



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Ciudad de México a 30 de agosto de 2024.

Dra. Guadalupe Leticia Rodríguez González
Secretaría del Comité Interno Para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio, CICUAL
Presente

Estimado Dra. Rodríguez,

Por este conducto me permito solicitar el cierre del protocolo "DESARROLLO DE UNA NUEVA ESTRATEGIA PARA EL ESTUDIO DE LA FISIOLÓGIA DE LA NEFRONA DISTAL Y SU PAPEL EN EL MANEJO RENAL DE ELECTROLITOS" con registro CINVA - NMM-1919-18-21-1, debido a que dicho protocolo perdió su vigencia y no es posible ya solicitar una prórroga. Se anexa a la presente el informe técnico final del proyecto.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

ATENTAMENTE,

Dra. María Castañeda Bueno
Dpto. de Nefrología y Metabolismo Mineral

Informe Técnico Final

DESARROLLO DE UNA NUEVA ESTRATEGIA PARA EL ESTUDIO DE LA FISIOLÓGÍA DE LA NEFRONA DISTAL Y SU PAPEL EN EL MANEJO RENAL DE ELECTROLITOS

CINVA -NMM-1919-18-21-1

Responsable técnico: Dra. María Castañeda Bueno

I. Formación de recursos humanos

Este proyecto fue parte del trabajo de maestría de la alumna Raquel Aida Valdés Ramírez, quien se encuentra realizando actualmente los trámites finales para poder realizar su examen de grado.

Dado la complejidad del proyecto, Raquel no logró terminar con todos los objetivos durante su periodo de maestría y, es por esto que el alumno de doctorado, Alejandro Márquez Salinas, continuó con el proyecto como parte de su tesis doctoral. Alejandro ha logrado avances significativos y esperamos que el primer artículo relacionado con este proyecto se publique en próximas fechas.

II. Resultados obtenidos

La hipótesis planteada originalmente fue la siguiente: El uso del modelo murino "Terminator" nos permitirá llevar a cabo la producción de cultivos celulares primarios altamente enriquecidos en células del túbulo contorneado distal (TCD).

Como técnica de enriquecimiento de células de TCD en el cultivo, utilizamos la cepa de ratón Terminator, reportada previamente^{34,35}. Brevemente, esta línea de ratones expresa el gen del Receptor de la Toxina Diftérica (DTR) flanqueado por sitios lox P en todos los tipos celulares. Estos ratones Terminator se cruzaron con ratones que expresan la recombinasa Cre bajo el control del promotor de la parvalbúmina (PV), que es un marcador específico de las células DCT en el riñón. Como resultado, obtuvimos una cepa de ratón denominada Terminator-PVCre, donde el gen del DTR es eliminado a través de recombinación mediada por la recombinasa Cre, al unirse a los sitios lox P, en aquellas células positivas para PV. Dichos ratones se utilizaron para preparar cultivos primarios de riñón que después fueron tratados con diftérica para favorecer el enriquecimiento de las células de TCD. Los primeros experimentos se realizaron para confirmar que efectivamente éste método nos permite lograr el enriquecimiento (figura 1, tabla 1).

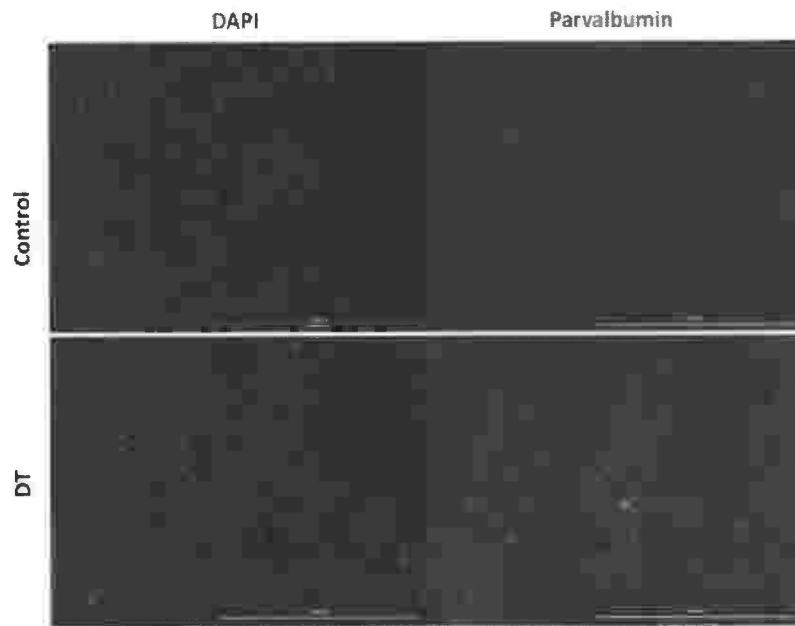


Figura 1. Enriquecimiento de células DCT (PV positivas) en cultivos tratados con DT después de 72 horas.

	Cultivos control	Cultivos tratados con DT
Células totales (DAPI+)	13312	99277
Células PV+	11578	9752
PV+ / Total (%)	86.9	9.8

Tabla 1. Conteo de células PV+ en cultivos control y tratados con toxina al día 5 de siembra

Una vez confirmado esto. Procedimos a hacer la caracterización fenotípica mediante el análisis de la expresión de proteínas y mRNAs específicos de TCD. Mediante esta caracterización nos dimos cuenta de que las células de TCD pierden su fenotipo a los pocos días de ponerse en cultivo. Por esta razón, empezamos a probar distintas estrategias para tratar de mantener el estado diferenciado de las células y lograr así la obtención de un buen modelo celular del TCD. Entre las cosas que se probaron se incluye lo siguiente:

- Diferentes combinaciones de factores de crecimiento y estímulos hormonales en el medio.
- Inhibidores de la transición epitelio mesénquima
- Moduladores de vías de señalización involucradas en la diferenciación celular
- Diferentes esquemas temporales de cultivo
- Diferentes métodos de siembra, como por ejemplo, siembra en insertos tipo transwell.
- Diferentes esquemas de concentración de suero durante la fase de expansión y de depleción de suero durante la fase de diferenciación.

La evaluación de un número de variables tan alto convirtió a éste en un proyecto sumamente complejo, lo cual, aunado al hecho de que nos interrumpió la pandemia,

contribuyó a que el proyecto se extendiera en tiempo. Sin embargo, gracias a todo este trabajo, finalmente logramos encontrar condiciones de cultivo en que se logra mantener el estado diferenciado, al menos parcialmente, de las células del TCD. Esto lo determinamos, principalmente mediante la evaluación, a través de Western blot y qPCR, de la expresión de uno de los marcadores más importantes de este tipo celular, el cotransportador NCC, como se observa en las figura 2. También se evaluó la expresión de marcadores de otros tipos celulares renales (no se muestra).

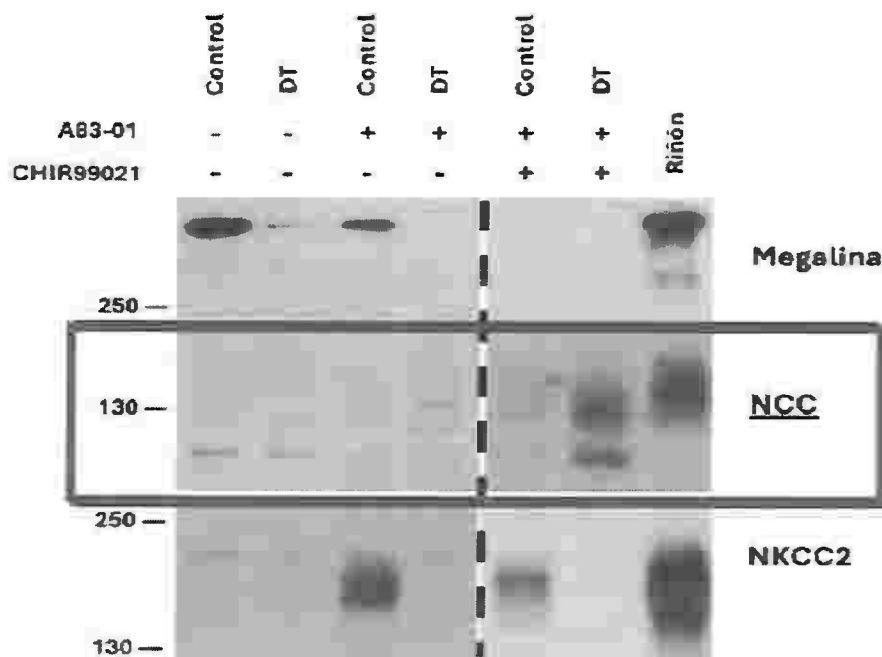


Figura 2. Ensayos de Western blot en los que se muestra la expresión de NCC en cultivos celulares tratados con toxina diftérica (DT) y tratados además con A83-01 (inhibidor de transición epitelio mesenquima) y CHIR99021 (inhibidor de GSK3 y por lo tanto activador de beta-catenina)

Por último, logramos también medir la capacidad de transporte de estas células epiteliales en cultivo y confirmamos que el transporte de sodio observado es sensible a tiazidas, lo cual es consistente con que es mediado por la actividad del NCC (figura 3).

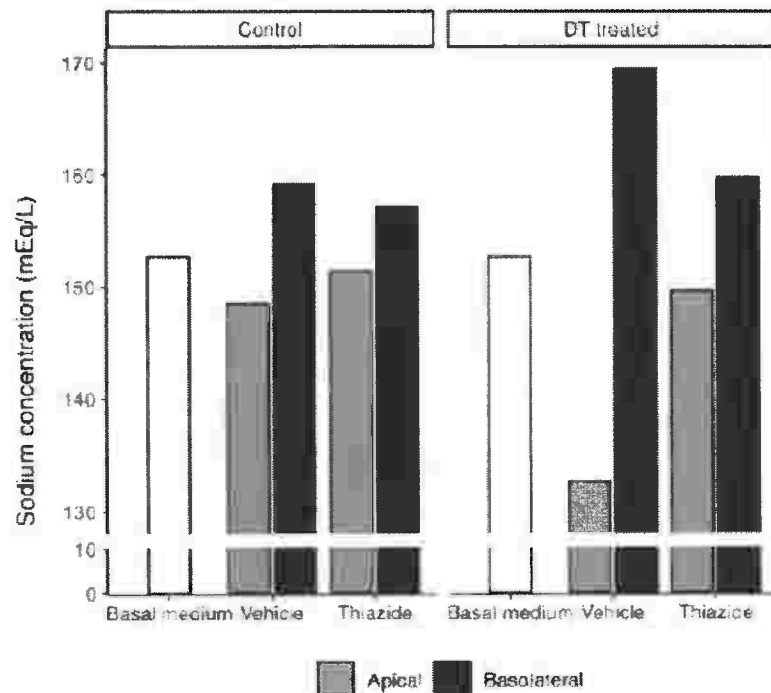


Figura 3. Ensayos de transporte en los que se muestra en cultivos celulares control y tratados con toxina diftérica (DT). Se observa como la distribución de sodio en la cámara inferior del transwel aumenta (barras negras) y en la cámara superior disminuye (barras grises) tras de un periodo de 24 horas después del cambio de medio en ambas cámaras. La concentración inicial de sodio está indicado por las barras blanca.

Como se mencionó anteriormente, los resultados de este trabajo se publicarán próximamente en cuanto se termine la caracterización fenotípica del cultivo. La continuación del proyecto ya ha sido aprobada por el CICUAL bajo el número de proyecto NMM-2094-23-26-1.

Atentamente,

Dra. María Castañeda Bueno
Investigadora en Ciencias Médicas D
Dpto. de Nefrología y Metabolismo Mineral