubó durante 45 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y posteriormente se lavó 4 veces con PBS. En seguida se agregaron 10 μ l de glicerol al 10% y se les colocó un cubreobjetos. Finalmente, las muestras fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia TiU-Eclipse (Nikon, Japón), utilizando el software microimage pro.

El análisis por esta técnica se hizo por triplicado en cada animal, y se obtuvo que la concentración adecuada tanto del Ab secundario como del primario fue de 1:200.

5.5 Micro-espectroscopia vibracional.

Las muestras se analizaron por micro-espectroscopia FTIR (JASCO) en el intervalo de número de onda de 4,000-400 cm^{-1} , utilizando el modo de muestreo por reflectancia para medir la absorción de luz infrarroja de las muestras y posteriormente comparar las diferencias entre los espectros de los cortes de riñón de ratones.

Se realizaron 3 cortes de 5 μ m por riñón y se colocaron en una laminilla de vidrio recubierta con 100 nm de oro; la laminilla se colocó en la platina del microscopio y utilizando el objetivo de 16x, se ubicó la zona cortical y medular de los cortes, posteriormente, se enfocaron 5 glomérulos en la zona cortical, 5 túbulos de la

zona cortical y otros 5 de la zona medular, en cada corte. Al seleccionar dichos objetivos tisulares con un cuadro en la pantalla, se determinó el tamaño de apertura a medir; establecida la apertura en base al tamaño del objetivo a medir, se tomó el *background* del sustrato, donde aparece el espectro típico de la laminilla de oro en la que se encuentra la muestra, y finalmente se realiza la medición del objetivo tisular.

El equipo realiza un espectro sobre la zona específica del tejido seleccionada, para la cual, se ingresa al equipo que haga 120 barridos de la zona seleccionada, 3 veces, con una resolución de 4.0 cm^{-1} en un rango de $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$. Las mediciones son generadas por un haz que pasa a través de la muestra y refleja desde el sustrato (la laminilla de oro) atravesando nuevamente la muestra. Con esta metodología se analizaron las muestras de riñón de ratones sanos, enfermos y enfermos tratados con mESC.

5.5.1 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 SG, el cual utiliza un conjunto de subconjuntos sucesivos de puntos de datos adyacentes con un polinomio de menor grado por mínimos cuadrados lineales.

5.6 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%.

El vial con MEF se tomó del contenedor con nitrógeno líquido a -196°C , se pasó a un ultracongelador a -80°C donde se mantuvo por 24 h, y posteriormente se pasó a un congelador de -20°C . 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 1200 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_2 , se esperó a que el cultivo se adaptara a las condiciones del medio y lograra una confluencia del 70% y una vez logrado este paso, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS, con la finalidad de eliminar restos del medio de cultivo, y dado que los MEF son células adherentes, fue necesario despegar las células de la placa de cultivo con 1 mL de Tripsina / 0.53 EDTA (ATCC, 30-2101). Posteriormente se desactivo la tripsina con 1 mL de medio DMEM completo y se vertió la suspensión

celular a un tubo falcón de 15 mL, centrifugándose a 1,200 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 celular automático (Invitrogen cell counter), para lo cual se mezclaron 7 μ L de la suspensión celular y 7 μ L de azul tripano, sembrando los MEF en cajas de cultivo P60 a una densidad de 55,000 células/cm².

5.6.1 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 mESC, 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 μ L/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/cm² y 24 h 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% CO₂ por 4.5 h; pasado el tiempo se le aspiró el medio, se enjuagaron las células con PBS, se tripsinizaron y se incubaron por 3 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 1200 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.

5.7 Cultivo de Células Madre Embrionarias de Ratón (mESC).

Las células madre embrionarias de ratón, se adquirieron en ATCC, 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, LIF (*Leukemia inhibitory factor*) (Chemicon, ESG1107) 1 000 U/mL. Posteriormente se sembraron las mESC en una caja de cultivo P60; incubándose a 37°C y 5% CO₂, siendo necesario el cambio de medio cada 24 h. Hasta que se observó una confluencia del 70%; una vez lograda la confluencia se realizaron pases celulares.

5.7.1 Descripción Morfológica.

Las colonias de mESC se observaron día con día a lo largo del proceso de cultivo, y expansión en un microscopio invertido Ti-U Eclipse Nikon, determinándose la confluencia celular, la forma y adherencia de las colonias.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis sanguíneo de los grupos de estudio.

Los resultados del perfil bioquímico de dos elementos en los grupos de estudio se muestran en la tabla 3. Para el grupo control tratado con SSI, se aprecian valores de creatinina por encima de los valores normales cuyo rango oscila entre 0.630 ± 0.097 mg/dL (Takai *et al.*, 2015), notando un decremento de los valores del día 4 al día 8; mientras que el grupo experimental, también se observó también un decremento, pero se alcanzaron niveles de creatinina cercanos a los normales al día 8. En cuanto a los valores de ácido úrico, se observó que este analito fue disminuyendo en ambos grupos con el pasar de los días, y que se obtuvieron valores más bajos de este en el grupo experimental tratado con mESC, que en el grupo control con SSI.

Tabla 3. Perfil bioquímico para los grupos de estudio.

Parámetro medido	Valor promedio del grupo sano (mg/dL)	Valor promedio del grupo tratado con SSI (mg/dL).			M \pm SD del grupo con SSI	Valor promedio del grupo tratado con mESC (mg/dL)			M \pm SD del grupo con mESC
		PREINDUCCIÓN	DÍA 4	DÍA 8		PREINDUCCIÓN	DÍA 4	DÍA 8	
Creatinina	0.5	0.70	2.3	1.6	1.5 \pm 0.8	0.64	1.8	1.00	1.1 \pm 0.6
Ácido úrico	—	0.95	2.6	4.4	2.6 \pm 1.7	1.0	2.0	4.0	2.3 \pm 1.4

6.2 Análisis histopatológico.

Se sacrificaron cinco animales de cada grupo al día 4 y cinco al día 8 después de la IDR, y se obtuvieron muestras histopatológicas de riñón, de la misma forma

como se hizo con los ratones sanos (Fig. 20). De forma general, el análisis histopatológico de los ratones tratados con solución salina revela lesiones variables a nivel tubular y glomerular. En cuanto a las alteraciones a nivel tubular, las microfotografías tomadas de las muestras de biopsia renal muestran características que sugieren necrosis tubular aguda, entre las que destacan denudación irregular o difusa de las células tubulares renales (1) que se aprecia más palpablemente al día 8 (Fig. 22); dilatación tubular (2) e infiltrado inflamatorio (4) que se observan más fácilmente al día 4 (Fig. 21) después de la IDR; y finalmente, se aprecia al día 4 y al día 8 obstrucción intratubular debida a la denudación del epitelio y a la formación de restos celulares (3).

En cuanto a las alteraciones glomerulares se distinguen lesiones en la punta del polo urinario (5) y colapso del penacho glomerular (6) presentes a los días 4 y 8 después de la IDR (Fig. 21 y 22 respectivamente), así como glomeruloesclerosis (7) presente al día 8 en el grupo control (Fig. 22).

En cuanto al grupo tratado con mESC, se aprecia la presencia de infiltrado inflamatorio (4) (Fig. 21) y obstrucción de la luz tubular (3) (Fig. 22) pero con una microestructura renal más conservada en comparación al grupo control tratado con SSI. Sin embargo, cabe destacar la presencia de vacuolas citoplasmáticas (9) al día 8 del grupo experimental tratado con mESC (Fig. 23).

Sanos

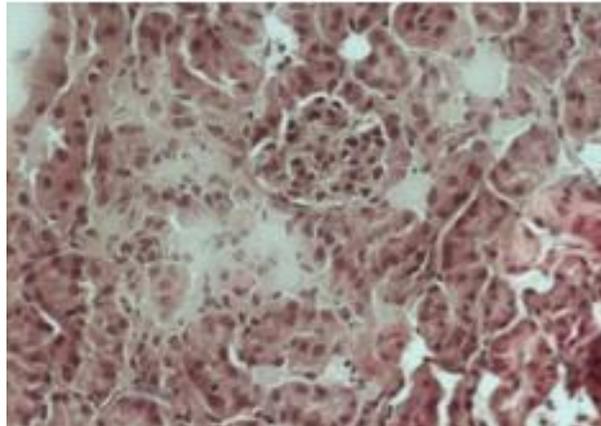


Figura 20. Microfotografía del sistema tubular y glomerular de ratones sanos. Se destaca microestructura glomerular y tubular conservada, sin presencia de infiltrado inflamatorio, ni datos de daño o necrosis. (400X)

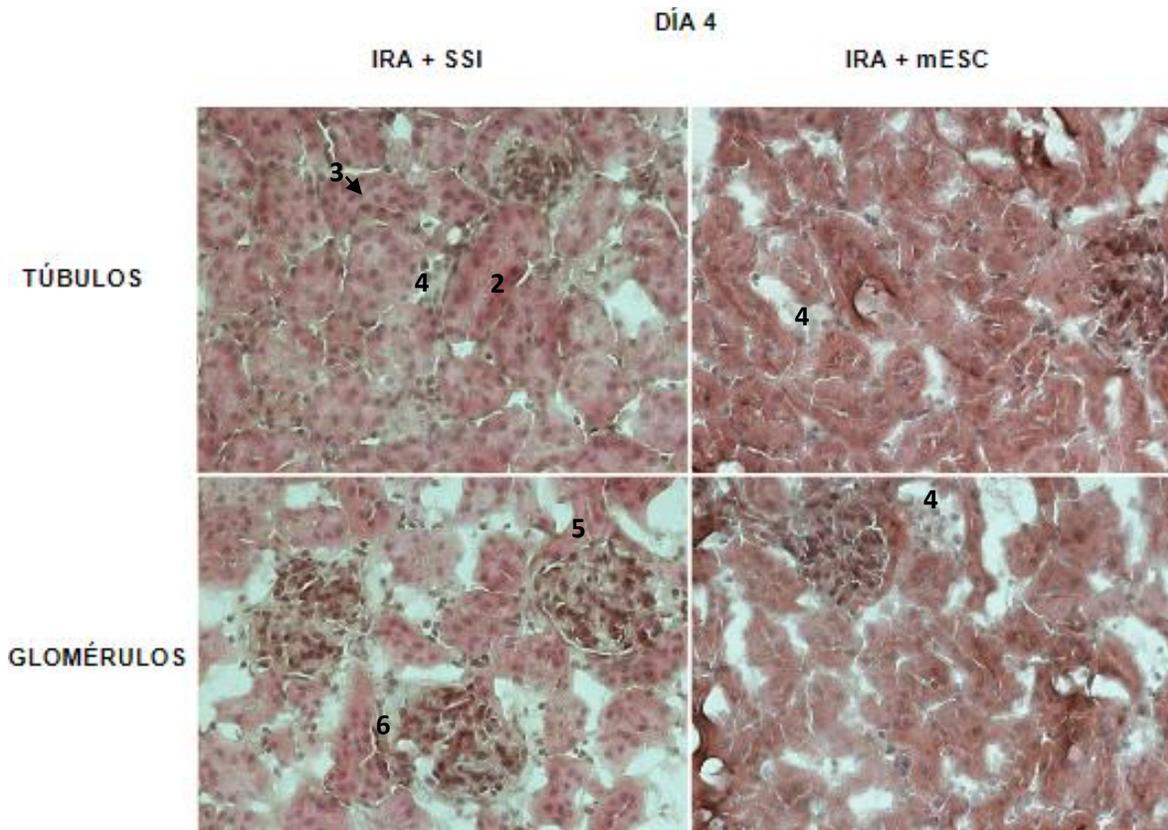


Figura 21. Microfotografía del sistema tubular y glomerular al día 4. En el grupo control se aprecia necrosis tubular aguda caracterizada por la presencia de infiltrado inflamatorio (4) e inflamación tubular (2), así como lesión en la punta del polo urinario (5) y colapso del penacho glomerular (6). También es posible observar taponamiento de la luz tubular secundaria a la descamación (3) Mientras que en el grupo experimental se observa microarquitectura tubular y glomerular conservadas, con presencia de infiltrado inflamatorio (4). N=10 (200X).

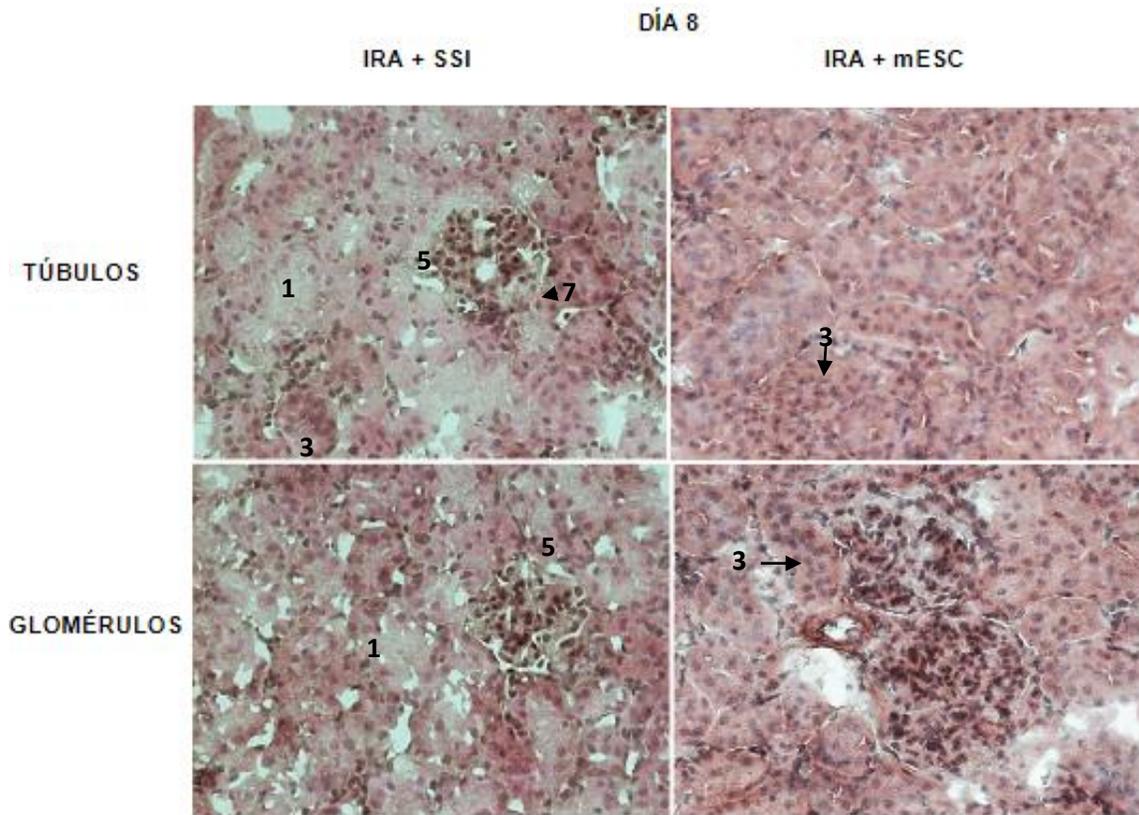


Figura 22. Microfotografía del sistema tubular y glomerular al día 8. Se aprecian lesiones en la punta del polo urinario (5) en el grupo control, glomeruloesclerosis focal segmentaria (7) así como zonas donde ya no es posible distinguir la microarquitectura tubular típica, debido al denudamiento de la basal tubular (1) con la consecuente obstrucción intratubular (3), esta última también se aprecia en el grupo tratado con mESC junto con un aumento de la celularidad mesangial. N=10 (200X).



Figura 23. Microfotografía del sistema tubular y glomerular de ratones implantados con mESC. Se observa en detalle al día 8 después de la inducción, obstrucción tubular secundaria a la descamación tubular (3) y formación de vacuolas citoplasmáticas (8) en el grupo experimental. N=10 (400X).

6.3 Inmunohistoquímica y microscopia de fluorescencia para p53.

De acuerdo con las titulaciones establecidas para cada Ab, la figura 24 representa los controles negativos en los cortes histológicos de riñón de ratón donde se descarta auto fluorescencia del tejido renal, estos controles negativos se hicieron con riñones de ratones sanos.

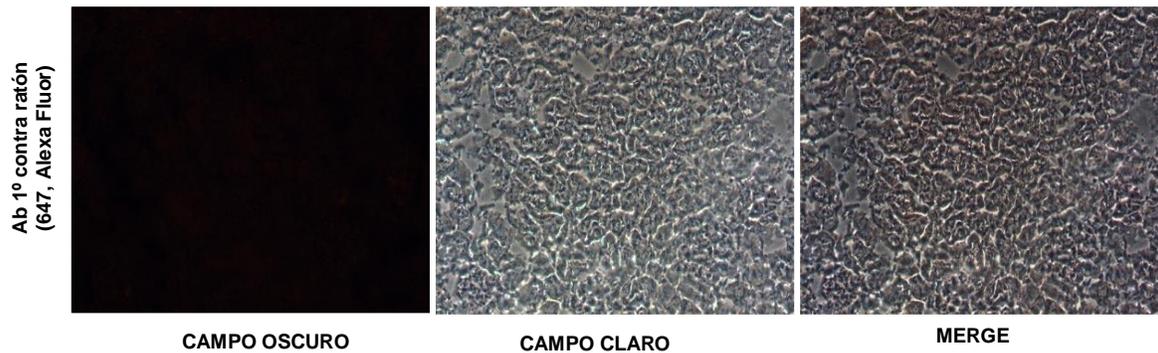


Figura 24. Controles negativos en riñón de ratón sano. Imagen representativa de ausencia de autofluorescencia en el tejido renal para el Ab primario contra ratón (Alexa Fluor 647) N=5 (200X).

En las figuras 25 y 26 se muestra la inmunodetección de p53 en cortes histológicos de riñón de ratón, demostrando la funcionalidad y el marcaje del Ab primario contra p53, así como la presencia de esta proteína proapoptótica.

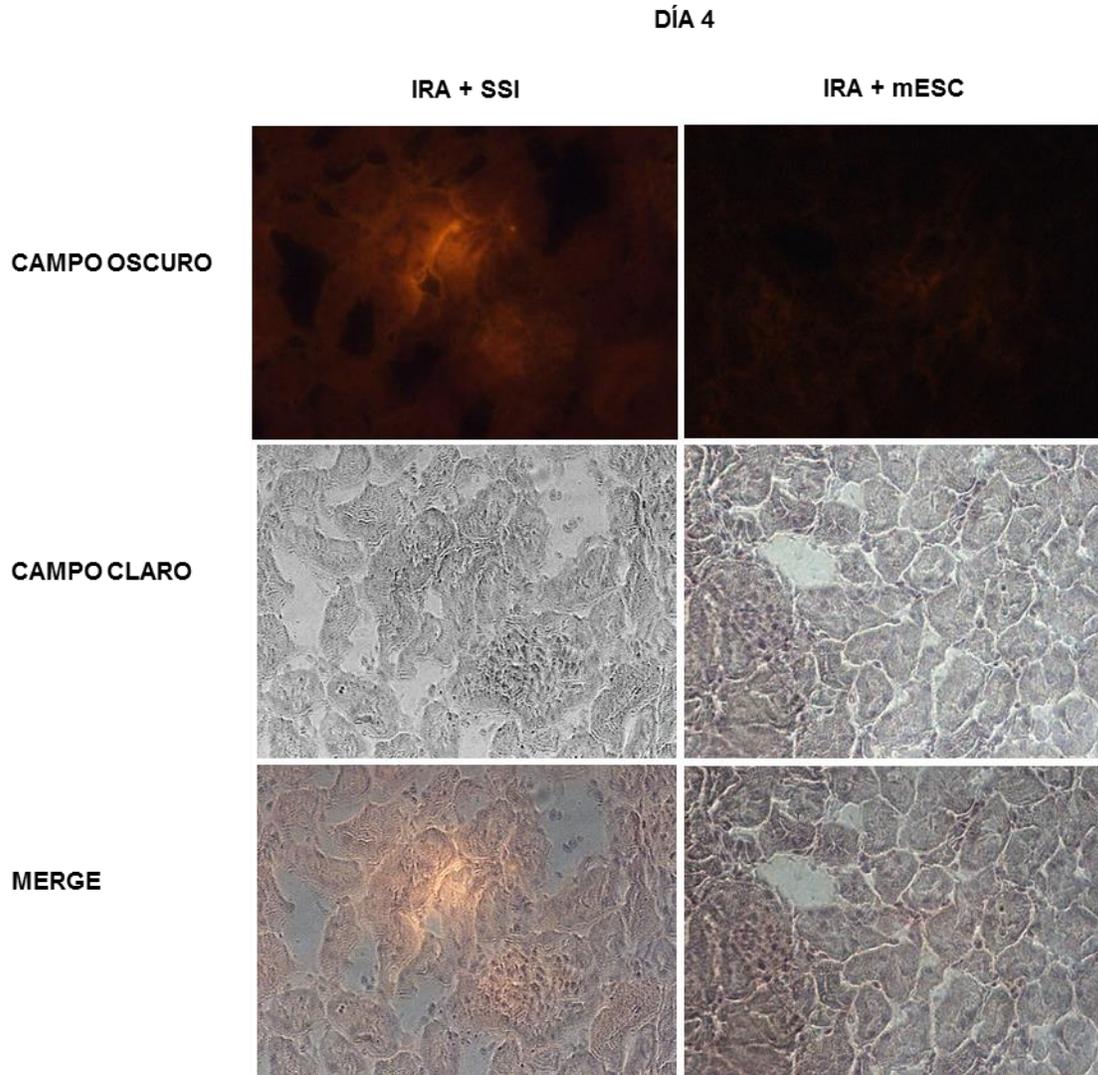


Figura 25. Inmunodetección de p53 en tejido renal al día 4. Imagen representativa de la presencia de p53 en riñón de ratones al día 4 después de la inducción de daño renal, en el grupo tratado con mESC y en el grupo tratado con SSI. N=10 (200X).

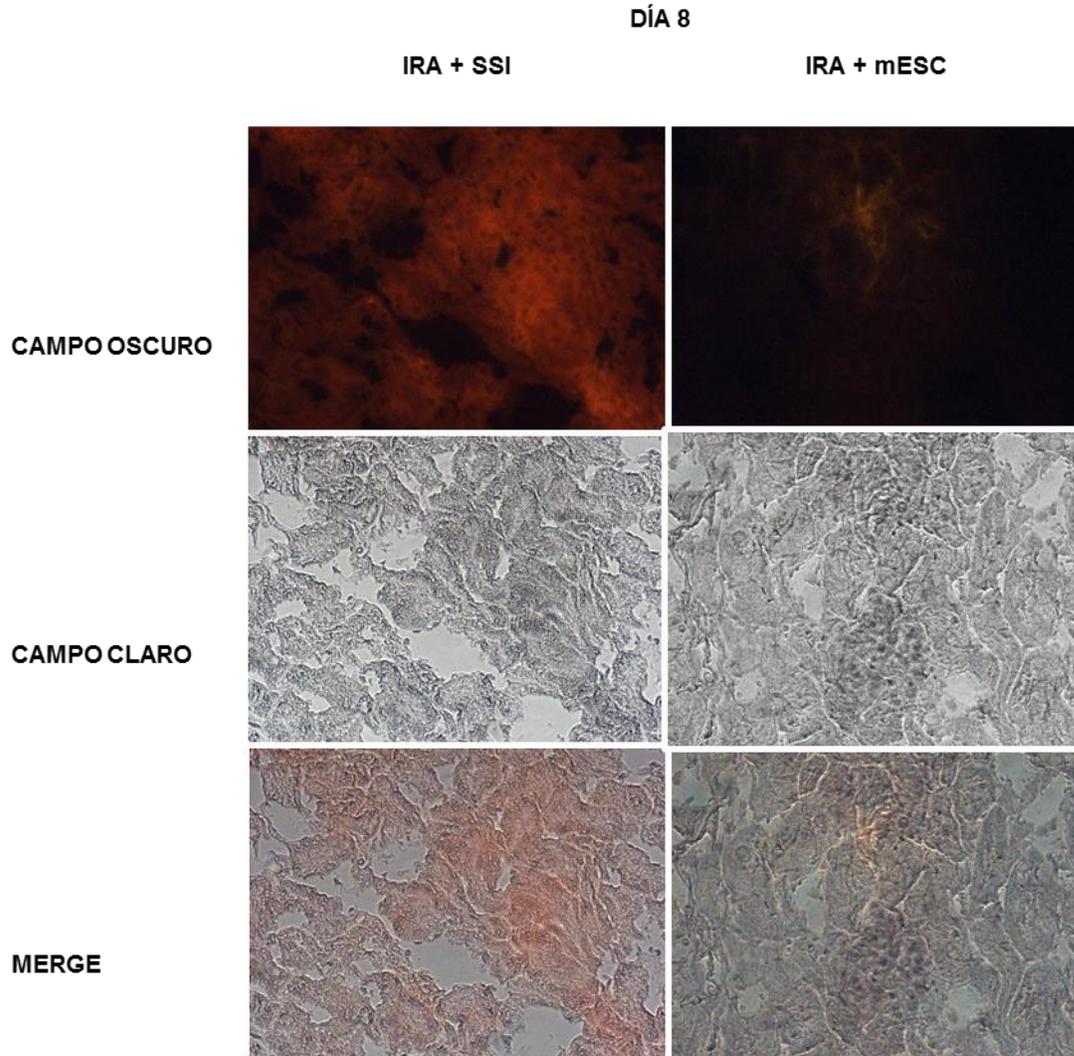


Figura 26. Inmunodetección de p53 en tejido renal al día 8. Imagen representativa de la presencia de p53 en riñón de ratones al día 8 después de la inducción de daño renal, en el grupo tratado con mESC y en el grupo tratado con SSI. N=10 (200X).

6.4 Micro-espectroscopia vibracional.

Se analizaron por microFTIR en modo de reflectancia, los cortes histológicos de riñones de ratones sanos, con IRA y con IRA tratados con mESC usando la normalización SNV. En la figura 27 se aprecian los espectros obtenidos de los cortes, donde se destacan las bandas en las cuales se observaron cambios.

En las figuras 28 y 29 se detallan las regiones espectrales analizadas en glomérulos y médula, mientras que en las 30 y 31 las de túbulos de corteza. En la siguiente tabla se enlistan los números de onda de las bandas y el compuesto que las genera:

Tabla 4. Números de onda analizados en los espectros de los cortes histológicos de riñón.

Número de onda (cm ⁻¹)	Compuesto	Biomolécula
1740	Modo de flexión (δ) de los grupos (C-O).	Lípidos, ésteres de colesterol.
1681	Amida I Modo de flexión (δ) de los grupos (C=O).	Proteínas; giros β .
1660	Amida I Modo de flexión (δ) de los grupos (C=O).	Proteínas; hélice 3_{10} .
1655	Amida I Modo de flexión (δ) de los grupos (C=O).	Proteínas; α hélices.
1650	Amida I Modo de flexión (δ) de los grupos (C=O).	Proteínas.
1638	Amida I Modo de flexión (δ) de los grupos (C=O).	Proteínas; hojas β .
1550	Amida II Modo de estiramiento (ν) de los grupos (N-H).	Proteínas.
1340	Grupos (CH ₂)	Colágeno.
1240	Vibración de estiramiento (ν) asimétrico de grupos fosfato (PO ₂).	Ácidos nucleicos.
1083	Vibración de estiramiento (ν) simétrico de grupos fosfato (PO ₂).	Ácidos nucleicos.
970	Vibración de estiramiento (ν) de grupos (C-C).	Ácidos nucleicos; DNA.

Adaptada de Davis *et al.*, 2010; Lindon *et al.*, 2017; Lodén *et al.*, 2012.

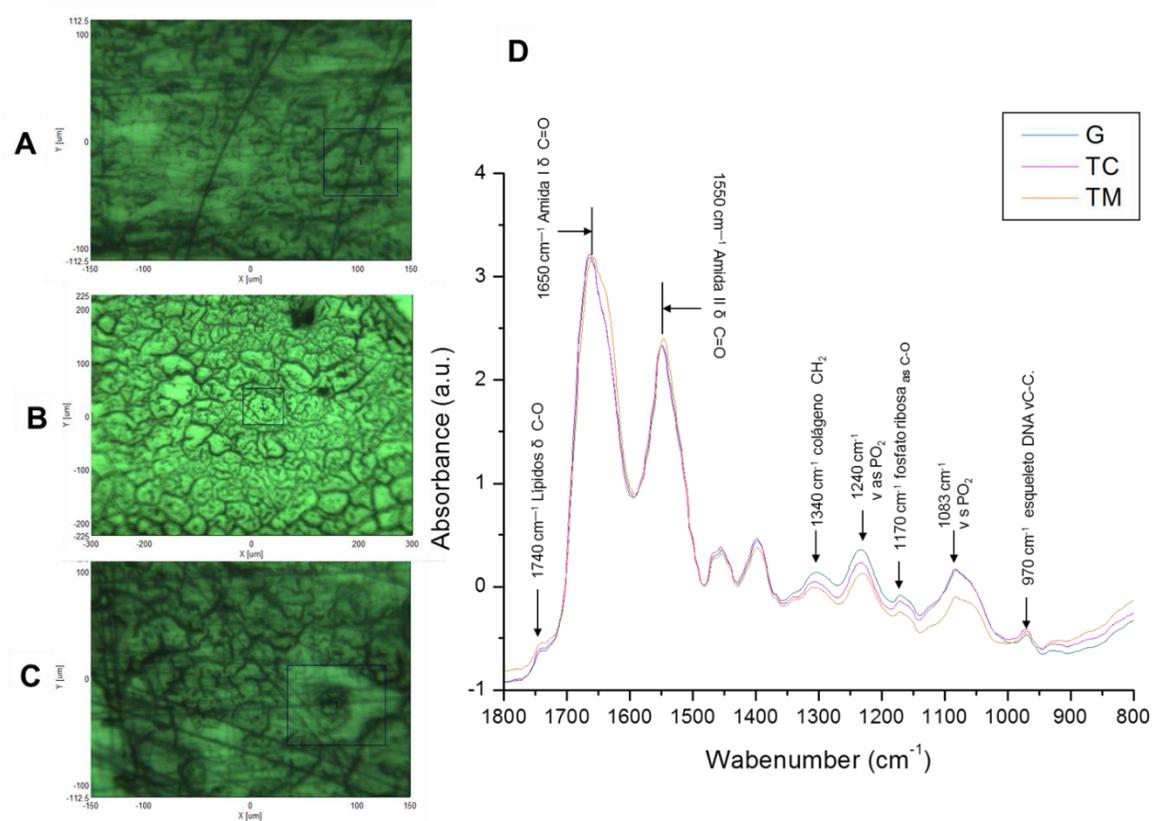


Figura 27. Espectro FTIR de riñón e imágenes micro-espectroscópicas asociadas. A. Imagen de túbulo de corteza. **B.** Imagen de túbulo de médula. **C.** Imagen de glomérulo. **D.** Espectro en crudo normalizado de la huella biológica de cortes de riñón, se observan bandas asociadas con lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos. G= glomérulos, TC= túbulo de corteza, TM= túbulo de medula. v = vibraciones de estiramiento, δ = vibraciones de flexión, s = vibraciones simétricas y as = vibraciones asimétricas (N=15).

6.4.1 Región de lípidos y proteínas.

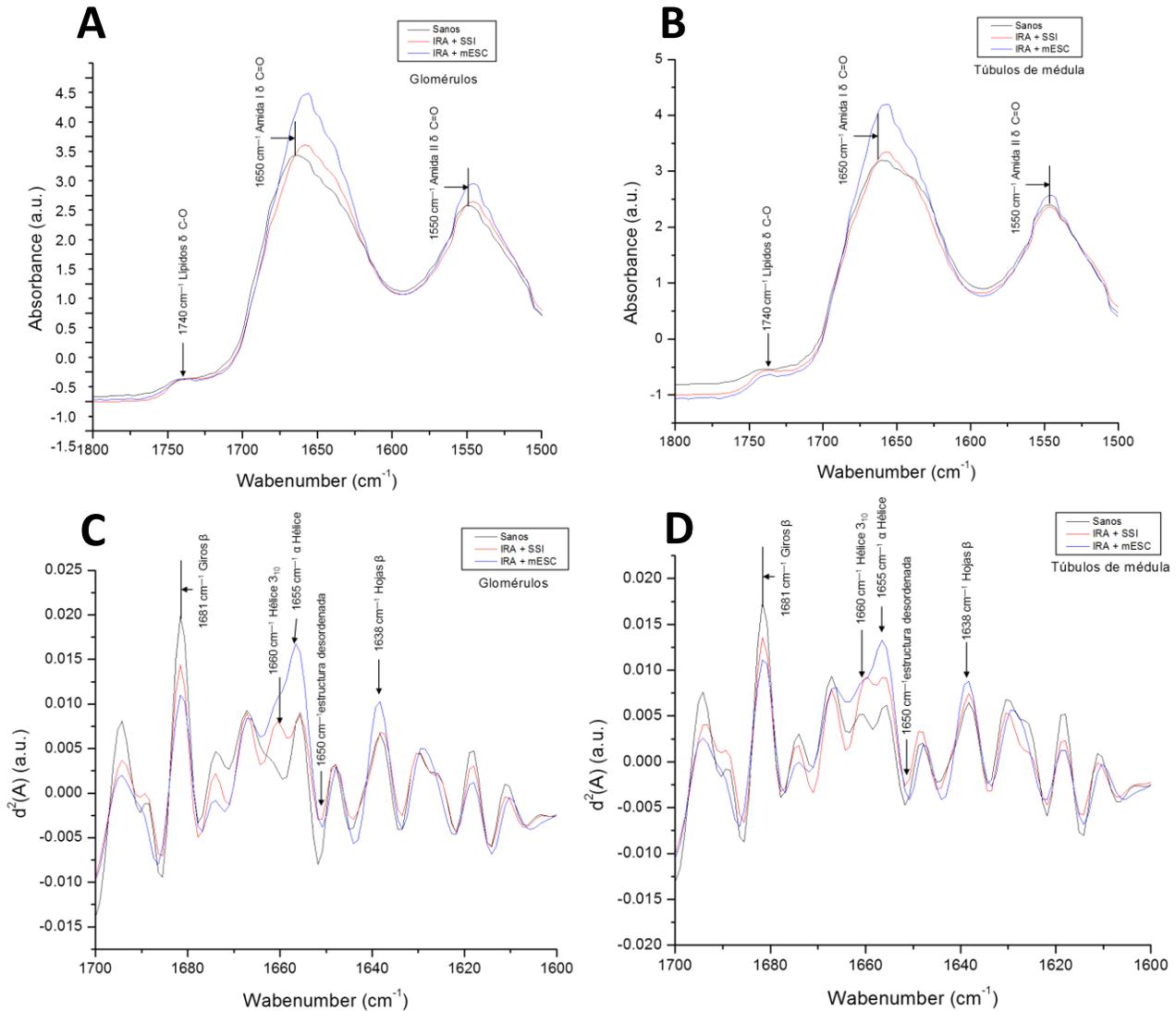


Figura 28. Espectro FTIR de riñón de las bandas asociadas a proteínas y lípidos.

A. Espectro normalizado de glomérulos. **B.** Espectro normalizado de túbulos de médula. **C.** Espectro de segunda derivada de glomérulos. **D.** Espectro de segunda derivada de túbulos de médula (N=25). **A y B.** Espectros normalizados. 1740 cm⁻¹ Modo de flexión (δ) de los grupos (C-O) de lípidos, ésteres de colesterol; 1660 cm⁻¹ Amida I, modo de flexión (δ) de los grupos (C=O) de proteínas; 1550 cm⁻¹ Amida II, modo de estiramiento (ν) de los grupos (N-H) de proteínas. **C y D.** Espectros de segunda derivada Amida I. 1681 cm⁻¹ modo de flexión de los grupos (C=O) de proteínas (giros β); 1660 cm⁻¹ modo de flexión de los grupos (C=O) de proteínas (hélices 3₁₀); 1655 cm⁻¹ modo de flexión de los grupos (C=O) de proteínas (α hélices); 1638 cm⁻¹ modo de flexión de los grupos (C=O) de proteínas (hojas β).

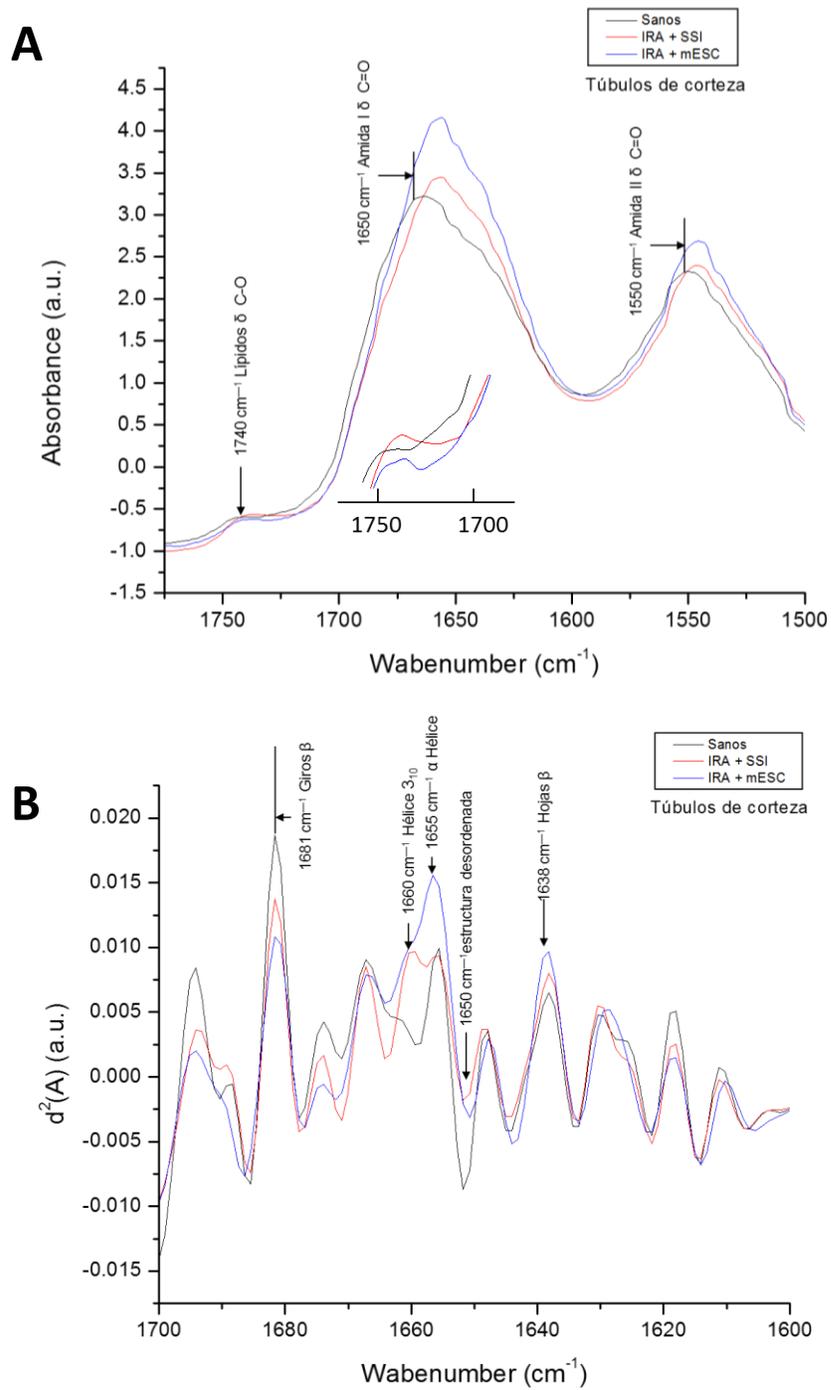


Figura 29. Espectro FTIR de riñón de las bandas asociadas a proteínas y lípidos.

A. Espectro normalizado de túbulos de corteza. **B.** Espectro de segunda derivada de túbulos de corteza.

(N=25).

6.4.2 Región de ácidos nucleicos y carbohidratos.

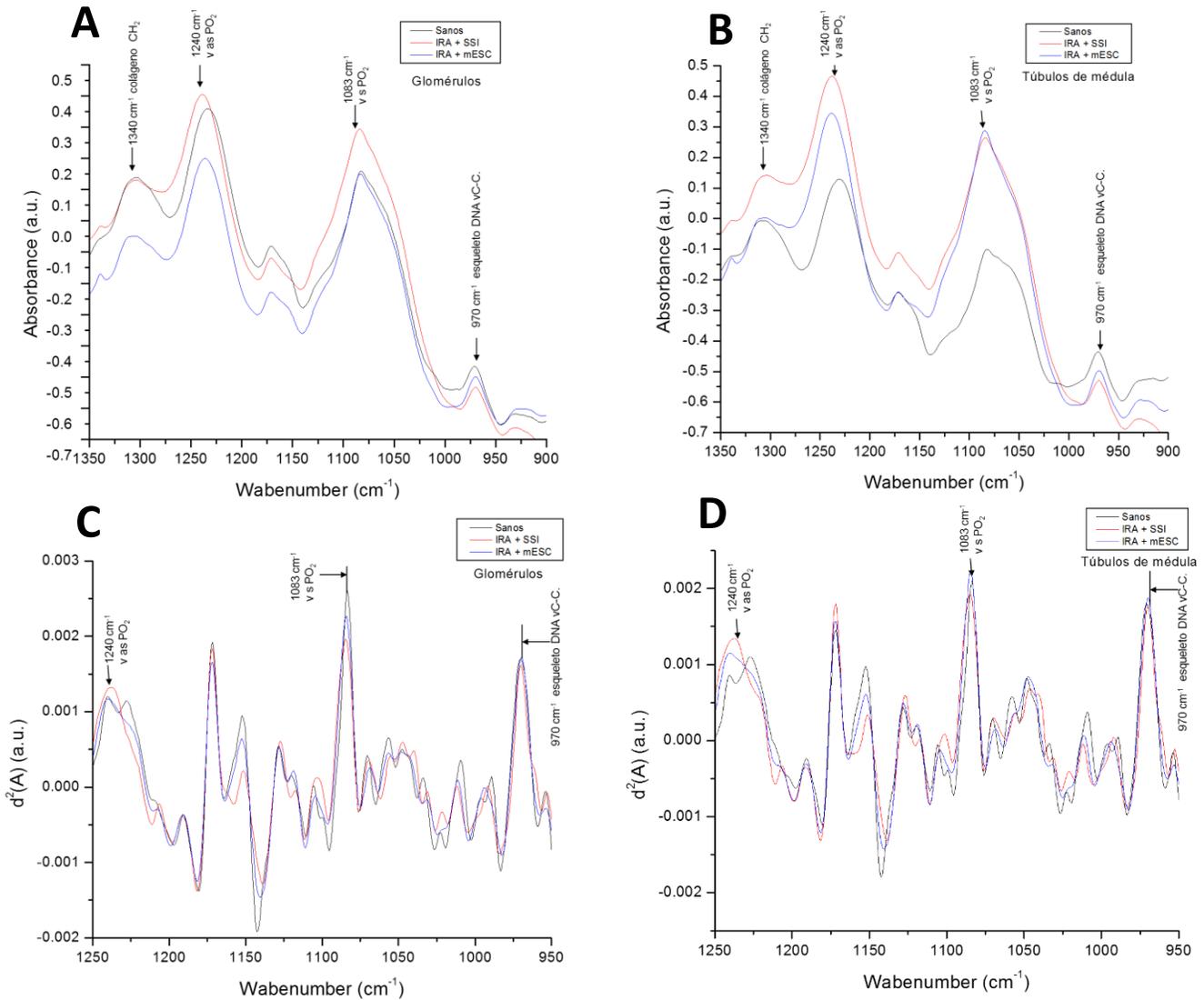


Figura 30. Espectro FTIR de riñón de las bandas asociadas a ácidos nucleicos y carbohidratos. **A.** Espectro normalizado de glomérulos. **B.** Espectro normalizado de túbulos de médula. **C.** Espectro de segunda derivada de glomérulos. **D.** Espectro de segunda derivada de túbulos de médula (N=25). **A y B.** Espectros normalizados. 1340 cm^{-1} grupos (CH_2) de colágeno; 1240 cm^{-1} vibración de estiramiento (v) asimétrica (as) de grupos (PO_2) del DNA; 1083 cm^{-1} vibración de estiramiento (v) simétrica (s) de grupos (PO_2) del DNA; 970 cm^{-1} vibración de estiramiento (v) de (C-C) del esqueleto de DNA. **C y D.** Espectro de segunda derivada. 1240 cm^{-1} vas (PO_2); 1083 cm^{-1} vs (PO_2); 970 cm^{-1} esqueleto del DNA v (C-C).

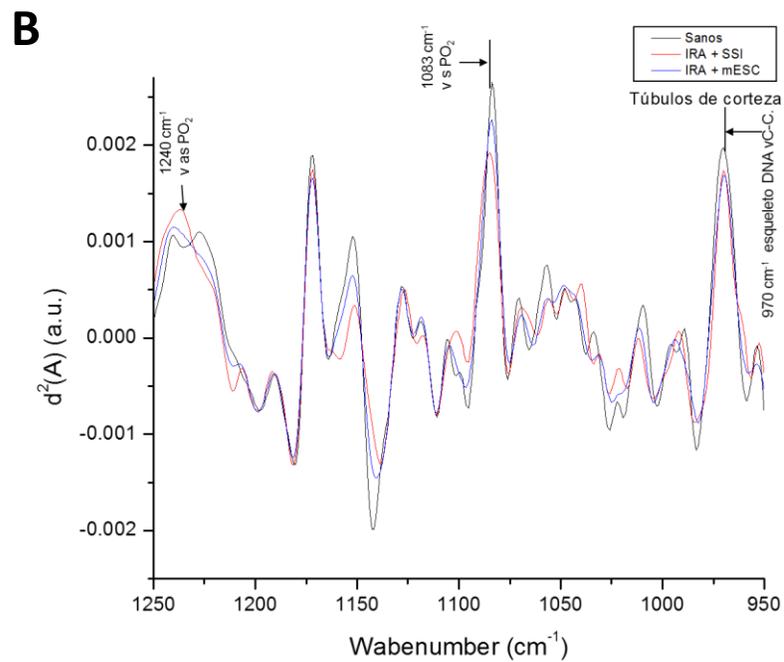
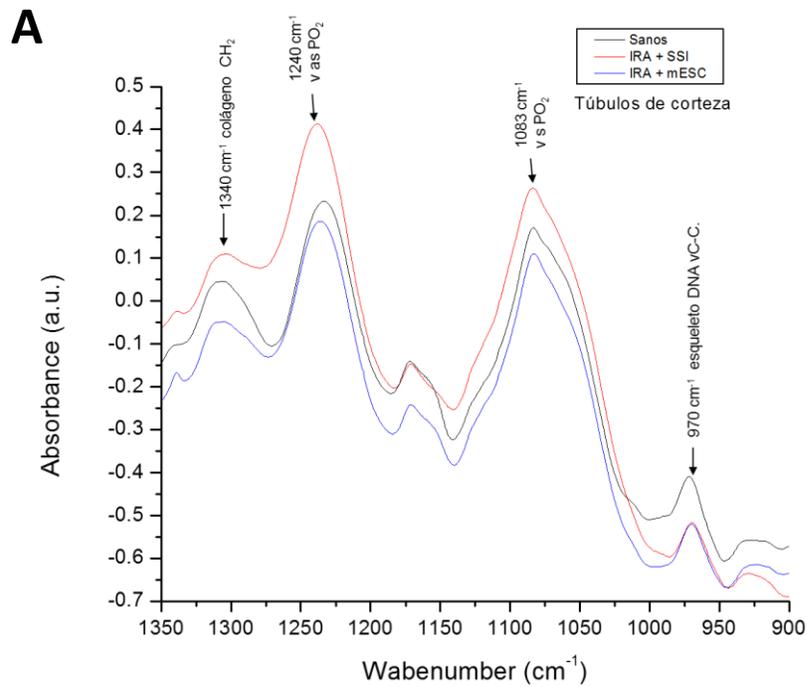


Figura 31. Espectro FTIR de riñón de las bandas asociadas a ácidos nucleicos y carbohidratos.

A. Espectro normalizado de túbulos de corteza. **B.** Espectro de segunda derivada de túbulos de corteza.

(N=25).

6.5 Expansión de MEF.

Para que las células madre embrionarias puedan crecer indefinidamente y mantener su estado indiferenciado, se utiliza en los cultivos una capa alimentadora formada por MEF y los cuales secretan LIF el cual tiene actividad bloqueadora de la diferenciación, lo que permite mantener la pluripotencialidad de las células madre. Los MEF son células planas, de núcleo redondo y central, con citoplasma escaso. Estas tienen prolongaciones citoplasmáticas lo que les confiere una forma estrellada, y les permite adherirse a la caja del medio de cultivo, formando una alfombra celular (Fig. 32).

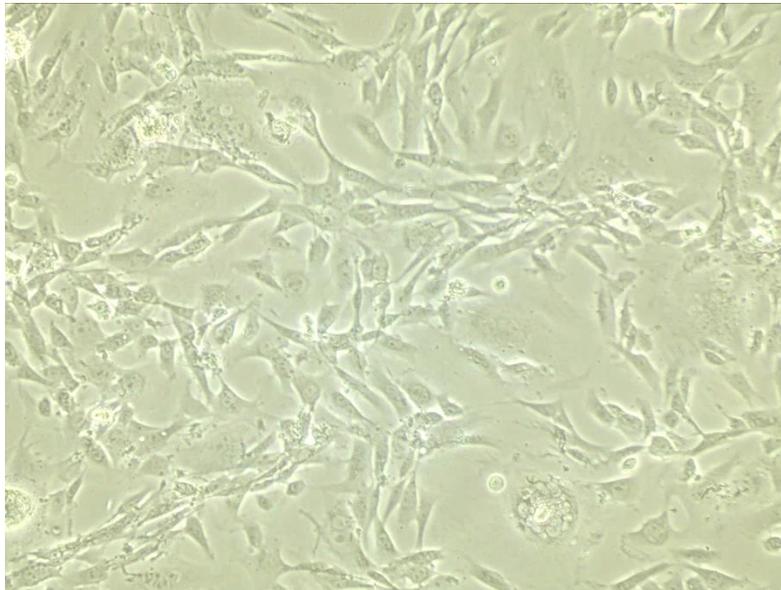


Figura 32. Cultivo celular de fibroblastos embrionarios de ratón. Células fusiformes adheridas a la placa de cultivo. (200 X).

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, y cambio de medio de cultivo cada tercer día.

6.5.1 Bloqueo del ciclo celular de los MEF.

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 con 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/cm² 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.

6.5.2 Expansión de las mESC.

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 (Fig. 33).

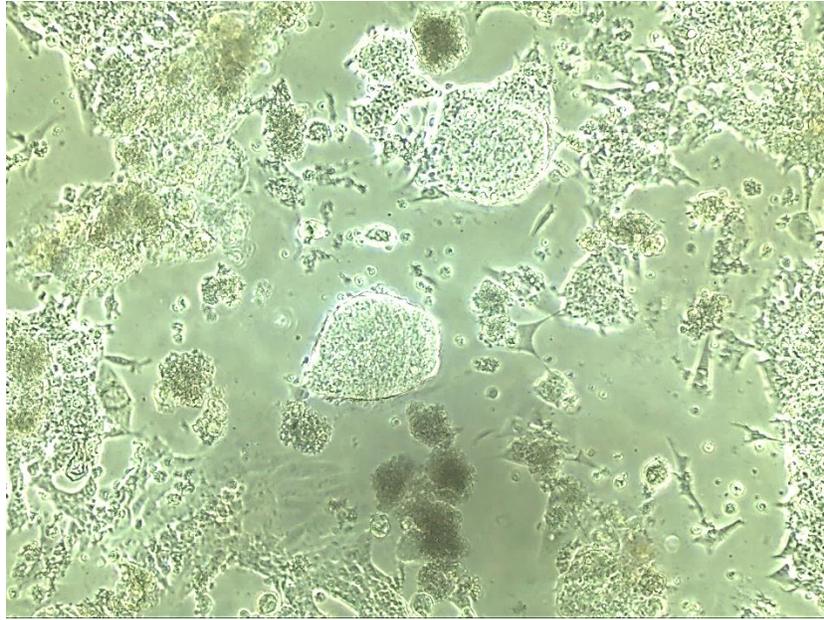


Figura 33. Cultivo celular de mESC. Se observan colonias asimétricas sobre la capa de fibroblastos, adheridas a la placa de cultivo. (20 X).

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 h.

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.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se empleó un modelo murino de IRA inducida con CDDP, para evaluar distintos efectos a nivel biomolecular de esta enfermedad, y así mismo, poder saber si el implante de mESC podría revertir dichas alteraciones biomoleculares.

Entre las funciones de los riñones destaca la de excreción de metabolitos de desecho, función que depende de la filtración glomerular, la reabsorción y secreción tubular. Uno de estos metabolitos de desecho es la creatinina, que es un producto secundario del metabolismo de la creatina que se encuentra en los músculos. La creatina se sintetiza en dos pasos en los riñones y en el hígado, a partir de arginina y glicina, y posteriormente es transportada a los músculos. Ahí puede ser fosforilada por la creatinasa para formar ADP y fosfato de creatina, esta reacción es reversible cuando se incrementa la demanda energética. La creatina y el fosfato de creatina son inestables desde el punto de vista químico, por lo que en una reacción colateral no enzimática estas sustancias pueden ser cicladas continuamente para formar creatinina; esta pasa a la sangre y en una cantidad constante que depende exclusivamente de la masa muscular, y es excretada con la orina (Koolman y Röhm 2012) mediante filtración glomerular, con un adicional 10 a 20% de creatinina secretada por los túbulos. Esta no experimenta procesos de reabsorción tubular (McClatchey, 2002).

Aproximadamente el 1.5% de la creatina total del cuerpo es degradada a creatinina cada día, y dadas sus características químicas que la hacen un

compuesto sumamente difusible, esta se elimina del organismo casi exclusivamente por filtración renal; por lo que su determinación en suero constituye un parámetro importante para el diagnóstico de diversas afecciones renales.

Takai y cols. (2015) reportan que los valores normales de creatinina en ratones son de 0.630 ± 0.097 mg/dL, mientras que Mata (2017) lo reporta de 0.77 mg/dL ± 0.14 . Comparando estos valores de referencia con lo obtenido antes de la IDR (Tabla 3), tanto el grupo control como el experimental se encontraban sanos antes de realizar el experimento. Posteriormente, se apreció un incremento por encima de los valores normales de creatinina en el grupo control, tal y como lo reporta Takai y cols. en el 2015 quienes observaron niveles de creatinina de 1.72 ± 0.37 mg/dL después de la IDR, mientras que Mata los reporta de 1.76 mg/dL ± 0.73 tres días después de administración de CDDP.

En cuanto al grupo tratado con mESC, los valores de creatinina disminuyeron en comparación al grupo tratado con SSI, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de creatinina de un grupo y otro. Sin embargo, estos resultados concuerdan con lo reportado por Mata, quien implantó mESC en un modelo murino de IRA inducida con CDDP. En este trabajo, en los ratones tratados con mESC se observaron valores de creatinina de 1.62 mg/dL ± 0.74 al día 3 después la IDR, mientras que al día 12 fueron de 1.17 mg/dL ± 0.38 .

Otro de los analitos medidos fue el ácido úrico, el cual es el principal producto final del metabolismo de las purinas, específicamente de los nucleósidos de adenosina y guanosina (McClatchey, 2002).

La única ruta efectiva para la excreción de ácido úrico, son los riñones. La excreción de este metabolito es compleja. Del ácido úrico filtrado, el 98 al 100% es activamente reabsorbido en la porción proximal de los túbulos contorneados, es secretado en la porción distal de los túbulos contorneados proximales, y finalmente activamente reabsorbido en los túbulos contorneados distales. Sólo del 6 al 12% del ácido úrico que originalmente fue filtrado es excretado en la orina.

El aumento de la concentración plasmática de ácido úrico se le denomina hiperuricemia, y es vista en distintas condiciones patológicas que pueden ser atribuidas a un incremento en la producción de ácido úrico, o bien, un decremento en la excreción renal que puede estar asociada con enfermedades renales crónicas o agudas (McClatchey, 2002).

No se han encontrado referencias sobre los niveles normales de este analito en ratones, sin embargo, los niveles de preinducción hacen pensar que este analito se encontraba en niveles normales en ambos grupos de estudio, ya que se aprecian muy similares entre sí. De igual forma que la creatinina, los niveles de ácido úrico mostraron una reducción en el grupo tratado con mESC en comparación al tratado con SSI, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de este analito entre un grupo y otro.

Recordando que uno de los objetivos tisulares del CDDP son los túbulos proximales, y que estos participan activamente en el metabolismo del ácido úrico, el hallar disminución de los niveles séricos de este metabolito representa un restablecimiento de la función de esta parte de la nefrona, y no sólo de esta, sino también del glomérulo en general, ya que de igual forma la creatinina se vio considerablemente reducida en sus niveles séricos en ratones implantados con mESC. Los cambios favorables en estos biomarcadores de daño renal como la creatinina y el ácido úrico, representan la efectividad de la terapia con mESC y abren la puerta a futuros tratamientos para enfermedades crónicas como estas, sin embargo, para el diagnóstico y monitorización de pacientes con estos padecimientos, es necesario ligar estos hallazgos con otras técnicas que permitan reforzar los resultados obtenidos, tales como las técnicas histológicas.

En relación con lo anterior, el compartimento tubulointersticial es afectado en todas las formas de enfermedad renal. El daño tubular o intersticial agudo asociado a diversas enfermedades puede manifestarse como insuficiencia renal aguda (Fogo *et al.*, 2005).

De acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud para las enfermedades tubulointersticiales, que considera la etiología, clínica y características histológicas, el cisplatino provoca Necrosis Tubular Aguda (NTA), que se diferencia de la Nefritis túbulo intersticial porque se presentan cambios tubulares prominentes con escaso infiltrado inflamatorio intersticial, tal y como se observa en las microfotografías de resultados.

Las microfotografías histológicas tomadas de las muestras de biopsia renal revelan lesiones variables a nivel tubular y glomerular en los ratones tratados con SSI.

A nivel tubular se aprecian características que sugieren NTA tóxica, donde se destaca presencia de infiltrado inflamatorio, inflamación tubular y taponamiento de la luz tubular secundaria a la descamación al día 4 después de la IDR (Fig. 21).

Al día 8 (Fig. 22) se percibe una zona de necrosis mucho más extensa y uniforme que al día 4, en este punto ya no se distingue la microarquitectura tubular típica, sin embargo, se presentan masas de células que "caen" a la luz de túbulos, denudación completa de algunos de ellos y casi taponamiento de sus luces secundario a la descamación.

De la misma forma 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 con el uso de CDDP.

En cuanto al grupo tratado con mESC, aunque también se observa obstrucción intratubular y presencia de infiltrado inflamatorio, se evidencia una microestructura renal más conservada en comparación al grupo control tratado con SSI. Sin embargo, un análisis ultraestructural de la microarquitectura tubular en ratones tratados con mESC revela la presencia de vacuolas citoplasmáticas al día 8 después de la IDR (Fig. 23). La aparición de estas pequeñas vacuolas intra citoplasmáticas puede corresponder probablemente a segmentos distendidos, separados o secuestrados del retículo endoplásmico. No obstante, esto representa

un cuadro de lesión no letal que se observa más frecuentemente en las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales del riñón (Kumar, 1997).

Los cambios morfológicos resultantes de una lesión no mortal de la célula se llaman degeneración o lesión celular reversible. En las células con lesión reversible se observan cambios morfológicos ultraestructurales, donde los atribuibles a alteraciones en la membrana plasmática se advierten en etapas tempranas de la lesión y reflejan trastornos de la regulación de iones y fluidos producidos por la pérdida de ATP. La lesión subletal puede identificarse por los cambios microscópicos de las células afectadas, entre los que se encuentra la presencia de vacuolas intracelulares, lo cual se denomina a su vez tumefacción turbia o degeneración hidrópica. La degeneración hidrópica es sencillamente una expresión de la tumefacción celular que manifiesta la acumulación intracelular de un mayor volumen de agua (Kumar, 1997).

El hallar evidencia histológica de degeneración hidrópica asociada a lesiones celulares reversibles, hace pensar que en los ratones que recibieron el implante de mESC, el proceso patológico de nefrotoxicidad del CDDP fue detenido en sus etapas tempranas, lo que representa a su vez la efectividad de los mecanismos de reparación asociados a estas células.

En cuanto a las alteraciones glomerulares, se distinguen lesiones en la punta del polo urinario presentes a los días 4 y 8 después de la IDR, colapso del penacho glomerular y glomeruloesclerosis apreciables en el grupo control tratado con SSI (Figs. 21 y 22). La glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFyS) es una enfermedad caracterizada morfológicamente por segmentos de esclerosis en

algunos glomérulos. Los glomérulos sin lesiones pueden presentar alteraciones de la celularidad mesangial (Nair, 2006). En relación con esto, se aprecian glomérulos con microarquitectura conservada, pero con un alto grado de celularidad en la figura 22 de los ratones que recibieron el implante de mESC.

Se sabe que una de las variantes de GEFyS en base a la morfología, es la llamada GEFyS variante celular, donde las células que proliferan son endoteliales, mesangiales y células leucocitarias, pero cabe mencionar que no existe una clasificación etiológica que asocie el uso del CDDP con la presencia de GEFyS y en la clasificación morfológica como variante celular aún existen controversias en su definición y clasificación, y tampoco las asocian con el uso del CDDP (D'agati *et al.*, 2004). Sin embargo, resulta interesante analizar el hecho de haber encontrado hiper celularidad mesangial solamente en los ratones que recibieron el implante de mESC, porque esto probablemente pueda estar asociado con eventos de regeneración celular y restablecimiento de la función promovidos por el uso de estas células, lo que puede ser contrastable con el hecho de haber encontrado niveles menores de creatinina y ácido úrico en este grupo de ratones, en comparación a los que fueron tratados con SSI. Esto se compara con lo que reporta Mata (2017) quien vio un restablecimiento de la función renal e histología, en ratones implantados con mESC.

En cuanto al mecanismo de acción del CDDP, se sabe que este antineoplásico ejerce su nefrotoxicidad a nivel túbulo proximales por diversos motivos: los transportadores para este antineoplásico Ctr1 y OCT2, se localizan en la membrana basolateral del túbulo proximal y en el segmento S3 de los túbulo

proximales, respectivamente (Miller *et al.* 2010; Ludwig *et al.*, 2004); se ha encontrado que la GGT y algunas aminopeptidasas se expresan en la superficie de las células del túbulo proximal y son necesarias para la metabolización del CDDP (Miller *et al.* 2010); y por último, la sensibilidad de las células al CDDP parece estar en correlación con la densidad mitocondrial y el potencial de la membrana mitocondrial. Lo que explica la sensibilidad del túbulo proximal renal a la toxicidad del CDDP, ya que este segmento presenta una de las más altas densidades de mitocondrias en el riñón (Miller *et al.*, 2010). Es por esto por lo que resulta de gran interés conocer los principales resultados a nivel de túbulos de corteza (TC) o túbulos proximales, para las técnicas empleadas en este proyecto, entre las que se encuentra la inmunohistoquímica para p53.

En respuesta al daño al DNA, p53 es un mediador importante de la muerte celular inducida por CDDP, provocando detención del ciclo celular y/o la apoptosis, así como activación de oncogenes e hipoxia (Miller *et al.*, 2010).

Existe una gran cantidad de información relacionada con la expresión de esta proteína proapoptótica y la nefrotoxicidad del CDDP. Por citar algunos ejemplos, Cummings y Schnellmann en 2002, demostraron por inmunofluorescencia el aumento en la expresión nuclear de p53 en células del túbulo proximal de conejo, 4 h después del tratamiento con CDDP; Jiang y cols en el 2004 emplearon cultivos de células tubulares proximales de rata, donde quedó demostrado que p53 se fosforila rápidamente y se regula positivamente después del tratamiento con CDDP, antes del inicio de la apoptosis celular.

En el 2007 un estudio realizado por Wei y cols. en ratones C57BL/6, demostró por inmunanálisis un aumento de la proteína p53 en muestras de corteza y médula

renal después del tratamiento con CDDP. El aumento comenzó a partir del día 2 y se intensificó al día 3.

Los resultados de este proyecto revelan hallazgos que coinciden con los estudios citados anteriormente, ya que se encontró una gran expresión de p53 en túbulos proximales y glomérulos de ratones con IRA, mostrando una marcada expresión de esta proteína al día 4 (Fig. 25), que se intensificó hasta el día 8 post-IDR (Fig. 26). Así mismo, tal y como lo reportan Wei y cols., paralelamente a la acumulación de p53 se apreció el desarrollo de lesión renal aguda, hecho que en este proyecto fue evidenciado con técnicas histológicas y análisis de sangre, que en comparación con ratones tratados con SSI, los ratones tratados con mESC mostraron una mejor función renal y menos daño tisular.

Entre los genes diana de p53 que contienen promotores con sitios de unión a esta proteína, y por los cuales p53 desencadena sus efectos apoptóticos en la nefrotoxicidad inducida por CDDP, se encuentra PUMA (Jiang *et al.*, 2006), PIDD (Seth *et al.*, 2005), algunas caspasas como la 6 y la 7 (Yang *et al.*, 2007), p21 (Megyesi *et al.*, 1996; Megyesi *et al.*, 1998), entre otros. Con lo que se explica que a partir de la expresión de p53, se generen efectos dañinos para los riñones, disminuyendo así la funcionalidad de estos órganos.

Con lo que respecta a los resultados obtenidos por microespectroscopia FTIR, estos permitieron analizar cambios en la composición bioquímica de cortes de tejido renal. Entre los cambios observados, se encuentran los relacionados con bandas asociadas a lípidos y esteres de colesterol, específicamente con la vibración del grupo ester C=O a 1740 cm^{-1} (Davis *et al.*, 2010; Lindon *et al.*, 2017), donde se observan cambios en la intensidad de las bandas, haciendo notar, que

principalmente en túbulos de corteza renal (TC) (Fig. 29 A), aumentó la cantidad de lípidos en muestras de ratones con IRA, en comparación con muestras de ratones sanos y tratados con mESC, mientras que en los espectros de glomérulos (G) y túbulos de médula (TM) no se hallaron grandes cambios (Fig. 28 A y B).

Estudios clínicos y experimentales, sugieren que existe relación entre la progresión del daño renal y las alteraciones en el metabolismo lipídico, relacionado principalmente con lipoproteínas y triglicéridos (Lacquaniti *et al.*, 2010).

El aumento de los niveles de triglicéridos en plasma también puede ser explicado por aumentos significativos en los niveles plasmáticos de ApoC-III que es un potente inhibidor de la lipoprotein lipasa y es responsable de la degradación de las partículas ricas en triglicéridos, provenientes de quilomicrones formados en el intestino (Lacquaniti *et al.*, 2010).

De hecho, la desregulación de varios genes, junto con los cambios en la composición de partículas de lipoproteínas y el efecto inhibidor directo de varias "toxinas" urémicas sobre las enzimas implicadas en el metabolismo de los lípidos, representan los mecanismos fisiopatológicos más importantes que subyacen al desarrollo de hipertrigliceridemia en falla renal (Mori *et al.*, 2007).

Así mismo, reducciones en las concentraciones plasmáticas de apoproteína (ApoA) I y II, que son componentes obligatorios de la partícula HDL, se cree que juegan un gran papel en determinar los niveles bajos de colesterol proveniente de HDL. En pacientes con IR se ha demostrado que se ha reducido la expresión

genética de estas apoproteínas en los sitios de producción de HDL en el hígado (Vaziri *et al.*, 1999).

Otro factor que contribuye a los bajos niveles de HDL es el estado inflamatorio profundo de estos pacientes, debido a que la inflamación produce una disminución de los niveles de albúmina. La albúmina es un transportador de colesterol libre desde los tejidos periféricos hasta las HDL, y una reducción en la albúmina puede contribuir, por lo tanto, a reducir los niveles de HDL (Vaziri *et al.*, 2006).

Así mismo, se ha observado que existe un aumento en la actividad de la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) (que es la enzima responsable de la esterificación del colesterol libre en partículas HDL), así como aumento de la actividad de la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP) (la cual cataliza la transferencia de ésteres de colesterol de HDL a VLDL, y de triacilgliceroles de VLDL a HDL) lo que contribuye en conjunto a reducir la concentración sérica de colesterol proveniente de HDL (Guarnieri *et al.*, 1978; Kimura *et al.*, 2003).

De tal manera, que existe un patrón de anormalidades que puede ser atribuido a diversos mecanismos patogénicos. En primer lugar, la pérdida de proteína urinaria estimula una mayor síntesis de LDL (Vaziri *et al.*, 2003).

Finalmente, este mecanismo compensatorio intrahepático determina el aumento de los niveles sanguíneos de LDL típico del SN (Lacquaniti *et al.*, 2010).

Numerosos estudios en animales han demostrado que las anomalías en lipoproteínas parecen causar una lesión renal primaria y pueden contribuir a la

progresión de la enfermedad renal, independientemente de su etiología (Dalrymple, 2008).

La hiperlipidemia puede acelerar la progresión de la enfermedad renal por varios mecanismos. La reabsorción de ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol contenidos en las proteínas filtradas (albúmina y lipoproteínas) por las células epiteliales tubulares puede estimular la inflamación túbulointersticial y la lesión tisular (Brunskill, 2004), como fue evidenciado en el análisis histopatológico.

La acumulación de lipoproteínas en el mesangio glomerular puede promover la producción de matriz y glomeruloesclerosis con lipoproteínas nativas y oxidadas, particularmente LDL, que estimulan la producción de proteínas de la matriz por células mesangiales y promueven la generación de citoquinas proinflamatorias, que pueden conducir al reclutamiento y activación de células circulantes y macrófagos residentes (Vaziri, 2006). Esto explicaría los cambios observados en las bandas Amida I y Amida II a 1660 y 1550 cm^{-1} respectivamente, que se aprecian con mayor intensidad en ratones con IRA, que en ratones sanos. Estas bandas están asociadas con la vibración de flexión del grupo N-H a 1550 cm^{-1} y de estiramiento del grupo C=O a 1660 cm^{-1} de las amidas que conforman el enlace peptídico que une a las unidades aminoacídicas de las proteínas (Davis *et al.*, 2010; Lindon *et al.*, 2017).

Según lo reportado por Krilov y cols. en el 2009, quienes hicieron un estudio comparativo de bandas asociadas específicamente con lipoproteínas, observaron que en los espectros asociados con lipoproteínas se debe de apreciar un aumento

en la intensidad de bandas de proteínas a la par de un aumento en la intensidad de bandas de lípidos, tal y como se aprecia en los espectros correspondientes a TC de ratones con IRA tratados con SSI (Fig. 29 A). Sin embargo, cabe mencionar que en los ratones tratados con mESC la intensidad en las bandas Amida I y II aumentaron aún más en comparación a los ratones sanos y con IRA, pero disminuyeron los lípidos, por lo que se concluye que no es posible ligar exclusivamente los cambios espectroscópicos asociados a proteínas, con las alteraciones en el metabolismo lipoproteico.

Una de las posibles razones de la disminución de proteínas en ratones sanos y con IRA, en comparación a los tratados con mESC, es que en la IRA existe un hipercatabolismo proteico asociado a diversos factores, tales como la presencia de toxinas urémicas, aumento de la secreción de hormonas catabólicas (catecolaminas, glucagón, glucocorticoides), acidosis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (activación de la red de citoquinas), liberación de proteasas, entre otras (Druml, 2005).

En un estudio realizado por Wei y cols. en el 2014, con el uso de técnicas como cromatografía de gases, espectrometría de masas y cromatografía líquida, realizaron el perfil metabólico del plasma, corteza y médula renal, de ratones con daño isquémico, (la cual es una enfermedad clínico-patológica que junto con la nefrotoxicidad, provoca IRA intrínseca) donde hallaron un aumento de productos secundarios del catabolismo de aminoácidos en corteza renal y plasma. Esto puede explicar la disminución de bandas asociadas con proteínas en ratones con IRA. Así mismo, se sabe que en respuesta al daño al DNA las células cuentan con

mecanismos complejos que vigilan la integridad del material genético activando vías de reparación, que requieren múltiples proteínas sensoras, transductoras y efectoras, en una red de interacción de diferentes vías de señalización (Tafurt y Marin, 2014). Y en este sentido, las células madre podrían estar activando dichas vías de reparación provocando el aumento de proteínas en este grupo experimental, que en comparación al grupo de los sanos, que tienen los niveles más bajos de intensidad en bandas asociadas con proteínas, no existe la necesidad de activar dichos mecanismos de reparación ya que estos no tienen daño renal. Por lo tanto, la mayor presencia de estas biomoléculas en ratones tratados con mESC, puede representar más que un restablecimiento del metabolismo proteínico, una potenciación de la función renal.

Por otra parte, con los espectros de segunda derivada es posible realizar la identificación específica de picos de absorción que no se encuentran bien resueltos en los gráficos normalizados, o bien que no aparecen, lo que significa un aumento en la especificidad en el análisis de los picos de absorción para ciertas moléculas del tejido. Dichos espectros, permitieron el análisis la estructura secundaria de las proteínas, donde se aprecia que tanto en TM, G (Fig. 28 C y D) y TC (Fig. 29 B) pero más significativamente en TC y G, existen cambios en la intensidad de la banda a 1655 cm^{-1} la cual está asociada a hélices de proteínas (Davis *et al.*, 2010; Lindon *et al.*, 2017), siendo esta banda mucho más intensa en muestras de ratones tratados con mESC. Es bien sabido que de las estructuras secundarias que forman las proteínas, las α hélices son las más estables debido a la formación de puentes de hidrógeno que se forman entre los átomos de oxígeno

del grupo carbonilo de un aminoácido, y el átomo de hidrógeno del grupo amino de otro aminoácido; el hecho de encontrar que disminuyó la intensidad de la banda asociada a esta estructura proteínica en muestras de ratones enfermos, puede estar relacionado con una desorganización de la estructura básica de estas biomoléculas.

Por otro lado, Liu y cols. en el 2001 estudiaron distintas líneas celulares en las cuales fue inducida la apoptosis, notando que a medida que aumenta el porcentaje de apoptosis, disminuye la cantidad de hojas β en relación con el aumento de la estructura desordenada, aumenta el contenido de lípidos y disminuye la cantidad de DNA detectable. Lo que es comparable con nuestros resultados, ya que en ratones con IRA se aprecia un decremento de la banda a 1638 cm^{-1} asociada con hojas β , y aumento de la estructura desordenada a 1650 cm^{-1} en TM y G, en comparación con ratones sanos y tratados con mESC. Tales resultados coinciden con lo discutido anteriormente sobre el aumento en la expresión de p53 en ratones con IRA, y como se redujo dicha expresión en ratones tratados con mESC, con lo cual queda evidenciado por dos técnicas distintas, la efectividad del tratamiento con células madre y los cambios biomoleculares que se aprecian en esta enfermedad.

Así mismo, a 1660 cm^{-1} se halló una banda que se presenta de forma exclusiva en el grupo de los ratones con IRA, y que algunos autores asocian con una estructura llamada Hélice 3_{10} (Kong *et al.*, 2007). Este tipo de estructura secundaria se denomina con este nombre, porque contiene 3 restos de aminoácidos por vuelta de hélice y 10 átomos encerrados en el anillo.

Corresponde a los ángulos $\Phi = -49^\circ$ y $\Psi = -26^\circ$. Al igual que la hélice α , las cadenas laterales de los aminoácidos sobresalen hacia el exterior del esqueleto helicoidal. Su estabilidad se debe a la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo carbonilo y el grupo amida del enlace peptídico de los restos i e $i+3$, respectivamente. Son menos estables que las α hélices, y muy raras de encontrar. Presentan un empaquetamiento azimutal de las cadenas laterales (en la misma vertical) menos favorable que el empaquetamiento alternado que se observa en las hélices α . Además, los puentes de hidrógeno en este tipo de estructura secundaria no se encuentran perfectamente alineados, con lo que la fuerza del enlace es menor (Choudhuri, 2014).

La hélice es dextrógira (avanza en el sentido de las agujas del reloj vista desde arriba). Cada residuo gira 120° con respecto al anterior y se desplaza 0,25 nm con respecto al residuo anterior. Son necesarios 3 residuos y 0,6 nm, para dar una vuelta completa (Choudhuri, 2014). Se ha demostrado, que las hélices 3_{10} están presentes principalmente en un gran número de proteínas transmembranales, con funciones muy diversas entre sí (Vieira *et al.*, 2010), pero aún se sabe muy poco sobre las propiedades estructurales y funcionales de estas hélices, sin embargo, como se hizo notar anteriormente, esta banda solamente aparece en el grupo de ratones enfermos en los espectros de G y TC, y no aparece bien resuelta en los ratones tratados con mESC, por lo que es posible que estemos ante un marcador espectroscópico de daño tisular.

En cuanto a la región espectroscópica en la huella biológica de ácidos nucleicos y carbohidratos, en los gráficos tanto de TM, como de G (Fig. 30 A y B). y TC (Fig.

31 A) se observó desplazamiento y cambio en la intensidad de tres bandas relacionadas con grupos fosfato; una que se encuentra en 1083 cm^{-1} y está relacionada con la vibración de estiramiento simétrico de grupos fosfato ($\text{P}=\text{O}_2$) de ácidos nucleicos, otra a 1244 cm^{-1} asociada con vibraciones de estiramiento asimétrico del mismo grupo funcional de ácidos nucleicos, y por último la banda localizada en 970 cm^{-1} asociada con vibraciones de estiramiento de grupos (C-C) del esqueleto de DNA (Whelan *et al.*, 2011; Davis *et al.*, 2010; Lindon *et al.*, 2017).

Los cambios en las bandas de absorción en 1244 , 1083 y 970 cm^{-1} que también contienen contribuciones de los carbohidratos en los ácidos nucleicos debido de las vibraciones de estiramiento de los grupos C-O-C y C-C del esqueleto de ribosa del DNA, pueden indicar cambios en el DNA o RNA resultantes de la descomposición del material genético durante la apoptosis y/o un contenido de RNA modificado debido a la sobreexpresión o desregulación de los genes (Whelan *et al.*, 2011).

En los espectros normalizados y segunda derivada (Fig. 31 B; 30 C y D), de forma general se aprecia un aumento en la intensidad de las bandas asociadas de grupos fosfato y grupos (C-C) en ratones con IRA, en comparación con los ratones sanos y los tratados con mESC. Diversos autores señalan, que los grupos fosfato y los grupos (C-C) del esqueleto del DNA, representan marcadores espectroscópicos relacionados con la conformación del DNA, que bien puede ser la A o la B. Con base en estos hallazgos, típicamente la banda de los grupos fosfato asimétricos se encuentra en torno a $1224 (\pm 2\text{ cm}^{-1})$ – $1235 (\pm 2\text{ cm}^{-1})$, mientras que la de grupos (C-C) del DNA se encuentra normalmente a 970 cm^{-1}

en la forma B del DNA, sin embargo, un desplazamiento de la banda de los grupos asPO_2 a 1238 cm^{-1} , y de grupos (C-C) a $965 (\pm 4 \text{ cm}^{-1})$, tal y como se observa en los gráficos normalizados de G, TC y TM, se relaciona con un cambio a la forma A del DNA (Whelan *et al.*, 2011).

Se sabe que la forma B es la más estable, ya que en ese estado el DNA se encuentra asociado a proteínas histonas, y es la principal estructura secundaria del DNA en estados fisiológicos normales; un cambio a la forma helical A, implicaría una mayor inestabilidad del DNA. (Walsh *et al.*, 2008). Por otra parte, la forma A también se considera una forma intermedia entre el DNA-B, y los híbridos de DNA-RNA, o dicho de otra manera, la forma A es propia de los híbridos de DNA-RNA (Ami *et al.*, 2013; Nadel *et al.*, 2015). Los híbridos de DNA-RNA se asocian cada vez más con enfermedades humanas, tales como la esclerosis lateral amiotrófica (Chen *et al.*, 2004), el síndrome de Aicardi-Goutières (Günther *et al.*, 2015), síndrome del X frágil (Loomis *et al.*, 2014) y con una gran preocupación de que su presencia predispone también a un locus a rotura cromosómica (Sollier *et al.*, 2014). Por lo que no es de extrañarse, que se encuentren bandas asociadas a estas estructuras en ratones con IRA. No obstante, la presencia de DNA-A no solamente se asocia con estados de enfermedad, sino también con el grado de hidratación del DNA, donde mientras más deshidratado se encuentre, más fácilmente adoptara la forma A (Whelan *et al.*, 2011; Wood 2015). En relación a esto, otro marcador del grado de deshidratación del DNA es la vibración de estiramiento simétrico de los grupos fosfato en torno a 1083 cm^{-1} , la cual según la literatura, no presenta

desplazamiento en la forma A o B del DNA, sin embargo, en la forma A tiene una reducción significativa de la intensidad de la banda (Whelan *et al.*, 2011), y esta reducción no se aprecia en espectros de ratones con IRA como era de esperarse, por lo que probablemente el DNA se encuentre en la forma B en las muestras de estos ratones. Este hecho es comparable con lo que reporta Jangir y cols. en el 2010, quienes analizaron el espectro de soluciones de DNA, sometidas a diferentes concentraciones de carboplatino, encontrando que el DNA se mantuvo principalmente en la forma B.

De tal manera, se concluye que se tiene una combinación de DNA en la forma A y B, tanto en TM, como en G y TC, que bien puede ser debida al grado de hidratación de la muestra, o a los otros factores discutidos anteriormente.

Estas diferencias espectrales demuestran claramente los cambios estructurales a nivel bioquímico y molecular, propios de la progresión de la enfermedad renal, y sientan las bases para afirmar que el FTIR, es una poderosa técnica de diagnóstico en el área de ciencias de la salud.

En cuanto a la banda localizada a 1340 cm^{-1} , diversos autores la han asociado con la vibración de grupos (CH_2) de colágeno (Jackson *et al.*, 1995; Camacho *et al.*, 1995; Rieppo *et al.*, 2012; Wahlstrom, 2011). Es bien sabido que en enfermedades renales es posible hallar un aumento de la deposición de proteínas de matriz extracelular a nivel glomerular (colágeno tipos I, IV, V y VI), induciendo así la expansión mesangial y el engrosamiento de la membrana basal glomerular, generando glomeruloesclerosis (Schena, 2005). Es por ello, que resulta importante

analizar esta banda asociada a colágeno, ya que observó un aumento en la intensidad de esta banda en ratones enfermos, y aún en ratones sanos, pero hubo una disminución en el grupo de ratones tratados con mESC, tanto a nivel de G, como de TM y TC. La glomeruloesclerosis quedó evidenciada además en las microfotografías de tinciones histológicas con H-E, que fueron anteriormente analizadas.

En lo que corresponde a las líneas celulares empleadas en este proyecto, el protocolo de cultivo se realizó acorde a los trabajos reportados por Smith y cols. (1988) y Williams y cols. (1988), que utilizaron para sus cultivos de mESC la línea celular de MEF STO, empleando además LIF recombinante en combinación con SFB (*serum fetal bovine*).

La morfología observada en los fibroblastos cultivados durante este proyecto correspondía a la que reporta Keira y cols. en el 2004, observando células fusiformes adheridas a la caja, con prolongaciones citoplasmáticas y núcleo ovalado, comprobando de esta forma que el cultivo estaba bien realizado, ya que se conservaban las características propias de la línea celular (Fig. 32). Shamblott y cols. (1998) reportaron el uso de esta línea de fibroblastos como células alimentadoras para el cultivo de células germinales embrionarias, debido a que son MEF inmortales que producen LIF (Park *et al.*, 2004), el cual es una citocina de la familia de la interleucina 6 que inhibe la diferenciación celular (Park *et al.*, 2003).

Para usar MEF STO como células alimentadoras y aprovechar sus propiedades, es esencial detener su proliferación para que no crezcan demasiado y compitan con las ESC por el aprovechamiento de nutrientes, y que a su vez contribuyan al desarrollo de las ESC. Para este fin se utiliza la mitomicina C, que es un antibiótico antitumoral que permite el arresto del ciclo de celular de los MEF, debido a que es un agente alquilante que forma aductos en el DNA, con alta eficiencia y especificidad para la secuencia CDDPG, deteniendo así el proceso transcripcional de estas células (Tomasz, 1995).

Realizado el arresto celular de la monocapa de MEF, se procedió a sembrar las mESC. En cuanto a sus características morfológicas, estas se observaron con forma redondeada, núcleos grandes y nucléolos prominentes; comenzaron a formar colonias alrededor del 3er día después de haberlas sembrado, observándose colonias de contornos y tamaño irregulares (colonias asincrónicas) con una alta tasa de proliferación (Fig. 33). Dichas características, son propias de esta línea celular en estado pluripotencial e indiferenciado, tal y como lo reportan Kim y cols. (2012); Park y cols. (2004) y Park y cols. (2015). Estas células son extraídas a partir de la masa celular interna de blastocistos preimplantados, y son células pluripotentes con capacidad de proliferación a largo plazo en un estado de indiferenciación (Park *et al.*, 2004), lo cual fue observado a lo largo del proceso de cultivo en este proyecto (Fig. 33).

Las mESC fueron probadas en un modelo murino de IRA que fue inducida con CDDP. Se sabe que uno de los objetivos celulares de este antineoplásico es el DNA nuclear, donde su mecanismo de genotoxicidad consiste en la formación de

enlaces cruzados intracatenarios principalmente, lo que desencadena la aparición de aductos y consecuentemente la detención de la síntesis y replicación del DNA (Wang *et al.*, 2005).

Como se ha discutido previamente en este trabajo, el implante de mESC tuvo efectos favorables para la restauración del estado de salud en ratones con IRA, debido a que estas son capaces de diferenciar a todos los tipos de células corporales y linajes derivados de las tres capas germinales embrionarias, donde las células renales se derivan de la capa germinal del mesodermo (Sachinidis *et al.*, 2003).

Sorprendentemente, la mejora en el estado de salud de los ratones pudo ser evidenciada por técnicas sumamente distintas entre sí, cuyos resultados robustecen significativamente la investigación.

Como antecedentes a este trabajo, van Koppen y su equipo (2012), lograron reestablecer la función renal en ratas con insuficiencia renal crónica, utilizando células madre mesenquimales humanas; así mismo Chade y cols. (2009), demostraron que el uso de células progenitoras endoteliales restauran la función renal en el modelo experimental de enfermedad renovascular crónica.

No obstante, para entender los posibles mecanismos que dan explicación a estos resultados, es necesario analizar los hallazgos obtenidos por Lee y cols. (2010). Ellos insertaron células progenitoras renales de ratón (*MKPC*, por sus siglas en inglés) en ratones con lesión aguda isquémica, observando que estas aceleraban la regeneración renal y formaban conglomerados alrededor de los capilares, lo que pudo haber sido útil para suministrar más oxígeno y/o moléculas regenerativas

para la reparación de los riñones. Esto plantea la posibilidad de que las células madre reconozcan el sitio de daño, y actúen de forma específica reparando y sustituyendo a las células dañadas mediante efectos paracrinos, como lo implica su expresión de varios factores de crecimiento como *epidermal growth factor* (EGF), *hepatocyte growth factor* (HGF) o *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), todos conocidos por mejorar la función renal en la insuficiencia renal aguda, mediante sus acciones antiapoptóticas y mitogénicas (Togel *et al.* 2005).

Conjuntamente, estas acciones paracrinas aún no bien definidas, dan como resultado la regulación negativa renal de citoquinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α IFN- γ , y la regulación positiva de la IL-10 antiinflamatoria, así como bFGF, TGF- α y Bcl-2 (Togel *et al.* 2005).

A pesar de que muchos estudios han comprobado de diversas formas que el mecanismo de acción de las células madre es de tipo paracrino, dado su estado de indiferenciación, existen también otros que demuestran que estas células, influenciadas por factores nefrogénicos (o de cualquier otro tipo), son capaces de diferenciar en células somáticas adultas, tal es el caso de Vázquez-Zapién y cols, que en el 2016 lograron la diferenciación de ESC en células pancreáticas *in vitro*, y Mata y cols, quienes en el 2017 diferenciaron ESC en células renales *in vitro*. Tales resultados apuntan a que la diferenciación de células madre, está altamente influenciada por los factores propios en el medio, y que sus propiedades regenerativas no deben ser atribuidas solamente a los efectos paracrinos que pudieran tener.

Por otro lado, se debe de tomar en cuenta que las células epiteliales tubulares que sobreviven al daño, secretan factores de crecimiento que podrían interactuar con células residentes y células madre renales y extrarenales, acelerando los mecanismos de reparación tubular (Flaquer *et al.*, 2010). De igual manera, estudios recientes sugieren que el sistema progenitor renal está presente en los túbulos, el intersticio y los glomérulos del riñón adulto y que este funciona como el principal impulsor de la respuesta regenerativa del riñón después de ocurrida la lesión (Maeshima *et al.*, 2014); que durante la recuperación de la lesión por isquemia/reperfusión, las células epiteliales tubulares supervivientes se desdiferencian y proliferan, eventualmente reemplazando las células epiteliales tubulares irreversiblemente dañadas y restaurando la integridad tubular (Bonventre, 2003) y más aún, otro grupo de investigadores identificó a la papila renal como un nicho de células madre en el riñón adulto (Oliver *et al.*, 2004), y se han identificado en humanos un subconjunto de progenitores renales CD24⁺ y CD133⁺ en la cápsula de Bowman (Sagrinati *et al.*, 2006).

Resulta importante discutir estas evidencias, ya que se podría pensar que los efectos regenerativos mostrados en este trabajo, no son precisamente debidos al implante de mESC, sino a los procesos de regeneración y desdiferenciación propios del tejido renal, sin embargo, como lo describen Jason y Lozcalso en su libro "*Harrison's Nephrology and Acid Base Disorders*", el curso de la IRA isquémica se caracteriza típicamente por cuatro fases: iniciación, extensión, mantenimiento y recuperación, donde en la fase de mantenimiento, se lleva a cabo la desdiferenciación de células renales, pero esta fase tiene lugar 1-2 semanas

después del daño. Y dado a que el modelo animal de este proyecto fue de una semana, se puede decir que se están evaluando exclusivamente los efectos del implante. Del mismo modo, Togel y cols. en el 2005 observaron una mejoría funcional y significativa en la IRA severa 24 horas después del implante de células madre mesenquimales, es decir, en un punto temporal que sería demasiado temprano, para que el reemplazo tubular ocurra por transdiferenciación tanto de las células madre administradas, como de las propias células renales.

8. CONCLUSIONES

Conforme a los resultados obtenidos durante este proyecto, el implante de mESC permitió observar cambios favorables en los niveles séricos de creatinina y ácido úrico, así mismo, se apreciaron datos de regeneración tisular renal, que fue evidenciada histopatológicamente, con una notable disminución de la NTA típica de la nefrotoxicidad del CDDP.

La inmunohistoquímica para p53 reveló resultados sin precedentes al evidenciar la disminución de esta proteína proapoptótica en ratones implantados con mESC en comparación con ratones con IRA, lo que se reflejó en el aumento de la funcionalidad renal.

Por último, la micro-espectroscopía FTIR reveló ser una herramienta poderosa en el área de ciencias de salud con alto potencial diagnóstico, ya que no solo permitió apreciar diferencias espectroscópicas entre los diferentes grupos de estudio, sino que también en este proyecto se pudo identificar un posible marcador espectroscópico de daño tisular que no había sido reportado con anterioridad.

9. PERSPECTIVAS

En resumen, aún no se tienen concretamente dilucidados los mecanismos de acción de las células madre. En cuanto a este proyecto, no se sabe con exactitud a que se atribuye la disminución de la expresión p53. Si bien las células madre son capaces de expresar factores de crecimientos tales como VEGF y HGF (Togel *et al.* 2005), que se ha comprobado que tienen efectos antiapoptóticos por la inhibición de proteínas como Bad y Bim, no se sabe que molécula o que mecanismo podría estar activándose para inhibir la apoptosis río arriba de p53. Se plantea la hipótesis de que el CDDP por su mecanismo de acción, sería capaz de inducir la activación de enzimas tales como la metil guanina metil transferasa (MGMT), que es una enzima implicada en los mecanismos de reparación directa del DNA, que se activan en presencia de aductos como los que forma el CDDP (Tafurt y Marin, 2014). Y en este sentido, las mESC podrían estar potenciando estos mecanismos de reparación que ayudarían a disminuir la expresión de p53. Por otro lado, la expresión de IGF por parte de las células madre (Togel *et al.* 2005), representa otro mecanismo más de reparación, ya que este factor de crecimiento se encuentra implicado en la vía de activación de mTOR, molécula que a su vez estimula el proceso de autofagia, clave para el desarrollo, crecimiento y homeostasis de células eucariotas.

Por lo tanto, resulta de gran importancia dilucidar los mecanismos moleculares precisos de acción de las mESC, ya que eso va a permitir a largo plazo evaluar la posibilidad de aplicar la terapia con células madre embrionarias a humanos, con la finalidad de aminorar los efectos de enfermedades crónico-degenerativas.

10. REFERENCIAS

- Ami, D., Mereghetti, P. y Doglia, S. (2013). Multivariate Analysis for Fourier Transform Infrared Spectra of Complex Biological. *Multivar. Anal. Manag. Eng. Sci.*
- Ami, D., Natalello, A., Zullini, A. y Doglia, S. (2004). Fourier transform infrared microspectroscopy as a new tool for nematode studies. *FEBS Lett*, 576:297–300.
- Baker, M., Trevisan, J., Bassan, P., *et al.* (2014). Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat protoc*, 9(8).
- Bonventre, J. (2003). “Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure,” *J Am Soc Nephrol*, 14(1):55–61.
- Bruce, S., Rea, R., Steptoe, A., Busslinger, M., y Bertram, J. (2007). In vitro differentiation of murine embryonic stem cells toward a renal Lineage. *Differentiation*, 75(5):337–349.
- Brunskill, N. (2004). Albumin signals the coming of age of proteinuric nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 15:504–505.
- Camacho, N., West, P., Torzilli, P. y Mendelsohn, R. (2001). FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage. *Biopolymers*, 62:1-8.
- Chade, A., Zhu, X., Lavi, R., Krier J., Pislaru, S., Simari, R., Napoli, C., Lerman, A., y Lerman, L. (2009). Endothelial progenitor cells restore renal

function in chronic experimental renovascular disease, *Circulation*, 119(4):547–557.

- Chen, Y., Bennett, C., Huynh, H., *et al.* (2004). DNA/RNA helicase gene mutations in a form of juvenile amyotrophic lateral sclerosis (ALS4) *Am J Hum Genet*, 74:1128–1135.
- Choudhuri, S. (2014). BIOINFORMATICS FOR BEGINNERS. Genes, Genomes, Molecular Evolution, Databases and Analytical Tools. Tokio, Japón: Academic Press Elsevier.
- Ciarimboli, G., Deuster, D., Knief, A., *et al.* (2010). Organic Cation Transporter 2 Mediates Cisplatin-Induced Oto- and Nephrotoxicity and Is a Target for Protective Interventions. *Am J Pathol*, 176(3):1169–1180.
- Cummings, B. y Schnellmann, R. (2002). Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways. *J Pharmacol Exp Ther*, 302 (1): 8-17.
- D'Agati, V., Fogo, A., Bruijn, J. y Jennette, J. (2004). Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis*, 43(2):368-82.
- Dalrymple, L. y Kaysen, G. (2008). The effect of lipoproteins on the development and progression of renal disease. *Am J Nephrol*, 28:723–731.
- Davis, R. y Mauer, L. (2010). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: A rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, (1):1582-1594.

- Diario Oficial de la federación. Órgano de Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. (2016).
- Díaz de León P., Briones J. y Olivares, A. (2013). Renal Insuficiencia renal aguda (IRA) y terapia de reemplazo renal temprano (TRR). *Rev. asoc. mex. med. crit y ter.*, 27(4):237-244.
- Druml, W. Nutrition and Metabolism in Acute Renal Failure. En Berl, T. y Bonventre (Ed.), J. *Atlas of Kidney Diseases*. Denver, USA: Kidney Atlas.
- Flaquer, M., Romagnani, P y Cruzado, J. (2010). Factores de crecimiento y regeneración renal. *Nefrol*, 30:385–93.
- Fogo, A. y Kashgarian M. (2005). *Diagnostic Atlas of Renal Pathology*. Elsevier, Philadelphia.
- Gaínza, J. (2012). Insuficiencia renal aguda. *Nefrología*, 7(1).
- Gajjar, K. Trevisan, J., Owens, G., Keating, P., Wood, N., Stringfellow, H., Martin, P y Martin F. (2013). Fourier-transform infrared spectroscopy coupled with a classification machine for the analysis of blood plasma or serum: a novel diagnostic approach for ovarian cancer. *Analyst*, 138:3917–3926.
- García, M., de la Cueva, L. y Delgado P. (2005). Actualización en Técnicas Continuas de Reemplazo Renal. *Enferm. Intensiva*.
- Gazi, E., Dwyer, J., Gardner, P., Ghanbari, S., Wade, A., Miyan, J., Lockyer, N., Vickerman, J., Clarke, N., Shanks, J., Scott, L., Hart, C y Brown M. (2010). Applications of Fourier transform infrared microspectroscopy in

studies of benign prostate and prostate cancer. A Pilot Study, *J Path*, 201(1):99–108.

- Gómez De Anda, F., Dorantes, L., Gallardo, T., Osorio, G., Calderón, G., Martínez, P y de-la-Rosa-Arana J. (2012). Determination of *Trichinella spiralis* in pig muscles using mid-Fourier transform infrared spectroscopy (MID-FTIR) with attenuated total reflectance (ATR) and soft independent modeling of class analogy (SIMCA). *Meat Sci*, 91:240–246.
- Guarnieri, G., Moracchiello, M., Campanacci, L., Ursini, F., Ferri, L., Valente, M. y Gregolin, C. (1978). Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) activity in chronic uremia. *Kidney Int Suppl*, 1978;8: 26–30.
- Günther, C., Kind, B., Reijns, M., *et al.* (2015). Defective removal of ribonucleotides from DNA promotes systemic autoimmunity. *J Clin Invest*, 125(1):413-24.
- Infrared Spectroscopy: Theory. (2002). University of Colorado, Department of Chemistry and Biochemistry.
- Jackson, M., Choo, L., Watson, P., Halliday, W., y Mantsch, H. (1995). Beware of connective tissue proteins: assignment and implications of collagen absorptions in infrared spectra of human tissues. *Biochim Biophys Acta*, 1270:1-6.
- Jangir, D., Tyagi, G., Mehrotra, R. y Kundu, S. (2010). Carboplatin interaction with calf-thymus DNA: A FTIR spectroscopic approach. *J Mol Struct*, 969(1-3):126–129.

- Jason, J. y Lozcalso, J. (2010). Harrison's Nephrology and Acid Base Disorders. New York: United States. Mc Graw-Hill.
- Jiang, M. y Dong, Z. (2008). Regulation and Pathological Role of p53 in Cisplatin Nephrotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*, 327(2):300-307.
- Jiang, M., Wei, Q., Wang, J., Du, Q., Yu, J., Zhang, L. y Dong, Z. (2006). Regulation of PUMA-alpha by p53 in cisplatin-induced renal cell apoptosis. *Oncogene*, 25: 4056-4066.
- Jiang, M., Yi, X., Hsu, S., Wang, C., y Dong, Z. (2004). Role of p53 in cisplatin-induced tubular cell apoptosis: dependence on p53 transcriptional activity. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287:1140-1147.
- Keira, S., Ferreira, L. y Gragnani, A. (2004). Experimental model for fibroblast culture. *Acta Cir Bras*, 19:11-15.
- Kim, D y Dressler, J. (2005). Nephrogenic Factors Promote Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Renal Epithelia. *J Am Soc Nephrol*, 16(12):3527-3534.
- Kim, E., Noh, E., Park, H., Park, M., Noh, E., Lee, J., Jeong, C., Lee, D., Riu, K. y Park, S. (2012). Establishment of bovine embryonic stem cell lines using a minimized feeder cell drop. *Cell Reprogram*, 14:520–529.
- Kimura, H., Miyazaki, R., Imura, T., Masunaga, S., Suzuki, S., Gejyo, F. y Yoshida, H. (2003). Hepatic lipase mutation may reduce vascular disease prevalence in hemodialysis patients with high CETP levels. *Kidney Int*, 64:1829–1837.

- Kong, J. y Yu, S. (2007). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochim Biophys Sin*, 39(8):549–559.
- Koolman, J. y Röhm, K. (2012). Bioquímica Humana. Texto y Atlas. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Krilov, D., Balarin, M., Kosović, M., Gamulin, O. y Brnjas-Kraljević, J. (2009) FT-IR spectroscopy of lipoproteins a comparative study. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 15;73(4):701-6.
- Kumar, V., Cotran, R. y Robbins, S. (1997). Patología Humana. McGrawHill-Interamericana.
- Lacquaniti, A., Bolignano, D., Donato, V., Bono, C., Fazio, MR. y Buemi, M. (2010). Alterations of lipid metabolism in chronic nephropathies: mechanisms, diagnosis and treatment. *Kidney Blood Press Res*, 33(2):100-10.
- Lamas, J. (2014). Medicina regenerativa aplicada al tratamiento de las patologías musculoesqueléticas. *Reumatol Clin*, 10(3):139–140.
- Lee, P., Lin H., Jiang S., Lu P., Chou K., Fang H., Chiou, Y. y Tang, M. (2010). Mouse kidney progenitor cells accelerate renal regeneration and prolong survival after ischemic injury. *Stem Cells*, 28:573–84.
- Lindon, J., Tranter, G. y Koppenaal, D. (2017). Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry. United Kingdom: Academic Press.
- Liu, K. y Mantsch, H. (2001). Quantitative determination of apoptosis on leukemia cells by infrared spectroscopy. *J Mol Struct*, 565,299 –304.

- Liu, M., Jia, Z., Sun, Y., Zhang, A., y Yang, T. (2016). A H2S Donor GYY4137 Exacerbates CisplatinInduced Nephrotoxicity in Mice. *Mediators Inflamm*, 2016:8145785. 84
- Llabjani, V., Malik, R., Trevisan, J., Hoti, V., Ukpebor, J., Shinwari, Z., Moeckel, C., Jones, K., Shore, R y Martin, F. (2012). Alterations in the infrared spectral signature of avian feathers reflect potential chemical exposure: A pilot study comparing two sites in Pakistan. *Enviroment Int*, 48:39–46.
- Lodén, M. y Maibach, H. (2012). Treatment of dry skin syndrome. Heidelberg, Alemania: Springer.
- Loomis, E., Sanz, L., Chedin, F. y Hagerman P. (2010). Transcription-associated R-loop formation across the human FMR1 CGG-repeat region. *PLoS Genet*, 10.
- Ludwig, T., Riethmüller, C., Gekle, M., Schwerdt, G. y Oberleithner, H. (2004). Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport. *Kidney Int*, 66(1):196–202.
- Maeshima, A., Nakasatomi, M. y Nojima, Y. (2014). “Regenerative medicine for the kidney: renotropic factors, renal stem/progenitor cells, and stem cell therapy,” *BioMed Res Int*, (2014)10.
- Mata, M. (2017). Obtención de células renales a partir de células madre embrionarias de ratón y su aplicación en un modelo murino con lesión renal. (Tesis doctoral). Instituto Politécnico Nacional, Centro De Investigación En Biotecnología Aplicada; Tlaxcala.

- Mata, M., Vazquez, G., Rojas, M., Sanchez, V., Perez, D. y Delgado, R. (2017). Morphological, molecular and FTIR spectroscopic analysis during the differentiation of kidney cells from pluripotent stem cells. *Biol res*, 50(14):12.
- McClatchey, K. (2002). Clinical laboratory medicine. China: Lippincott Williams and Wilkins.
- Megyesi, J., Safirstein, R. y Price, P. (1998). Induction of p21WAF1/CIP1/SDI1 in kidney tubule cells affects the course of cisplatin-induced acute renal failure. *J Clin Invest*, 101(4), 777–782.
- Megyesi, J., Udvarhelyi, N., Safirstein, R. y Price, P. (1996). The p53-independent activation of transcription of p21 WAF1/CIP1/SDI1 after acute renal failure. *Am J Physiol*, 271: 1211-1216.
- Méndez, D., Méndez, B., Tapia, T., Muñoz, A. y Aguilar, L. (2010). Epidemiología de la Insuficiencia Renal en México. *Dial Traspl*, 31(1):7-11.
- Miller, R., Tadagavadi, R., Ramesh, G., y Reeves, W. (2010). Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity. *Toxins*, 2(11):2490–2518.
- Mori, Y., Hirano, T., Nagashima, M., Shiraishi, Y., Fukui, T. y Adachi, M. (2007). Decreased peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression is associated with dyslipidemia in a rat model of chronic renal failure. *Metabolism*, 56:1714– 1718.
- Nadel, J., Athanasiadou, R., Lemetre, C., *et al.* (2015). RNA:DNA hybrids in the human genome have distinctive nucleotide characteristics, chromatin composition, and transcriptional relationships. *Epigenetics Chromatin*, 8, 46.

- Nair, R. (2006). Focal segmental glomerulosclerosis: cellular variant and beyond. *Kidney Int*, 70(10):1676-8.
- Oliver, J., Maarouf, O., Cheema, F., Martens, T. y Al-Awqati, Q. (2004). The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest*, 114(6):795-804.
- Park, J., Kim, S., Oh, E., Moon, S., Roh, S., Kim, C. y Yoon HS. (2003). Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biol Reprod*, 69:2007–2014.
- Park, S., Lee, Y., Lee, K., Shin, H., Cho, H., Chung, K., Kim, E. y Lim JH. (2004). Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers. *Human Reprod*, 19:676–684.
- Park, Y., Lee, S., Kim, E., Hyun, H., Shin, M., Son, Y. y Park, S. (2015). Effects of Feeder Cell Types on Culture of Mouse Embryonic Stem Cell In Vitro. *Dev Reprod*, 19(3):119–126.
- Rieppo, L., Saarakkala, S., Närhi, T., Helminen, H. J., Jurvelin, J. S., y Rieppo, J. (2012). Application of second derivative spectroscopy for increasing molecular specificity of fourier transform infrared spectroscopic imaging of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 20, 451–459.
- Sachinidis, A., Fleischmann, B., Kolossov, E., Wartenberg, M., Sauer, H., Hescheler, J. (2003). Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cardiovascular Res*, 58:278–291.

- Sagrinati, C., Netti, G., Mazzinghi, B., *et al.* (2006). Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol*, 17(9):2443-2456.
- Schena, F. y Gesualdo L. (2005). Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 16(1):30-33.
- Seth, R., Yang, C., Kaushal, V., Shah, S. y Kaushal, G. (2005). p53-dependent caspase-2 activation in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and its role in renal tubular epithelial cell injury. *J Biol Chem*, 280: 31230-31239.
- Shambloott, M., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E., Littlefield, J., Donovan, P., Bluementhal, P., Huggins, G. y Gearhart, J. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95,13726–13731.
- Smith, A., Heath, J., Donaldson, D., Wong, G., Moreau, J., Stahl, J. y Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 336, 688-690.
- Sollier, J., Stork, C., García-Rubio M., Paulsen, R.D., Aguilera, A. y Cimprich K.A. Transcription-coupled nucleotide excision repair factors promote R-loop-induced genome instability. *Mol Cell*,18; 56(6):777-85.
- Sreedhar, H., Varma, V., Nguyen, P., Davidson, B., Akkina, S., Guzman, G., Setty, S., Kajdacsy, A. y Walsh, M. (2015). High-definition Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopic Imaging of Human Tissue Sections towards Improving Pathology. *J of Visualized Experiments: JoVE*, (95):52332.

- Steele, D. (2017). *Infrared Spectroscopy: Theory* En Lindon, J., Tranter, G. y Koppenaal, D. (2017). *Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry* Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (1066-1071). United Kingdom: Academic Press.
- Sykova, E. y Forostyak, S. (2013). "Stem cells in regenerative medicine," *Laser Ther*, 22(2):87–92.
- Tafurt, Y. y Marin, M. (2014). Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN. *Revista Biosalud*, 13(2):95-110.
- Takai, N., Abe, K., Tonomura M., Imamoto, N., Fukumoto, K., Ito, M., Momosaki, S., Fujisawa, K., Morimoto, K., Takasu, N. y Inoue, O. (2015). Imaging of reactive oxygen species using [3H]hydromethidine in mice with cisplatin-induced nephrotoxicity. *EJNMMI Res*, 5, 38.
- Togel, F., Hu, Z., Weiss, K., Isaac, J., Lange, C. y Westenfelder, C. (2005) Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*, 289(1):31-42.
- Tomasz, M. (1995). Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective). *Chem Biol*, 2(9):575-9.
- Tortora, J. y Derrickson, B. (2013). *Principios de anatomía y fisiología*. México: Editorial Panamericana.
- van Koppen, A., Joles, J., van Balkom, B., Lim, S., de Kleijn, D., Giles, R., Marianne, C., y Verhaar, M. (2012). Human embryonic mesenchymal stem

cell-derived conditioned medium rescues kidney function in rats with established chronic kidney disease, *PLoS ONE*, (7):6.

- Vaziri, N. (2006). Dyslipidemia of chronic renal failure: the nature, mechanisms, and potential consequences. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006(290):262–272.
- Vázquez, G., Mata, M., Sánchez, V., Delgado, R., Perez, D. y Rojas, M. (2016). FTIR Spectroscopic and Molecular Analysis during Differentiation of Pluripotent Stem Cells to Pancreatic Cells. *Stem Cells Int*, 2016:1-2.
- Vieira, R y Morais, J. (2010). 3_{10} helices in channels and other membrane proteins. *J Gen Physiol*, 136 (6):585.
- Wahlstrom, K. (2011). Development of vibrational spectroscopic techniques for measuring quality-related parameters of connective tissue. Norwegian University of Life Sciences, Norway.
- Walsh, M., Fellous, T. y Hammicheetal, A. (2008). Fourier transform infrared microspectroscopy identifies symmetric PO₂- modifications as a marker of the putative stem cell region of humanintestinalcrypts. *Stem Cells*, 26(1):108–118.
- Walsh, M., Hammicheb, A., Fellous, T., Nicholson, J., Cottee, M., Susini, J., Fullwood, N., Pierre L., Martin, P., Alison, M., y Martin, F. (2009). Tracking the cell hierarchy in the human intestine using biochemical signatures derived by mid-infrared microspectroscopy. *Stem Cell Res*, 3:15–27.
- Wang, D. y Lippard, S. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*, (4):308-309.

- Wei, Q., Dong, G., Yang, T., Megyesi, J., Price, P. M., y Dong, Z. (2007). Activation and involvement of p53 in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol*, 293(4).
- Wei, Q., Xiao, X., Fogle, P., & Dong, Z. (2014). Changes in Metabolic Profiles during Acute Kidney Injury and Recovery following Ischemia/Reperfusion. *PLoS ONE*, 9(9).
- Whelan, D., Bambery, K., Heraud, P., Tobin, M., Diem, M., McNaughton, D., y Wood, B. (2011). Monitoring the reversible B to A-like transition of DNA in eukaryotic cells using Fourier transform infrared spectroscopy. *Nucleic Acids Res*, 39(13):5439–5448.
- Williams, R., Hilton, D., Pease, S., Willson, T., Stewart, C., Gearing, D., Wagner, E., Metcalf, D., Nicola, N. y Gough, N. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336,684-687.
- Wood, B. (2015). The importance of hydration and DNA conformation in interpreting infrared spectra of cells and tissues. *Chem Soc Rev*, 7;45(7):1980-98.
- Yang, C., Kaushal, V., Haun, R., Seth, R., Shah, S. y Kaushal, G. (2007). Transcriptional activation of caspase-6 and -7 genes by cisplatin-induced p53 and its functional significance in cisplatin nephrotoxicity. *Cell Death Differ*, 15: 530-544.